

Aus dem Institut für Pathologie der  
Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Matrix-Metalloproteinasen und  
ihre Inhibitoren bei der  
demyelinisierenden  
Staupeenzephalitis  
des Hundes  
– eine molekularbiologische *in  
vivo* und *in vitro* Studie –**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
(Dr. med. vet.) durch die  
Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
**Christina Puff**  
aus Kassel

Hannover 2006





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

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

1. Auflage 2006

© 2006 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**, Gießen  
Printed in Germany

ISBN 3-939902-09-8

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

Aus dem Institut für Pathologie  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

**Matrix-Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren  
bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes  
– eine molekularbiologische *in vivo* und *in vitro* Studie -**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
- Doctor medicinae veterinariae -  
(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
**Christina Puff**  
aus Kassel

Hannover 2006

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner, Ph.D.

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Baumgärtner, Ph.D.

2. Gutachter: Univ.-Prof.'in Dr. Andrea Tipold

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2006

***Meinen Eltern***





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1	Das Staupevirus .....	3
2.2	Die Staupeviruserkrankung des Hundes .....	5
2.2.1	Allgemein .....	5
2.2.2	Formen der Staupevirus-Enzephalitis .....	6
2.2.3	Die Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis.....	7
2.3	Paramyxoviren als onkolytische Viren.....	10
2.4	Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs) .....	13
2.4.1	Allgemeines über MMPs und TIMPs .....	13
2.4.2	Klassifizierung und Aufbau der MMPs.....	13
2.4.3	Aktivierung und Regulation der MMPs .....	14
2.4.4	Substrate der MMPs.....	16
2.4.5	Physiologie und Pathologie der MMPs.....	17
2.4.5.1	Allgemein .....	17
2.4.5.2	MMPs und TIMPs im Zentralnervensystem.....	17
2.4.5.3	MMPs und TIMPs bei Tumoren.....	19
2.5	"Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs" (RECK)..	20
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1	Untersuchungsmaterial .....	24
3.1.1	<i>In vitro</i> – Pilotstudie .....	24
3.1.2	<i>In vivo</i> – Hauptversuch.....	24
3.2	Histologie .....	26
3.3	Lichtmikroskopische Einteilung der Staupe-Läsionen .....	27
3.4	Immunhistologie .....	29
3.4.1	Antikörper und Seren .....	29
3.4.2	Durchführung der Immunhistologie (ABC-Methode).....	31
3.4.3	Kontrollen .....	33

3.4.4	Auswertung der Immunhistologie.....	33
3.5	Molekularbiologische Präparationen.....	35
3.5.1	Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung .....	35
3.5.2	RNA-Isolierung, Aufreinigung und DNase-Behandlung .....	36
3.5.2.1	RNA-Isolierung aus DH82- und MDCK-Zellen, Aufreinigung und DNase-Behandlung .....	36
3.5.2.2	RNA-Isolierung aus Kryostat-Gehirngewebe-Schnitten, Aufreinigung und DNase-Behandlung .....	38
3.5.3	Durchführung der RT-PCR .....	40
3.5.3.1	Reverse Transkription.....	40
3.5.3.2	Auswahl und Synthese der Primer.....	41
3.5.3.3	Sequenzierung von MMP-12 .....	46
3.5.3.4	Herstellung der Standardreihen als Mengenstandards für die quantitative PCR.....	47
3.5.3.5	Reaktionsbedingungen für die Amplifizierung der jeweiligen cDNA- Sequenzen .....	50
3.5.3.6	Quantifizierung der Genexpression .....	51
3.5.3.7	Auswertung der quantitativen PCR.....	52
3.5.4	Statistische Auswertung der qPCR.....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>54</b>
4.1	<i>In vitro</i> - Pilotstudie .....	54
4.1.1	Nachweis von GAPDH- und Staupevirus-mRNA.....	54
4.1.2	Nachweis von MMP-, TIMP- und RECK-mRNA.....	56
4.1.2.1	MMP-2 .....	56
4.1.2.2	MMP-9 .....	57
4.1.2.3	MMP-13 .....	58
4.1.2.4	MMP-14 .....	59
4.1.2.5	TIMP-1 .....	60
4.1.2.6	TIMP-2.....	61
4.1.2.7	RECK.....	62
4.2	<i>In vivo</i> - Hauptversuch .....	64

4.2.1	Pathologisch-histologische Befunde .....	64
4.2.1.1	Histochemische Befunde.....	64
4.2.1.2	Immunhistologische Befunde .....	65
4.2.1.2.1	Immunhistologischer Nachweis von Staupevirus-Nukleoprotein .....	65
4.2.1.2.2	Immunhistologischer Nachweis von GFAP .....	66
4.2.1.2.3	Immunhistologischer Nachweis von CD3 .....	68
4.2.1.2.4	Immunhistologischer Nachweis von CD21 .....	69
4.2.1.2.5	Lektin histochemischer Nachweis von BS-1.....	70
4.2.2	RT-PCR.....	73
4.2.2.1	Konventionelle qualitative RT-PCR .....	73
4.2.2.2	Quantitative-RT-PCR .....	73
4.2.2.2.1	Nachweis von GAPDH- und Staupevirus-mRNA .....	73
4.2.2.2.2	Nachweis von MMP-, TIMP- und RECK-mRNA .....	75
4.2.2.2.2.1	MMP-2.....	75
4.2.2.2.2.2	MMP-9.....	77
4.2.2.2.2.3	MMP-12.....	78
4.2.2.2.2.4	MMP-13.....	80
4.2.2.2.2.5	MMP-14.....	82
4.2.2.2.2.6	TIMP-1.....	83
4.2.2.2.2.7	TIMP-2.....	84
4.2.2.2.2.8	RECK.....	86
4.2.3	Korrelationen zwischen Immunhistologie und mRNA-Expression .....	88
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
5.1	<i>in vitro</i> - Pilotstudie .....	90
5.1.1	Auswirkungen einer persistierenden CDV-Infektion auf die Expression von MMPs und ihren Inhibitoren bei kaninen DH82-Zellen .....	90
5.1.2	Schlußbetrachtung .....	97
5.2	<i>in vivo</i> - Hauptversuch.....	98
5.2.1	Nachweis von Staupevirus-Antigen / -mRNA und Phänotypisierung der Läsionen.....	98

---

5.2.2	mRNA-Expression der MMPs und ihrer Inhibitoren bei der kaninen CDV-Infektion .....	101
5.2.3	Schlußbetrachtung.....	112
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>114</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>156</b>
9.1	Bezugsquelle für Reagenzien, Chemikalien und Antikörper .....	156
9.2	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel.....	159
9.3	Lösungen und Puffer .....	163
9.3.1	Histologie .....	163
9.3.2	Immunhistologie.....	164
9.3.3	Molekularbiologie.....	164
9.4	Tabellen .....	165
9.5	Abkürzungen .....	170

# 1 Einleitung

Das kanine Staupevirus („Canine distemper virus“, CDV) ist ein einzelsträngiges, behülltes RNA-Virus negativer Polarität, das, ebenso wie das humane Masernvirus („*Measles virus*“, MV), das cetaceen Morbillivirus („*Cetacean morbilli virus*“, CeMV), das phocine Staupevirus („*Phocine distemper virus*“, PDV) und das *Rinderpestvirus* (RPV), zum Genus der Morbilliviren der Familie Paramyxoviridae gehört (FAUQUET et al., 2004).

Spontane Infektionen mit dem kaninen Staupevirus verlaufen beim Hund in Abhängigkeit von der Immunitätslage des Tieres abortiv, subklinisch oder führen zu schweren, generalisierten Erkrankungen. Diese können sich in einer katarrhalischen und / oder nervösen Form manifestieren (APPEL, 1987; BAUMGÄRTNER, 1993). Die Mehrzahl aller Hunde, die an der nervösen Form erkranken, entwickeln eine Leukoenzephalomyelitis mit bevorzugter Manifestation im Kleinhirn, seltener auch im Großhirn und Rückenmark (BAUMGÄRTNER et al., 1989). Die Einteilung der neuropathologischen Veränderungen erfolgt aufgrund des histologischen Bildes in akute Plaques, subakute Herde mit und ohne Entzündung und chronische Läsionen, wobei auch unterschiedliche Typen gleichzeitig bei demselben Tier vorkommen können (KRAKOWKA et al., 1985; WÜNSCHMANN et al., 1999). Da die histopathologischen Befunde der demyelinisierenden Staupevirus-Enzephalitis morphologisch denjenigen der Multiplen Sklerose (MS) gleichen, wird die kanine Staupevirus-Enzephalitis als ein mögliches Tiermodell für Pathogenesestudien der MS angesehen (BAUMGÄRTNER und ALLDINGER, 2005; VANDEVELDE und ZURBRIGGEN, 2005).

Bei der Demyelinisierung handelt es sich um einen biphasischen Prozess, der primär einer direkten Viruseinwirkung und sekundär immunpathologischen Vorgängen zugeschrieben wird (SUMMERS und APPEL, 1994; BAUMGÄRTNER und ALLDINGER, 2005). Frühe Läsionen sind durch einen hohen CDV-Antigengehalt und eine Aufregulierung der mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-6, -8, -12, TNF-alpha), bei unveränderter mRNA-Expression der anti-inflammatorischen Zytokine (IL-10, TGF-beta) gekennzeichnet (ALLDINGER et al., 1993; MARKUS et

al., 2002). In chronischen Läsionen ist eine starke Reduktion bis hin zum vollständigen Fehlen der viralen Proteine zu beobachten (ALLDINGER et al., 1993). Darüber hinaus besteht eine starke Aufregulierung der MHC-II-Expression und eine hochgradige Infiltration mit mononukleären Entzündungszellen (ALLDINGER et al., 1996). Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren („tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“, TIMPs) werden in allen Läsionstypen einer Staupevirus-Infektion des Gehirns in variabler Ausprägung nachgewiesen (MIAO et al., 2003; GRÖTERS et al., 2005)

MMPs sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die in der Lage sind, nahezu alle Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM) zu spalten und eine große Rolle bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen spielen (STERNLICHT und WERB, 2001; MALEMUD, 2006). Bei der MS werden MMPs als bedeutende Faktoren bei der Transmigration von zirkulierenden Leukozyten in das Zentralnervensystem (ZNS), der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke durch Degradierung der extrazellulären Matrix und dem Myelinabbau betrachtet (CHANDLER et al., 1996; KIESEIER et al., 1999; BAR-OR et al., 2003). Ein wichtiger Forschungsschwerpunkt aktueller Studien ist der Einfluss einer Imbalance zwischen MMPs und ihren Inhibitoren auf die Pathogenese demyelinisierender Enzephalitiden.

Ziel dieser Arbeit war es, die mRNA-Expression verschiedener MMPs und ihrer Inhibitoren (TIMPs, RECK) zu quantifizieren, um Aufschluss über die Expression und den Einfluss dieser Gene auf verschiedene Stadien der kaninen Staupevirus-Infektion zu erhalten. Dazu wurden in einer Pilotstudie die Reaktionsbedingungen für die Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) an nicht infizierten und persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen optimiert und getestet. Im zweiten Teil der Arbeit wurde die mRNA-Expression im Kleinhirn bei Kontrolltieren und bei Hunden mit unterschiedlichen Läsionstypen einer Staupevirus-Infektion bestimmt.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Staupevirus

Die Hundestaupe ist eine hochkontagiöse, weltweit verbreitete, systemische Erkrankung, die durch eine Infektion mit dem kaninen Staupevirus (*Canine distemper virus*, CDV) hervorgerufen wird. Die auftretenden Symptome betreffen vorwiegend den Respirations- und Gastrointestinaltrakt sowie das zentrale Nervensystem (ZNS). Das Staupevirus ist in der Lage ein großes Wirtsspektrum zu infizieren, wobei neben dem Haushund (*Canis familiaris*) noch zahlreiche weitere terrestrische und aquatische Karnivoren (DEEM et al., 2000; DI GUARDO et al., 2005) empfänglich sind. Die empfänglichen Spezies gehören den Familien der Canidae (Hundeartige), Felidae (Katzenartige), Hyaenidae (Hyänenartige), Mustelidae (Marderartige), Procyonidae (Kleinbären), Ursidae (Großbären) und Viverridae (Schleichkatzen) an (WOOLF et al., 1986; ROSCOE et al., 1993; APPEL et al., 1994; HAAS et al., 1996; MOS et al., 2003; BARRETT et al., 2004; CATTET et al., 2004; HIRAMA et al., 2004). Weiterhin sind natürliche Staupevirus-Infektionen auch bei Halsbandpekaris aus der Familie der Artiodactyla und bei nicht humanen Primaten wie dem Japanmakaken beschrieben (YOSHIKAWA et al., 1989; APPEL et al., 1991; NOON et al., 2003). Darüber hinaus ist eine experimentelle Infektion von Totenkopffäffchen möglich (NAGATA et al., 1990).

Das kanine Staupevirus gehört zum Genus Morbillivirus der Subfamilie Paramyxovirinae der Familie Paramyxoviridae. Die Familie der Paramyxoviridae gehört ebenso wie die Familien Bornaviridae, Filoviridae und Rhabdoviridae zur Ordnung der Mononegavirales (FAUQUET et al., 2004). Die Familie Paramyxoviridae besteht aus den beiden Subfamilien Paramyxovirinae (mit den Genera Avulavirus, Henipavirus, Morbillivirus, Respirivirus und Rubulavirus) und Pneumovirinae (mit den Genera Pneumovirus und Metapneumovirus) (ALEXANDER, 2000; WANG et al., 2000; BOSSART et al., 2002; NJENGA et al., 2003; EASTON et al., 2004). Zusätzlich existieren noch einige, bislang nicht näher klassifizierte Viren in der Familie der Paramyxoviridae, wozu das *Tupaia Paramyxovirus*, das *Fer-de-Lance-Virus*, das *Menangle Virus*, das *Nariva Virus* und das *Tioman Virus* zählen

(TIKASINGH et al., 1966; TIDONA et al., 1999; CHUA et al., 2002; KIRKLAND et al., 2002; KURATH et al., 2004). Dem Genus Morbillivirus werden das kanine Staupevirus (*Canine distemper virus*, CDV), das humane Masernvirus (*Measles virus*, MV), das *Rinderpestvirus* (RPV) und das *Peste-des-petits-ruminants Virus* (PPRV) zugeordnet (BARON et al., 1996; BAILEY et al., 2005). Weiterhin gehören diesem Genus das phocine Staupevirus (*Phocine distemper virus*, PDV), und das cetaceen Morbillivirus (*Cetacean morbilli virus*, CeMV) an (KENNEDY, 1998; ICTVdb, 2002; FAUQUET, 2004).

Das Staupevirus ist ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes, behülltes RNA-Virus negativer Polarität, das aus 6 Strukturproteinen und mehreren Nichtstrukturproteinen aufgebaut ist. Zu den Strukturproteinen gehören die Kapsidproteine, bestehend aus dem Nukleo- (N-) Protein und dem Polymerasekomplex einschließlich des Phospho- (P-) und „Large“- (L-) Proteins sowie die Hüllproteine, bestehend aus dem Matrix- (M-), dem Fusions- (F-) und dem Hämagglutinin- (H-) Protein (VANDEVELDE und ZURBRIGGEN, 2005).

Für mehrere Morbilliviren, darunter auch Masern- und Staupevirus, wurde nachgewiesen, dass der Zelloberflächenrezeptor CD150 (SLAM, „Signaling lymphocyte activation molecule“) als zellulärer Rezeptor für den Vireneintritt in die Zelle fungiert. Die Bindung des Virus an CD150 erfolgt durch das H-Protein (TATSUO et al., 2000 und 2001; TATSUO und YANAGI, 2002). Mittels CD150-transfizierter Zellen ist ein sehr effizienter Nachweis von Wildtyp-Staupevirus und dessen Isolierung möglich (SEKI et al., 2003). Beim Menschen ist CD150 auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen vorhanden und an der Regulation von Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ) beteiligt (WANG et al., 2001; SIDORENKO und CLARK, 2003). Zusätzlich zu CD150 ist CD46 („Membrane Cofactor Protein“) ein zellulärer Rezeptor für Masernimpfvirusstämme, nicht aber für Wildtypstämme (DORIG et al., 1993; MCQUAID und COSBY, 2002). Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) – Studien wurde beim Hund CD150 mRNA sowohl bei lymphoiden Zelllinien, als auch bei neoplastischen B- und T-Zellen nachgewiesen, CD46 dagegen nur bei neoplastischen Lymphozyten (SUTER et al., 2005).



Die Rolle einer CDV-Infektion bei humanen Erkrankungen ist nach wie vor umstritten. Unter anderem wird eine Beteiligung bei der Morbus-Paget-Erkrankung (Osteodystrophia deformans) diskutiert (RIMA und DUPREX, 2006).

Bei der Multiplen Sklerose liegen histopathologisch große Ähnlichkeiten mit chronischen, demyelinisierenden Stadien der Staupeenzephalitis des Hundes vor, weshalb eine CDV-Infektion als Tiermodell für pathogenetische Studien dieser Erkrankung herangezogen wird (BAUMGÄRTNER und ALLDINGER, 2005; VANDEVELDE und ZURBRIGGEN, 2005).

## **2.2 Die Staupeviruserkrankung des Hundes**

### **2.2.1 Allgemein**

Die Staupeviruserkrankung des Hundes kann sowohl abortiv, als auch subklinisch oder manifest verlaufen. Der jeweilige Verlauf ist sowohl vom Alter des infizierten Tieres und dessen Immunitätslage als auch vom Virusstamm abhängig (KRAKOWKA und KOESTNER, 1976; SUMMERS et al., 1984).

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung als katarrhalische, nervöse oder systemische Form (APPEL, 1969; BAUMGÄRTNER, 1993). Die katarrhalische Form äußert sich durch Affektionen des Respirations- und / oder Digestionstraktes, wie z. B. Konjunktivitis, Rhinitis, interstitieller Pneumonie oder Enteritis. Bei der nervösen Form kommen klinisch sowohl leichte Muskelzuckungen als auch schwere, generalisierte, epileptiforme Anfälle vor. Im Rahmen der nervösen Form kann es auch zum Auftreten eines so genannten „Staupe-Ticks“ kommen. Die systemische Form stellt eine Kombination aus katarrhalischer und nervöser Form dar. In einzelnen Fällen kommt im Zusammenhang mit einer Staupevirusinfektion auch ein Exanthem der Haut und eine digitale bzw. nasale Hyperkeratose („Hard pad disease“) vor (KRAKOWKA, et al., 1985; MAEDA et al., 1994; MORITZ et al., 1998).

In aller Regel erfolgt eine oronasale Tröpfcheninfektion. Nach der Inhalation findet eine initiale Vermehrung des Staupevirus in Makrophagen des respiratorischen Epithels und der Tonsillen statt. Dort kommt es zu einer lokalen Virusreplikation, in deren Folge hämatogen eine sowohl zellgebundene als auch freie Verbreitung der

Viruspartikel in die lymphoretikulären Gewebe des Körpers erfolgt (KRAKOWKA et al., 1980a). Das klinische Äquivalent dieser Virämie stellt ein, ca. 2 – 4 Tage post infectionem stattfindender, Fieberschub dar. Zu diesem Zeitpunkt ist eine Lymphopenie mit Depletion und Nekrosen der lymphatischen Organe nachweisbar (KRAKOWKA und KOESTNER, 1977; KRAKOWKA et al., 1980b; IWATSUKI et al., 1995; WÜNSCHMANN et al., 2000; SCHOBESBERGER et al., 2005). Nach diesem Zeitpunkt kann entweder die Genesung (abortiver Verlauf) oder eine zweite Virämie eintreten, in deren Verlauf es zu einer Virusausbreitung im gesamten Körper mit oftmals fataler Beteiligung des Zentralnervensystems (ZNS) kommt (KRAKOWKA et al., 1985). Das Virus gelangt meist hämatogen oder liquorogen in das ZNS und ist dort ab dem 8. bis 10. Tag post infectionem nachweisbar (SUMMERS et al., 1979; VANDELDELDE et al., 1985; APPEL, 1987; AXTHELM und KRAKOWKA, 1987).

### **2.2.2 Formen der Staupevirus-Enzephalitis**

Bei der Staupevirus-Enzephalitis können eine Polio- und eine wesentlich häufiger auftretende Leukoenzephalitis unterschieden werden.

Bei der Polioenzephalitis sind vorwiegend die graue Substanz des Großhirns und die Kerngebiete des Stammhirns, vereinzelt auch die graue Substanz des Kleinhirns betroffen (BAUMGÄRTNER, 1993). Zu den Polioenzephalitiden gehören weiterhin die „old dog encephalitis“, die postvakzinale Staupeenzephalitis und die Einschlußkörperchen-Polioenzephalitis (LINCOLN et al., 1973; HARTLEY, 1974; BESTETTI et al., 1978; IMAGAWA et al., 1980; VANDELDELDE et al. 1980; NESSELER et al., 1997 und 1999).

Die Leukoenzephalitis manifestiert sich vor allem in der weißen Substanz des Kleinhirns, periventrikulär des vierten Ventrikels aber auch in den optischen Nervenbahnen, im Rückenmark und in der weißen Substanz des Großhirns (SUMMERS und APPEL, 1994). Histologisch erfolgt eine Einteilung der Herdveränderungen in akute Läsionen, subakute Herde ohne und mit Entzündung, chronische und sklerotische Plaques, wobei mehrere Typen durchaus gleichzeitig vorliegen können (KRAKOWKA et al., 1985; WÜNSCHMANN et al., 1999).

### 2.2.3 Die Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis

Bei der Demyelinisierung im Rahmen der Staupeenzephalitis handelt es sich um einen biphasischen Prozess, der primär einer direkten Viruseinwirkung und sekundär immunpathologischen Vorgängen zugeschrieben wird (SUMMERS und APPEL, 1994; BAUMGÄRTNER und ALLDINGER, 2005).

Frühe Stadien, die histologisch den akuten und subakuten Herdveränderungen ohne Entzündung zuzuordnen sind, sind gekennzeichnet durch ein Myelinscheidenödem, welches sich lichtmikroskopisch in Form einer Vakuolisierung darstellt, und eine geringgradige Mikro- und Astroglie mit aktivierten Astrozyten (Gemistozyten). In subakuten Herden ohne Entzündung ist zusätzlich eine primäre Demyelinisierung vorhanden. Dabei kommt es etwa ab dem 27. Tag post infectionem zu einer segmentalen Separierung des Myelins vom Axon, welche durch Astrozyten hervorgerufen wird. Darauf folgt ein Wegziehen dieser Myelinlamellen durch zytoplasmatische Makrophagenläufer („myelin-stripping“; HIGGINS et al., 1982, SUMMERS und APPEL, 1987).

Diese initialen Läsionen der weißen Substanz sind mit einer Virusreplikation in Gliazellen vergesellschaftet (VANDEVELDE et al., 1985). Ein Nachweis von Virusprotein ist vor allem in Astrozyten, Neuronen, Mikrogliazellen, ependymalen, leptomeningealen und Plexus-chorioideus-Zellen möglich (APPEL, 1969; VANDEVELDE et al., 1980; ALLDINGER et al., 1993; WÜNSCHMANN et al., 1999). Mittels immunhistologischer Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Mehrzahl aller infizierten Zellen in akuten Läsionen um Astrozyten handelt, die zudem eine Aufregulierung des Hyaluronat-Rezeptors CD44 zeigen (MUTINELLI et al., 1989; ALLDINGER et al., 2000). Weiterhin liegt eine Aktivierung von Mikrogliazellen, charakterisiert durch eine Erhöhung der MHC-II-Expression („major histocompatibility complex“) vor (ALLDINGER et al., 1996).

Durchflusszytometrisch ist diese Mikroglia durch eine Aufregulation der Oberflächenmoleküle CD18, CD11b, CD11c, CD1c, MHC-I und MHC-II charakterisiert und weist funktionell eine Erhöhung der Phagozytoseeigenschaften und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) auf (STEIN et al., 2004).

Im Gegensatz dazu ist bei nur etwa 8% der Oligodendrozyten in infizierten Gebieten am Rande der Läsionen CDV-mRNA nachweisbar (ZURBRIGGEN et al., 1998). Mittels *in-situ*-Hybridisierung kann in diesen Zellen eine restriktive Infektion mit unvollständiger Virusreifung nachgewiesen werden, die trotz allem zu einer Beeinflussung des Zellstoffwechsels mit konsekutiver Störung der Proteinsynthese, beispielsweise des basischen Myelinproteins (MBP) und des Myelin-assoziierten Glykoproteins (MAG) zu führen scheint (ZURBRIGGEN et al., 1993, 1998).

Einige CD8+-Lymphozyten sind diffus im Gehirnparenchym verteilt nachweisbar, auch wenn keine perivaskulären Infiltrate vorliegen (WÜNSCHMANN et al., 1999; TIPOLD et al., 2001).

In frühen Phasen ist die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, -8, -12 und TNF-alpha *in vivo* aufreguliert, wohingegen keine Erhöhung der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF-beta nachgewiesen werden kann (MARKUS et al., 2002). Immunhistologisch ist ebenfalls ein erhöhter TNF-alpha Gehalt, vornehmlich in Astrozyten, zu detektieren (GRÖNE et al., 2000). Vergleichbare Ergebnisse sind *in vitro* in primären, staupevirusinfizierten Hundegehirnzellkulturen mit einer erhöhten IL-1-, IL-6- und TNF-alpha-mRNA-Expression zu gewinnen (GRÖNE et al., 2002). Auch im Liquor cerebrospinalis und im Vollblut liegt eine Vermehrung der pro-inflammatorischen Zytokine vorwiegend in der Frühphase der Erkrankung vor (GRÖNE et al., 1998; FRISK et al., 1999a).

In verschiedenen Studien wurde der Einfluss von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihren Inhibitoren („tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“, TIMPs) auf die Leukozytenmigration und die Destruktion der extrazellulären Matrix untersucht. Auf mRNA-Ebene ergibt sich mittels *in-situ*-Hybridisierung eine Aufregulierung von MMP-9, MMP-14 und TIMP-1 in Astrozyten und Makrophagen/Mikroglia in frühen Stadien der Staupevirus-Enzephalitis (GRÖTERS et al., 2005). Auf Proteinebene ist eine deutliche Aufregulierung aller untersuchten MMPs und TIMPs (MMP-1, -3, -7, -9, -12, -13, -14, TIMP-1, -2) in akuten und subakuten Herden ohne Entzündung nachweisbar (MIAO et al., 2003).

In subakuten Herden mit Entzündung und in chronischen Stadien kommt es zu einer deutlich ausgeprägten Demyelinisierung mit Malazien und Gitterzellen, zu einer

Astrogliose sowie zu prominenten perivaskulären, mononukleären Entzündungszellinfiltraten (VANDEVELDE et al., 1981). Trotz allem kann mittels Immunhistologie in vollständig demyelinisierten, chronischen Läsionen noch eine große Zahl an Oligodendrozyten nachgewiesen werden, die CNPase (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase; myelinspezifisches Enzym) exprimieren (SCHOBESBERGER et al., 2002).

CD44 ist bei chronischen Läsionen niedriger exprimiert als bei akuten Herden und vornehmlich zellmembranständig bei perivaskulären, mononukleären Zellen nachweisbar (ALLDINGER et al., 2000). Bei den perivaskulären Infiltraten handelt es sich überwiegend um CD4+- (T-Helferzellen) und CD21+-Zellen (B-Zellen). Im Gegensatz dazu dominieren CD8+-Zellen (zytotoxische T-Zellen) intraläsional und diffus im Parenchym verteilt (ALLDINGER et al., 1996; WÜNSCHMANN et al., 1999). Makrophagen / Mikroglia weisen intraläsional in chronischen Herden eine starke Aufregulierung der MHC-II-Expression auf (ALLDINGER et al., 1996). Die Virusprotein- und mRNA-Expression dagegen ist in chronischen Läsionen der weißen Substanz geringer als bei akuten Herden (BAUMGÄRTNER et al., 1989; ALLDINGER et al., 1993; GAEDKE et al., 1999).

Mittels *in-situ*-Hybridisierung ist eine Zunahme der MMP-9, -14 und TIMP-1-mRNA-exprimierenden Makrophagen / Mikroglia in subakuten Herden mit Entzündung und in chronischen Läsionen nachweisbar (GRÖTERS et al., 2005). Auf Proteinebene dagegen findet sich eine reduzierte MMP-Expression im Vergleich mit akuten Stadien (MIAO et al., 2003).

## 2.3 Paramyxoviren als onkolytische Viren

Der Einfluss von einigen viralen Infektionen auf die Progredienz maligner Tumoren ist seit vielen Jahren bekannt (HUEBNER et al., 1956). „Spontane“ Tumorregressionen lassen sich demnach möglicherweise auf einen Mechanismus zurückführen, der auf einer direkten, lytischen Wirkung der Viren und / oder auf einer virusinduzierten, antineoplastischen Immunantwort beruht (HEINZERLING et al., 2005).

In den letzten Jahren wurden onkolytische Viren unterschiedlichster Virenfamilien näher untersucht. Dazu gehören unter anderem Adenoviren, Morbilliviren, Herpesviren und Flaviviren (BARBER, 2004; POST et al., 2004; FIELDING, 2005; RELPH et al., 2005).

Aus der Familie der Paramyxoviridae wurde das Mumps-Virus schon vor mehreren Jahrzehnten Patienten mit verschiedenen malignen Tumoren verabreicht, wodurch eine signifikante Anzahl der Tumoren eine regressive Entwicklung zeigte, die gleichwohl meistens nur von geringer Dauer war. Die Nebenwirkungen dieser Behandlung waren minimal und beschränkten sich auf mildes, transientes Fieber (ASADA, 1974; OKUNO et al., 1978).

Ein weiteres Mitglied der Familie der Paramyxoviridae, das ebenfalls onkolytische Aktivität aufweist, ist das Virus der aviären Newcastle-Erkrankung („Newcastle Disease Virus“, NDV). Dieses Virus weist *in vitro* eine zytolytische Aktivität in verschiedenen, humanen Tumorzelllinien auf, wohingegen kein zytopathischer Effekt in normalen, humanen Fibroblastenzelllinien nachgewiesen werden kann (REICHARD et al., 1992). Studien haben gezeigt, dass eine einmalige, intratumorale Injektion mit dem Virus der aviären Newcastle-Krankheit (Stamm 73-T) zu einer selektiven Replikation in humanen IMR-32 Neuroblastom Xenotransplantaten mit konsekutiver, lang anhaltender Tumorregression bei Mäusen führt (LORENCE et al., 1994a). Gleichartige Beobachtungen liegen auch für HT1080 Fibrosarkomzell-Xenotransplantate bei Mäusen vor. Diese Fibrosarkomzellen exprimieren das N-ras Onkogen. *In vitro* wurde gezeigt, dass durch eine Transfektion von humanen Fibroblastenzellkulturen mit dem N-ras Onkogen eine 1000fach erhöhte Sensitivität

gegenüber dem NDV verglichen mit nicht transfizierten Fibroblastenzellkulturen erreicht werden kann, worauf sich möglicherweise die lang anhaltenden, kompletten Tumorregressionen zurückführen lassen (LORENCE et al., 1994b). In Phase-I klinischer Studien wurde gezeigt, dass es bei einer intravenösen Verabreichung des NDV (Stamm PV701) bei Patienten mit soliden, nicht auf Standardtherapien ansprechenden, Tumoren zu partiellen, in Einzelfällen bis zu kompletten Tumorregressionen kommt (PECORA et al., 2002).

Klinisch liegen Beobachtungen vor, die eine Regression humaner Burkitt- und Hodgkin-Lymphome sowie akuter lymphoblastischer Leukämie nach einer gleichzeitigen Masernvirusinfektion bzw. einer Impfung mit einem attenuiertem Masernvirusimpfstamm beschreiben (WHEELOCK und DINGLE, 1964; BLUMING und ZIEGLER, 1971; ZYGIERT, 1971; MOTA, 1973; TAQI et al., 1981).

Um eine mögliche klinische Relevanz des Einsatzes des humanen Masernvirus zur onkolytischen Therapie festzustellen, wurde der Masernimpfvirusstamm Edmonston-B intratumoral in humane Lymphom-Xenotransplantate bei immundefizienten (SCID)-Mäusen verabreicht. Dabei kam es sowohl bei B-Zelllymphomen mit einem niedrigen, wie auch mit einem hohen Malignitätsgrad zu einer Tumorregression. Im Gegensatz dazu konnte dieser Effekt mit UV-inaktiviertem Virus nicht hervorgerufen werden (GROTE et al., 2001). Gleichartige Beobachtungen liegen auch für Xenotransplantate von Zellen eines multiplen Myeloms in immundefizienten Mäusen vor, bei denen sowohl bei intratumoraler, als auch bei intravenöser Gabe eines attenuierten Masernvirus-Stammes (Edmonston-B) eine signifikante Regression der Tumoren vorhanden war (PENG et al., 2001).

Einen Rezeptor für das Masernvirus bzw. den Masernvirus-Impfstamm Edmonston B stellt der Zelloberflächenrezeptor CD46 dar (DHIMAN et al., 2004). Im Rahmen von Studien über die onkolytische Wirkung des Masernvirus auf Ovarkarzinome wurde festgestellt, dass es zu einer verstärkten Infektion der Tumorzellen bei weitgehender Schonung des gesunden Nachbargewebes kommt, da eine Überexpression des CD46-Rezeptors in den Tumorzellen vorliegt (PENG et al., 2002). Aufgrund der hohen CD46-Rezeptordichte auf vielen Tumorzellen kommt es zur Zellfusion mit Ausbildung von Synzytien, die unter Einbeziehung der Nachbarzellen in das

Synzytium zu einer erhöhten viralen Genexpression mit daraus resultierender Verstärkung des zytopathischen Effektes führt (ANDERSON et al., 2004).

Einen weiteren Angriffspunkt der viralen Onkolyse stellt der Interferon-Signalkaskadeweg dar, der in vielen Tumorzellen nicht regelgerecht ausgebildet ist, wodurch keine effektive, antivirale Zellantwort gewährleistet ist. Sowohl in verschiedenen, humanen Tumorzelllinien, wie auch in Nacktmäusen mit subkutanen, humanen Melanom-Xenotransplantaten konnte bei einer Behandlung mit dem Vesikulären-Stomatitis-Virus ein zytopathischer Effekt bzw. eine Tumorzellregression nachgewiesen werden. Dieser Effekt trat im Gegensatz zu normalen, humanen Zelllinien auch unter Interferonbehandlung auf (STOJDL et al., 2000).

In Phase-I klinischer Studien an fünf Patienten mit kutanen T-Zell-Lymphomen konnte gezeigt werden, dass es durch eine intratumorale Injektion mit dem attenuierten Masernimpfvirusstamm Edmonston-Zagreb nach einer systemischen Interferon-alpha-Vorbehandlung zu einer Replikation des Virus in den Tumorzellen kommt. Dadurch kommt es zu lokalen Tumorregressionen, in Einzelfällen auch zu regressiven Veränderungen in entfernten Tumorlokalisationen. Die auftretenden Nebenwirkungen ähneln denjenigen, die im Rahmen einer Masern-Impfung beobachtet werden (HEINZERLING et al., 2005).

Das Staupevirus führt *in vitro* zu einer Infektion kaniner lymphoider Zelllinien und neoplastischer Lymphozyten von Hunden mit spontanen B- und T-Zelllymphomen. In allen diesen Zellen konnte CD150 mRNA nachgewiesen werden, wohingegen CD46 mRNA nur in den neoplastischen Lymphozyten detektierbar war. In den CDV-infizierten Zelllinien konnten weiterhin Apoptosen dokumentiert werden, wodurch sich ein möglicher Einsatz von attenuierten Staupeviren als onkolytische Agenzien für kanine Lymphome ergibt (SUTER et al. 2005).



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

### 2.4.1 Allgemeines über MMPs und TIMPs

1962 wurde im Rahmen von *in vitro* Studien erstmals ein Enzym beschrieben, das in der Lage war, native Kollagenfibrillen zu degradieren (GROSS und LAPIERE, 1962). Die Eingruppierung dieses Enzyms erfolgt heute in die Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), auch Matrixine genannt. Bisher sind 25 Vertreter dieser Enzym-Familie bei Vertebraten nachgewiesen worden, davon 23 auch beim Menschen (WOESSNER, 2002; NAGASE et al., 2006). Auch bei Nicht-Vertebraten, unter anderem bei Seeigel (*Echinoidea*) und Süßwasserpolyphen (*Hydra spec.*), ebenso wie bei Pflanzen (Ackerschmalwand; *Arabidopsis thaliana*) konnten MMPs gefunden werden (ROBINSON, 1997; MAIDMENT et al., 1999; LEONTOVICH et al., 2000).

Die „tissue inhibitors of matrix metalloproteinases“ (TIMPs) sind spezifische, endogene Inhibitoren, die in der Lage sind MMPs durch eine 1:1 stöchiometrische Bindung zu hemmen (GOMEZ et al., 1997, STAMENKOVIC, 2003). Gegenwärtig werden 4 verschiedene TIMPs (TIMP-1 bis TIMP-4) unterschieden (BREW et al., 2000). Das Substratspektrum der TIMPs überschneidet sich in großen Bereichen und umfasst alle MMPs. Es bestehen lediglich Unterschiede in der Hemmaffinität, so ist beispielsweise TIMP-1 ein schlechter Inhibitor von MMP-14, -15, -16, -19 und -24 (BAKER et al., 2002). Darüber hinaus können TIMPs weitere biologische Aktivitäten entfalten, beispielsweise als Wachstumsfaktoren (STERNLICHT und WERB, 2001).

### 2.4.2 Klassifizierung und Aufbau der MMPs

MMPs sind Zink-abhängige Endopeptidasen, die in der Lage sind, nahezu alle Moleküle der Extrazellulären Matrix (EZM) zu spalten. Die Bezeichnung der MMPs erfolgt neben ihrem eigentlichen Namen durch eine fortlaufende Nummerierung, die zur Generierung einer besseren Übersichtlichkeit eingeführt wurde. Anfangs wurden die MMPs entsprechend ihrer Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und Membran-gebundene MMPs („membrane-type“ MMPs,

MT-MMPs) eingeteilt (YONG et al., 1998; BODE et al., 1999; NAGASE et al., 2006). Aufgrund des Nachweises großflächiger Überschneidungen in den Substratspezifitäten der einzelnen MMPs, die auch nicht EZM-Moleküle umfasst, erfolgt die Einteilung der MMPs zusätzlich anhand ihrer molekularen Struktur und des Domänenaufbaus in mittlerweile acht Strukturklassen (EGEBLAD und WERB, 2002; VISSE und NAGASE, 2003). Fünf dieser Strukturklassen bestehen aus MMPs, die in den Extrazellularraum sezerniert werden, die drei übrigen aus denjenigen, die an der Zellmembran verankert sind. In der Strukturklasse der sezernierten MMPs können MMPs mit einfacher Hämapexin-Domäne (z.B. MMP-1, -3, -10, -13), Gelatine-bindende MMPs (MMP-2, -9), MMPs mit minimaler Domäne (MMP-7, -26), Furin-aktivierte MMPs (MMP-11, -28) und MMPs mit Vitronektin-ähnlichen Einschüben (MMP-21) unterschieden werden. Bei den MT-MMPs können, abhängig vom Bindungstyp, Typ I – transmembrane MMPs (MMP-14, -15, -16, -24), Typ II – transmembrane MMPs (MMP-23) und GPI - (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankerte MMPs (MMP-17, -25) differenziert werden (STERNLICHT und WERB, 2001; EGEBLAD und WERB, 2002; SOMERVILLE et al., 2003). Generell sind die MMPs aus einer N-terminalen Signalsequenz, einer Propeptid-Domäne und einer katalytischen Domäne aufgebaut. Darüber hinaus sind in vielen der sezernierten MMPs zusätzlich weitere Strukturen, wie z. B. die Hämapexin-Domäne, Furin-Spaltungsstellen und die so genannte „hinge“-Region enthalten. Die MT-MMPs sind mit einer transmembranösen Domäne, an die sich ein zytoplasmatischer Anteil anschließt, an der Zellmembran verankert (NAGASE und WOESSNER, 1999; STERNLICHT und WERB, 2001; VISSE und NAGASE, 2003).

### **2.4.3 Aktivierung und Regulation der MMPs**

Nahezu alle MMPs werden als inaktive Proenzyme sezerniert und müssen aktiviert werden, um ihre proteolytische Aktivität zu entfalten. Die Latenz des Proenzym wird durch die Thiol-(SH)-Gruppe eines hoch konservierten, ungepaarten Cysteins der Propeptid-Domäne erhalten. Diese Thiolgruppe liegt der zink-tragenden, katalytischen Domäne direkt korrespondierend gegenüber und sorgt so als vierter,

inaktiver Ligand für einen Ausschluss von Wasser ( $H_2O$ ) und einer daraus resultierenden Latenz (SPRINGMAN et al., 1990).

Die Aktivierung erfolgt durch Proteinasen und nicht-proteolytische Agenzien wie beispielsweise SH-reaktive Verbindungen, quecksilberhaltige oder denaturierende Stoffe sowie durch reaktive Sauerstoffspezies (NAGASE, 1997). In allen Fällen wird durch eine Spaltung der Cystein-Zink-Verbindung mit einer Ablösung der Propeptid-Domäne und einer konsekutiven Anlagerung von  $H_2O$  an das Zinkatom eine Aktivierung des Enzyms hervorgerufen. Dieser Aktivierungsmechanismus wird auch als „cysteine switch“ bezeichnet (VAN WART und BIRKEDAL-HANSEN, 1990; CHAKRABORTI et al., 2003; SOMERVILLE et al., 2003).

Die Regulation der MMP-Expression ist sehr komplex und erfolgt auf verschiedenen Ebenen, die die Transkription, die Aktivierung des latenten Zymogens (Pro-MMP), die extrazelluläre Inhibition, die Lokalisation inner- oder außerhalb der Zelle und die Internalisierung durch Endozytose umfassen.

Die Induktion der Transkription erfolgt beispielsweise durch den „extracellular matrix metalloproteinase inducer“ (EMMPRIN, CD147), der auf der Zelloberfläche vieler Zellen exprimiert wird und häufig auf Tumorzellen in erhöhtem Maße nachweisbar ist (GABISON et al., 2005). Darüber hinaus können auch TNF-alpha, verschiedene Interleukine (z.B.  $IL-1\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ), zahlreiche Wachstumsfaktoren (unter anderem „epidermal growth factor“ (EGF), „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF)) und intrazelluläre Signaltransduktionswege, die mit einer Aktivierung von  $NF-\kappa B$  und  $IL-1\alpha$  einhergehen, zur Induktion der MMP-Transkription führen (KHERADMAND et al., 1998; KORDES et al., 2005; COHEN et al., 2006, HAN et al., 2006; ITOH et al., 2006; RAYMOND et al., 2006; WANG et al., 2006; YAO et al., 2006).

Posttranskriptionell liegt eine Regulation, bestehend aus einer Stabilisierung bzw. Destabilisierung der mRNA verschiedener MMPs durch Wachstumsfaktoren und durch eine gesteuerte Freisetzung intrazellulär gespeicherter MMPs, vor (STERNLICHT und WERB, 2001).

Die Aktivität der MMPs kann nach der Sekretion durch mehrere endogene Inhibitoren gehemmt werden. Dabei spielen im Gewebe vor allem TIMPs und in

Gewebsflüssigkeiten  $\alpha_2$ -Makroglobulin eine wichtige Rolle. Darüber hinaus sind auch Thrombospondin-1 und -2 sowie das „Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs“ (RECK) in der Lage die proteolytische Aktivität der MMPs zu beeinflussen (BAKER et al., 2002). TIMP-1 und TIMP-2 werden, außer als Inhibitoren, auch zur Aktivierung einiger MMPs benötigt. Die Aktivierung von MMP-2 beispielsweise erfordert sowohl die Bindung von MMP-14 als auch von TIMP-2 (WANG et al., 2000; WORLEY et al., 2003).

Durch eine vorübergehende Bindung löslicher MMPs an die Zelloberfläche kann eine Fokussierung der MMP-Aktivität auf bestimmte, perizelluläre Bereiche unter gleichzeitigem Schutz vor inhibierenden Faktoren erreicht werden (STERNLICHT und WERB, 2001; CHAKRABORTI et al., 2003; STAMENKOVIC, 2003).

#### **2.4.4 Substrate der MMPs**

MMPs sind in der Lage nahezu alle strukturellen Komponenten der EZM, wie z.B. Kollagen, Gelatine, Fibronectin und basisches Myelinprotein (MBP) zu degradieren (STERNLICHT und WERB, 2001; CHAKRABORTI et al., 2003; VISSE und NAGASE, 2003).

Zusätzlich zur EZM können MMPs Vorstufen von Wachstumsfaktoren, Bindungsproteine und zell-assoziierte Adhäsionsrezeptoren spalten, um sie so in aktive oder inaktive Funktionszustände zu versetzen (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001). So gehören beispielsweise das „insulin-like-growth factor binding protein“ (IGF-BP), der „heparin-binding endothelial growth factor“ (HB-EGF), CD44 und das „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) zu den Substraten verschiedener MMPs (FIORE et al., 2002; HAO et al., 2004; SUENGA et al., 2005; LARSEN et al., 2006). Darüber hinaus unterliegen eine Vielzahl verschiedener Zytokine, Zytokin-Rezeptoren und Chemokine einer MMP-vermittelten Spaltung. „Transforming growth factor –beta“ (TGF- $\beta$ ) beispielsweise kann durch Zelloberflächen-assoziiertes MMP-2 und MMP-9 aktiviert werden (STERNLICHT und WERB, 2001).

## **2.4.5 Physiologie und Pathologie der MMPs**

### **2.4.5.1 Allgemein**

MMPs und TIMPs spielen bei vielen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Wundheilung, der Ovulation, der Angiogenese und der Skelettentwicklung eine wichtige Rolle (RAVANTI und KAHARI; 2000, NY et al., 2002; RUNDHAUG, 2005). Auch bei diversen pathologischen Prozessen (Asthma, „chronic obstructive pulmonary disease“ (COPD), Arthritis, multipler Sklerose, Tumormetastasierung, etc.) wird den MMPs ein bedeutender Stellenwert beigemessen (CURRAN und MURRAY, 1999; LEPPERT et al., 2001; MARTEL- PELLETIER et al., 2001; DEMEDTS et al., 2005).

Verschiedene neuere Studien sprechen für eine Beteiligung von MMPs und TIMPs an der Pathogenese diverser Erkrankungen bei Hunden. Dazu gehören neben Untersuchungen zu Tumorprogression und –metastasierung, Arthritiden und endometrialen Veränderungen auch Studien zu Rückenmarkstraumata durch Bandscheibenerkrankungen, Staupeenzephalitiden und alten Hunden mit Alzheimer-ähnlichen Veränderungen (LIM et al., 1997; COUGHLAN et al., 1998; CHU et al., 2002; LOUKOPOULOS et al., 2003; MIAO et al., 2003; GRÖTERS et al., 2005; LEVINE et al., 2006).

### **2.4.5.2 MMPs und TIMPs im Zentralnervensystem**

Im zentralen Nervensystem kommt es unter Einfluss extrazellulärer Proteasen, zu denen auch die MMPs zählen, unter anderem zu wichtigen Umbauprozessen im Verlauf der Entwicklung, sowie während des Neuritenwachstums und der Synapsenbildung (LUO, 2005). Ebenso wird ihnen und ihren Inhibitoren bei der Pathogenese und im Verlauf der unterschiedlichsten Erkrankungen, unter anderem bei Schlaganfällen, Invasion und Metastasierung von Tumoren sowie Migration von Entzündungszellen ins Gehirnparenchym, beispielsweise bei der Multiplen Sklerose, bei Enzephalitiden infektiöser Ursache und bei Autoimmunerkrankungen, eine

wichtige Bedeutung beigemessen (LEPPERT et al., 2001; ROSENBERG, 2002; LEVIČAR et al., 2003; CUNNINGHAM et al., 2005).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Expression von MMPs und TIMPs in adultem Gehirnparenchym in der Regel sehr niedrig und wird erst nach Stimulation stark aufreguliert (KACZMAREK et al., 2002). Die Expression der MMPs erfolgt vorwiegend in Astrozyten und Mikroglia / Makrophagen. Aber auch in Neuronen, Ependymzellen, Endothelzellen, Oligodendrozyten und Perizyten sind MMPs nachweisbar (ROSENBERG et al., 2001; DZWONEK et al., 2004).

In verschiedenen Studien wurde der herausragende Einfluss von MMPs auf die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen entzündlicher Prozesse herausgestellt. Nach einer experimentellen Injektion von bakteriellen Lipopolysacchariden oder thermisch inaktivierten Meningokokken ist eine Induktion von MMP-9 mit einer konsekutiven Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar. Dieser Prozess lässt sich durch MMP-Inhibitoren blockieren (MUN-BRYCE und ROSENBERG, 1998; PAUL et al., 1998).

Bei der Multiplen Sklerose (MS) des Menschen werden MMPs als wichtige Faktoren bei der Transmigration von zirkulierenden Leukozyten in das zentrale Nervensystem betrachtet (BAR-OR et al., 2003). Der Nachweis zahlreicher MMPs und TIMPs gelingt sowohl intra- als auch extraläsional im Gehirnparenchym. Besonders bei akuten Krankheitsschüben liegt eine erhöhte Expression von MMP-9 im Liquor und im Serum vor. Darüber hinaus sind auch MMP-1, -2, -3, -7, -14, TIMP-1 und -2 in Monozyten von MS Patienten in erhöhter Konzentration enthalten (LEPPERT et al., 1998; LEE et al., 1999; ÖZENCI et al., 1999; KOUWENHOVEN et al., 2001; BAR-OR et al., 2003). Mittels Immunhistologie und *in-situ*-Hybridisierung können erhöhte Level an MMP-7 und MMP-12 in aktiven, demyelinisierenden Läsionen nachgewiesen werden (COSSINS et al., 1997; VOS et al., 2003). Darüber hinaus sind in akuten Phasen viele Makrophagen MMP-1, -2 und -3 positiv (MAEDA und SOBEL, 1996). Eine Aufregulation von MMP-7- und MMP-9-mRNA ist während aller MS Stadien mit aktiver Entzündung und bei vielen dieser Patienten auch in der normal erscheinenden weißen Substanz nachweisbar. Die MMP-2-, -3 und TIMP-mRNA-Expression zeigt keinen signifikanten Anstieg (LINDBERG et al., 2001).

Bei Hunden mit einer Staupeenzephalitis ist immunhistologisch eine starke Aufregulation von MMP-1, -2, -3, -7, -9, -11, -12, -13 und -14 sowie TIMP-1 und -2 in akuten und subakuten, nicht entzündlichen Läsionen vorhanden. Die Expression erfolgt vorwiegend in Astrozyten und Mikroglia. In chronischen Läsionen nimmt die MMP- und TIMP-Expression mit Ausnahme von MMP-11, -12 und -13 wieder deutlich ab (MIAO et al., 2003). Mittels *in-situ*-Hybridisierung ist ein Anstieg der MMP-9-, -14- und TIMP-1- mRNA-Expression mit Zunahme der Chronizität der Läsion detektierbar (GRÖTERS et al., 2005).

#### 2.4.5.3 MMPs und TIMPs bei Tumoren

Die Fähigkeit der MMPs EZM zu degradieren spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorzellinvasion und –metastasierung sowie der Angiogenese. Die Entstehung von Metastasen bedarf einer komplexen Reaktionskaskade, die aus Trennung der interzellulären Adhäsion mit einer Separation einzelner Zellen aus dem soliden Tumorzellverband und Entkommen von der Anoikis besteht (BÖHLE und KALTHOFF, 1999, NASH et al., 2002). Dabei ist Anoikis als Apoptose definiert, die durch unzureichende oder ungeeignete Zell-Matrix-Interaktionen induziert wird (FRISCH und SCREATON, 2001). Weitere Schritte der Metastasenbildung umfassen die Proteolyse der EZM mit Migration von Tumorzellen in der EZM, Invasion von Blut- und Lymphgefäßen, Nichterkennung durch das Immunsystem in der Zirkulation, Adhäsion an Endothelzellen, Extravasation aus Blut- und Lymphgefäßen und Proliferation mit Induktion der Angiogenese (BÖHLE und KALTHOFF; 1999, NASH et al., 2002). Durch ihre Fähigkeit nahezu alle Bestandteile der EZM zu spalten, sind MMPs in der Lage sowohl das peritumoröse Stroma als auch die Basalmembranen von Gefäßen zu degradieren, um so den Tumorzellen die Migration und die intravasale Invasion zu ermöglichen. Die Produktion der MMPs erfolgt sowohl durch die Tumorzellen selbst, als auch durch infiltrierende Entzündungszellen und präexistente, stromale Zellen (STAHLE-BACKDAHL und PARKS, 1993; POLETTE et al., 2004; HOFMANN et al., 2005).

Tumoren mit einer hohen MMP-Expression weisen häufig *in vivo* eine ausgeprägte Invasionskapazität auf. Dies wurde unter anderem für MMP-1, -2, -3, -9, -13 und -14

bei humanen Plattenepithelkarzinomen an Kopf und Hals sowie in der Mundhöhle gezeigt (KURAHARA et al., 1999; CULHACI et al., 2004). Darüber hinaus ist eine erhöhte Expression unterschiedlicher MMPs bei diversen Tumoren, wie beispielsweise Magenkarzinomen, Gliomen, kolorektalen Karzinomen, Mamma- und Lungenkarzinomen zu beobachten (CURRAN und MURRAY, 1999; JI et al., 2005).

Die Erhöhung der MMP-Expression ist beim Hund im Zusammenhang mit verschiedenen malignen Neoplasien nachgewiesen worden. Immunhistologisch und zymographisch findet sich eine Erhöhung von MMP-2, -9 und -14 in Osteosarkomen, kutanen Mastzelltumoren sowie in Mammakarzinomen (LANA et al., 2000; LEIBMAN et al., 2000; HIRAYAMA et al., 2002; PAPPARELLA et al., 2002).

## **2.5 „Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs” (RECK)**

Das „Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs“ (RECK) wurde erstmals 1998 beschrieben. Die Entdeckung erfolgte durch Durchmusterung einer humanen Fibroblasten cDNA-Bibliothek und Auswahl derjenigen cDNA-Klone, die nach der Transfektion in v-Ki-*ras*-transformierte NIH/3T3-Zellen zu einer flachen Koloniemorphologie führten (TAKAHASHI et al., 1998). Das 110 kDa-lange RECK Glykoprotein enthält zwei Epidermal-Growth-Factor-ähnliche Wiederholungen und drei Serinprotease-Inhibitor-ähnliche Domänen, die nach dem Kazal-Typ aufgebaut sind (TAKAHASHI et al., 1998; NODA et al., 2003). Kazal-ähnliche Serinprotease-Inhibitoren bestehen aus einem konservierten Sequenzmotiv, das typischerweise sechs Cysteinreste enthält, die durch drei Disulfidbrücken nach einem 1-5/2-4/3-6 Muster miteinander verbunden sind (TIAN und KAMOUN, 2005). Im RECK-Protein liegen weiterhin fünf potentielle Glykosylierungsstellen vor, die durch Asparagine an den Positionen 39, 86, 200, 297 und 352 repräsentiert werden (TAKAHASHI et al., 1998). Das RECK-Protein ist mittels eines an der C-terminalen Domäne lokalisierten Glycosylphosphatidylinositol (GPI) – Proteins an der Plasmamembran verankert (RHEE and COUSSENS, 2002).



Es ist ubiquitär in normalem Gewebe und untransformierten Zellen nachweisbar, wohingegen es in vielen Tumorzelllinien und onkogenetisch transformierten Zellen nicht oder nur in geringem Maße nachgewiesen werden kann (SASAHARA et al., 1999a; TAKAHASHI et al., 1998; TAKAGI et al., 2005a).

Das RECK Protein spielt sowohl bei physiologischen Entwicklungsvorgängen, wie auch bei der Inhibition von Tumorangiogenese, -invasion und –metastasierung eine wichtige Rolle (ECHIZENYA et al., 2005). In Studien an Mäusen mit einer RECK-Null-Mutation kam es zum Tod am Embryonaltag 10,5. Die betroffenen Tiere wiesen Defekte der Kollagenfibrillen, der Basallaminae und der Blutgefäßentwicklung auf (OH et al., 2001; WELM et al., 2002). Auch bei der Entwicklung der Skelettmuskulatur kommt RECK eine bedeutende Rolle zu. Das RECK-Protein ist in Co-Lokalisation mit dem Myoblasten Differenzierungsfaktor („myoblast differentiation factor“, MRF4) in der Skelettmuskulatur von Wildtyp-Mäuseembryonen nachweisbar, und es findet eine Aktivierung des RECK-Promotors durch MRF4 statt, wodurch die Myotubenentwicklung gehemmt wird. Eine Herabregulierung der RECK-Expression erfolgt durch den Myoblasten Determinationsfaktor („myoblast determination factor“, MyoD), der die RECK-Expression herabreguliert, um die Myotubenformation zu fördern (ECHIZENYA et al., 2005).

Durch seine Funktion als Hemmer von Tumorangiogenese, -invasivität und -metastasierung kann das RECK-Expressionslevel in verschiedenen humanen Tumoren als prognostischer Marker eingesetzt werden. Bei Patienten mit Magenkarzinomen konnte eine inverse Korrelation zwischen der RECK-Expression und dem makroskopischen Tumorwachstum, Lymphgefäßeinbrüchen, Lymphknotenmetastasen und Tumorstadium nachgewiesen werden (SONG et al., 2006). Ähnliche Beobachtungen liegen auch für Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Mammakarzinomen, Pankreaskarzinomen und hepatozellulären Karzinomen vor. Es ergaben sich eine deutlich niedrigere Rezidivrate und höhere Überlebensraten, wenn intratumoral eine hohe RECK-Expression vorhanden war (FURUMOTO et al., 2001; MASUI et al., 2003; SPAN et al., 2003; TAKENAKA et al., 2004; TAKEUCHI et al., 2004; TAKENAKA et al., 2005). Bei kaninen Tumoren konnte keine signifikante Korrelation

von der RECK-mRNA-Expression im Tumorgewebe mit klinischen Faktoren hergestellt werden, obwohl die MMP-9-mRNA-Expression signifikant mit derjenigen von RECK korrelierte (TAKAGI et al., 2005b).

Eine Wiederherstellung der RECK-Expression in Tumorzelllinien oder onkogenetisch transformierten Zellen führt zu einer Verminderung ihrer invasiven Aktivität und einer gleichzeitigen Reduktion der MMP-9-Sekretion durch Bindung des RECK-Proteins an MMP-9 (TAKAHASHI et al., 1998).

Außer MMP-9 werden auch MMP-2 und MMP-14 von RECK reguliert (OH et al., 2001). Die Regulation von RECK erfolgt durch verschiedene Mechanismen.

Die Glykosylierung von Asn297 führt zu einer Unterdrückung der MMP-9 Sekretion, diejenige von Asn352 zu einer Hemmung der MMP-2 Aktivierung. Darüber hinaus kann die RECK-vermittelte Hemmung der Tumorzellinfiltration durch eine Glykosylierungshemmung von Asn86, Asn297 und Asn352 aufgehoben werden (SIMIZU et al., 2005).

Ein weiterer Mechanismus der RECK Regulation erfolgt durch die Bindung von Sp1 und Sp3 Transkriptionsfaktoren an die Sp1 Bindungsstelle im RECK-Promotor und einer daraus resultierenden, *ras*-vermittelten Herabregulierung der RECK Genexpression (SASAHARA et al., 1999b und 2002). Zusätzlich kommt es zu einer *ras*-induzierten Erhöhung der Sp1-assoziierten Histondeacetylase-1 (HDAC1) und daraus resultierend ebenfalls zu einer Herabregulierung der RECK-Genexpression (CHANG et al., 2004).

Der als Onkogen wirkende „Epidermal Growth Factor Receptor 2“ (HER-2/neu) hemmt die RECK Expression durch eine transkriptionelle Hemmung, die durch eine vermehrte Anlagerung von Sp1 und Sp3 an der Sp1 Bindungsstelle im RECK Promotor verursacht wird (HSU et al., 2005). Weiterhin bewirkt HER-2/neu eine Hemmung von RECK, die über den „extracellular signal-regulated kinase“- (ERK-) Signalweg vermittelt wird. Dabei erfolgt eine HER-2/neu induzierte ERK-Aktivierung mit konsekutivem Anstieg der Sp-Protein-Phosphorylierung. Durch Bindung dieser phosphorylierten Proteine am RECK-Promotor kommt es zu einer Hemmung der RECK-Genexpression (HSU et al., 2005).

Weiterhin kommt eine TIMP-2 vermittelte RECK-Induktion mit darauf folgender Hemmung der zellassoziierten MMP-Aktivität vor. Diese erfolgt durch eine Erhöhung der Interaktion von Crk mit C3G, resultierend in einer erhöhten *Rap-1*-Aktivierung, was zu einer Hemmung der Endothelzellmigration führt (OH et al., 2004).

Eine medikamentelle Beeinflussung der RECK-Expression ist *in vitro* mittels nichtsteroidalen Antiphlogistika (Aspirin und NS398) in humanen CL-1 Lungenkarzinomzellen möglich. Dabei kommt es zu einer Erhöhung der RECK-Expression sowohl mRNA- als auch auf Proteinebene. Weiterhin erfolgt eine erhöhte Expression an der Zelloberfläche mit gleichzeitiger Reduktion der MMP-2 Aktivität, die vermutlich über Zyklooxygenasen (COX) vermittelt ist (LIU et al., 2002).

Dem „latent membrane protein 1“ (LMP1) des Epstein-Barr-Viruses (EBV) wird eine Rolle bei der Tumormetastasierung beigemessen. Ein möglicher Mechanismus besteht in einer transkriptionellen Herabregulierung von RECK, vermittelt durch die Sp1 Bindungsstelle im RECK-Promotor. Weiterhin kommt es zu einer LMP1 induzierten Stimulation des ERK-Signalweges. Mittels einer Reexpression von RECK kann eine Reduktion der LMP-1-induzierten Freisetzung von aktivem MMP-9 erreicht werden (LIU et al., 2003).

Im Zusammenhang mit entzündlichen Alterationen liegen für die Beteiligung von RECK bislang lediglich Untersuchungen bei humaner, rheumatoider Arthritis vor. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer verminderten Expression von RECK im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthritis kommt. Weiterhin konnte bei rheumatoider Arthritis immunhistologisch gezeigt werden, dass RECK in den, in der Synovialis lokalisierten, Makrophagen rein zytoplasmatisch und nicht membranständig vorhanden war, in den dort lokalisierten Fibroblasten aber membranständig. Es konnte in dieser Studie kein signifikanter Unterschied des MMP-14-Gehaltes zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden (VAN LENT et al., 2005).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Untersuchungsmaterial

#### 3.1.1 *In vitro* – Pilotstudie

Im Rahmen einer Pilotstudie zum Funktionstest der etablierten PCRs wurden zwei unterschiedliche Passagen nicht infizierter DH82-Zellen verwandt. Dabei handelt es sich um eine Makrophagen / Monozyten-Zelllinie, die aus dem Gewebe eines an maligner Histiozytose erkrankten Hundes stammt (WELLMAN et al., 1988). Es wurden die Passagen P13 und P32 in die Untersuchung mit einbezogen. Jede Passage wurde als Doppelansatz in zwei 25 cm<sup>2</sup> – Zellkulturflaschen (Nunc) angezüchtet (GRÖNE et al., 1999). Weiterhin wurden zwei unterschiedliche Passagen persistierend mit dem Onderstepoort- Staupevirusstamm infizierte DH82-Zellen verwandt. Dabei handelte es sich um die Passagen P121 und P138. Die Anzüchtung der Zellen erfolgte analog derjenigen der nicht infizierten Zellen in jeweils zwei Zellkulturflaschen à 25 cm<sup>2</sup>.

#### 3.1.2 *In vivo* – Hauptversuch

Untersuchungsgegenstand der Arbeit waren 26 an Staupe erkrankte Hunde (Nr. 9 - 34). Soweit vorberichtlich mitgeteilt starben die Tiere oder wurden aufgrund infauster Prognose euthanasiert und zur Sektion übersandt. Als Kontrolltiere dienten acht klinisch gesunde Hunde (Nr. 1 - 8) einer parasitologischen Studie (Sektionsnummer beginnend mit V), die weder Staupevirus-infiziert waren, noch eine andere Erkrankung des ZNS aufwiesen. Tiernummer, Sektionsnummer, Sektionsort, Rasse, Geschlecht und Alter der untersuchten Tiere sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tab. 1:** Tiernummer, Sektionsnummer, Sektionsort, Rasse, Geschlecht und Alter der untersuchten Hunde

Tier-nummer	Sektions-nummer	Sektionsort	Rasse	Geschlecht	Alter
1	V 239/05	H	Beagle	m	19 Monate
2	V 255/05	H	Beagle	m	20 Monate
3	V 256/05	H	Beagle	w	17 Monate
4	V 258/05	H	Beagle	w	17 Monate
5	V 259/05	H	Beagle	w	17 Monate
6	V 272/05	H	Beagle	m	19 Monate
7	V 304/05	H	Beagle	w	17 Monate
8	V 365/05	H	Beagle	m	19 Monate
9	S 1175/90	Gi	Mischling	m	2 Jahre
10	S 1375/90	Gi	Terrier	w	3,5 Monate
11	S 1510/90	Gi	Mischling	m	4 Jahre
12	S 2290/90	Gi	DSH	m	10 Monate
13	S 2548/90	Gi	Bobtail	m	5,5 Monate
14	S 98/91	Gi	Mischling	w	6 Monate
15	S 2015/91	Gi	DSH	m	4 Monate
16	S 35/94	Gi	Mischling	m	adult
17	S 103/95	Gi	Dackel	w	1 Jahr
18	S 104/95	Gi	Mischling	m	5 Monate
19	S 123/95	Gi	Mischling	m	2 Monate
20	S 192/95	Gi	Mischling	w	2 Monate
21	S 979/95	Gi	Mischling	m	3 Jahre
22	S 1708/95	Gi	Mischling	w	4 Monate
23	S 1767/95	Gi	Mischling	w	5 Monate
24	S 2115/95	Gi	DSH	w	9 Monate
25	S 786/98	Gi	DSH	w	5 Monate
26	S 997/03	Gi	JRT	m	n.b.
27	S 1069/03	Gi	n.b.	n.b.	n.b.
28	S 842/04	H	Mischling	w	4 Monate
29	S 2658/04	H	Mischling	w	adult
30	S 2936/04	H	JRT	w	3 Monate
31	S 33/05	H	Mischling	m	10 Monate
32	S 58/05	H	Husky	w	7 Monate
33	S 580/05	H	Mischling	m	3 Monate
34	S 954/05	H	Mischling	m	6 Monate

Gi = Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen; H = Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule Hannover; DSH = Deutscher Schäferhund; JRT = Jack-Russell-Terrier; m = männlich; w = weiblich; n.b. = nicht bekannt

Von allen Tieren wurde während der Sektion das Gehirn in toto entnommen. Für die Herstellung von Gefrierblöcken wurde eine repräsentative, ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm große Kleinhirnprobe in ein Aluminiumhütchen verbracht. Darin wurde sie mit Tissue-Tec® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek) blasenfrei überschichtet und mit Isopentan als Intermedium in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Gefrierblöcke erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (WÜNSCHMANN et al., 1999).

Die verbliebenen Anteile des Gehirns der an Staupe erkrankten Tiere wurden zusammen mit repräsentativen Proben aus Leber, Milz, Nieren, Lunge, Herz, Magen, Darm und Harnblase in 10%igem Formalin mindestens einen Tag lang fixiert. Danach erfolgte eine Paraffineinbettung. Die Lagerung der Paraffinblöcke erfolgte bei Raumtemperatur.

### 3.2 Histologie

Für die lichtmikroskopischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden von den in O.C.T. eingebetteten Gehirnproben Serienschnitte auf einem Kryotom (Microm) hergestellt. Diese wiesen für die lichtmikroskopischen Untersuchungen eine Dicke von  $4\ \mu\text{m}$  und für die molekularbiologischen Untersuchungen eine Stärke von  $10\ \mu\text{m}$  auf. Die Gefrierschnitte für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden auf SuperFrost/Plus-Objektträger (Menzel-Gläser) aufgezogen, 30 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet und 10 Minuten mit Azeton (Sigma-Aldrich) fixiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (WÜNSCHMANN et al., 1999). Die Serienschnitte für die RNA-Isolierung wurden direkt nach ihrer Herstellung bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff bzw. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Insgesamt wurden von jedem Kleinhirngefrierblock 19 Serienschnitte à  $4\ \mu\text{m}$  für histomorphologische Untersuchungen und 20 Serienschnitte à  $10\ \mu\text{m}$  für die RNA-Isolierung angefertigt. Die Schnitte direkt vor und nach denjenigen für die RNA-Isolierung (Schnitte 0 und 1) wurden mittels eines Färbeautomaten (Färbegerät Leica ST 4040) einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) unterzogen und eingedeckt (Objektträger-Eindeckautomat Promounter RCM 2000). Schnitt 2 diente der immunhistologischen Verifizierung der Staupevirus-Infektion. Um die

Demyelinisierung darzustellen, wurde am Serienschnitt 3 eine „Luxol-fast-blue“-Kresylechtviolett- (LFB-KV-) Färbung nach Standardprotokollen durchgeführt, nachdem die Gefrierschnitte 2 Minuten in 10%igem Formalin nachfixiert wurden. Die Schnitte 4-9 dienten zur immunhistologischen Zellcharakterisierung, wobei Astrozyten, Makrophagen / Mikroglia, B- und T-Lymphozyten positiv markiert wurden. Die Schnitte 10 – 18 dienten als Reserveschnitte.

### 3.3 Lichtmikroskopische Einteilung der Staupe-Läsionen

Die Klassifizierung der Staupe-Läsionen erfolgte auf der Grundlage der neuropathologischen Befunde in HE- und LFB-KV- gefärbten Kleinhirnschnitten sowie aufgrund des immunhistologischen Nachweises von Staupevirus-Nukleoprotein. Die Einteilung erfolgte in folgende vier Gruppen:

- Gruppe 1: gesunde Kontrolltiere, n=8
- Gruppe 2: akute Staupe-Läsionen, n=14
- Gruppe 3: subakute Staupe-Läsionen mit Demyelinisierung ohne Entzündung, n=6
- Gruppe 4: entzündliche Staupe-Läsionen mit Demyelinisierung, n=6; bestehend aus 4 Tieren mit subakuten Staupe-Plaques mit Entzündung und 2 Tieren mit chronischen Staupeherden

Die Tiere der Gruppe 2 mit akuten Herdveränderungen wiesen außer gelegentlich wenigen Gemistozyten (aktivierte Astrozyten) und vereinzelt einer geringgradigen Vakuolisierung keine neuropathologischen Veränderungen in der HE-Färbung auf. In der LFB-KV-Färbung waren keine demyelinisierten Areale nachweisbar.

Bei den subakuten Läsionen dominierten Vakuolisierungen der weißen Substanz und fokale Astroglionen mit Gemistozyten und Gitterzellen. Darüber hinaus lag in den Plaques eine, mittels LFB-KV-Färbung nachweisbare, Demyelinisierung vor.

Die histologischen Veränderungen der entzündlichen Läsionen bestanden aus einer Vakuolisierung der weißen Substanz und einer, mittels LFB-KV-Färbung nachweisbaren, Demyelinisierung. Weiterhin fanden sich vorwiegend perivaskulär lokalisierte, lymphozytäre Infiltrate mit einzelnen Makrophagen, die bei den subakuten, entzündlichen Läsionen die Dicke von drei Zelllagen nicht überschritten,

wohingegen sie bei den chronischen Läsionen deutlich ausgeprägter vorlagen. In den chronischen Läsionen waren teilweise zusätzlich malazische Areale mit Abräumreaktion nachweisbar. Im Zentrum der chronischen Plaques war eine starke Reduktion der Astrozytenanzahl vorhanden, wohingegen im Randbereich der Herde am Übergang zu unverändert erscheinender weißer Substanz eine Astrogliose vorlag.

Die Einteilung der Hunde in die jeweiligen Gruppen ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

**Tab. 2:** Klassifikation der Staupeläsionen im zentralen Nervensystem

Kontrolle bzw. Staupeläsion		Gruppe	Sektionsnummer		
Kontrolltiere		1	V 239/05	V 255/05	V 256/05
			V 258/05	V 259/05	V 272/05
			V 304/05	V 365/05	
Akute Staupeläsionen		2	S 1175/90	S 2248/90	S 35/94
			S 104/95	S 123/95	S 192/95
			S 979/95	S 1708/95	S 997/03
			S 1069/03	S 842/04	S 2658/04
			S 33/05	S 580/05	
Subakute Staupeläsionen ohne Entzündung		3	S 1358/90	S 98/91	S 2015/91
			S 103/95	S 58/05	S 954/05
Entzündliche Staupeläsionen	subakut	4	S 1767/95	S 2115/95	S 786/98
	chronisch		S 2936/04		
			S 1510/90	S 2290/90	



### 3.4 Immunhistologie

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden die Serienschnitte 2 und 4 bis 9 nach der Schnittgewinnung für die RNA-Isolierung verwandt. Um Staupevirus-Nukleo(N)-Protein-Antigen (Schnitt 2), saures Gliafaserprotein- („glial fibrillary acidic protein“, GFAP; Schnitt 4), CD3- (Schnitt 9), CD21- (Schnitt 8) Antigen und Bandeiraea simplicifolia-1 (BS-1; Schnitt 6)- markierte Zellen nachzuweisen, wurde die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) eingesetzt.

#### 3.4.1 Antikörper und Seren

Die Primär-, Sekundär- und Tertiär-Antikörper wurden in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung („phosphate-buffered saline“, PBS) verdünnt.

Spezifität, Klon-Nummer, Spezies, Verdünnung, Bezugsquelle und markierte Zellpopulation der verwendeten Primär-Antikörper sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Der polyklonale Staupevirus-Nukleoprotein-Antikörper #25 wurde freundlicherweise von Dr. C. Örvell (Central Microbiological Laboratory of Stockholm County Council, Schweden) zur Verfügung gestellt. Den CD21 (like)-Antikörper gegen B-Lymphozyten stellte dankenswerterweise Frau Dr. Kremmer (GSF-National Research Center for Environment and Health, München, Deutschland). Die Antikörper gegen GFAP und CD3 sowie das Lektion BS-1 wurden kommerziell erworben (DakoCytomation GmbH, Sigma Aldrich Chemie GmbH).

Als Sekundär-Antikörper wurden biotiniliertes Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin (Vector Laboratories; 9 µl / ml PBS) bzw. biotiniliertes Ziege-anti-Maus-Immunglobulin (Vector Laboratories; 9 µl / ml PBS) verwandt.

Bei dem Tertiär-Antikörper handelte es sich um einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC; Vector Laboratories).

Eine Übersicht der verwendeten Antikörperkombinationen ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tab. 3:** Spezifität, Klon-Nummer, Spezies, Verdünnung, Bezugsquelle und markierte Zellpopulation / Antigen der verwendeten Primär-Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Lokalisation
Staupevirus	#25	Kaninchen	1:2000	C. Örvell	Staupevirus-Nukleoprotein-positive Zellen <sup>1)</sup>
GFAP	--	Kaninchen	1:3000	Dako (Z0334)	Astrozyten
CD3	--	Kaninchen	1:1000	Dako (N1580)	T-Lymphozyten
CD21 (like)	CA.1D6	Maus	1:500	Dr. Kremmer	B-Lymphozyten <sup>2)</sup>

Lektin	Herkunft	Verdünnung	nachgewiesener Zucker / Zelltyp
BS-1	Bandeiraea simplicifolia	3 µg/ml	α-D-Galaktose; Makrophagen, Mikroglia, Endothelzellen

GFAP = Saures Gliafaserprotein; BS-1 = *Bandeiraea simplicifolia*; -- = entfällt, da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt; <sup>1)</sup> MARKUS et al., 2002; <sup>2)</sup> COBBOLD und METCALFE, 1994

**Tab. 4:** Übersicht der verwendeten Primär-, Sekundär- und Tertiär-Antikörper

Antigen	Primäre Antikörper	Sekundär-Antikörper	Tertiär-Antikörper bzw. Detektionssystem
Staupevirus-Nukleoprotein	#25	biot. Ziege-anti-Kaninchen-Ig	ABC
GFAP	--	biot. Ziege-anti-Kaninchen-Ig	
BS-1	--	Entfällt	
CD3	--	biot. Ziege-anti-Kaninchen-Ig	
CD21 (like)	CA2.1D6	biot. Ziege-anti-Maus-Ig	

biot. = biotiniliert; Ig = Immunglobulin; ABC = Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex; -- = entfällt, da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelt

Der Sekundär-Antikörper war ein biotinierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (Vector Laboratories, BA 1000; Verdünnung: 9 µl in 1 ml PBS) bzw. ein biotinierter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Vector Laboratories, BA 9200; Verdünnung: 9 µl in 1 ml PBS). Bei dem Tertiär-Antikörper handelte es sich um einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC, Vectastain® ABC Kit, PK4000, Vector Laboratories, beim Nachweis von BS-1; Verdünnung: 9 µl Avidin und 9 µl Biotin in 1 ml PBS bzw. ABC, Vectastain® Elite ABC Kit, PK 6100, Vector Laboratories, beim Nachweis von GFAP, CD3, CD21 (like) und Staupevirus-Nukleoprotein; Verdünnung: 9 µl Avidin und 9 µl Biotin in 1 ml PBS).

### 3.4.2 Durchführung der Immunhistologie (ABC-Methode)

In Anlehnung an das von HSU et al. (1981) beschriebene und von ALLDINGER et al. (1996) modifizierte Protokoll wurde die ABC-Methode wie folgt verwendet:

1. Trocknung der bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur
2. Umrandung der einzelnen Schnitte mittels PAP-Pen® (G. Kisker GbR)

3. Zweimaliges Waschen der Schnitte in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur
4. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in 0,05%igem  $H_2O_2$ , verdünnt in Methanol für 30 Minuten bei Raumtemperatur
5. Dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur
6. Inkubation der Schnitte mit dem Primär-Antikörper in einer feuchten Kammer für 1 Stunde bei Raumtemperatur
7. Absaugen des Primär-Antikörpers
8. Dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur
9. Inkubation der Schnitte mit den Sekundär-Antikörpern in einer feuchten Kammer für 30 Minuten bei Raumtemperatur
10. Absaugen der Sekundär-Antikörper
11. Dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur
12. Inkubation der Schnitte mit dem ABC für 30 Minuten bei Raumtemperatur
13. Absaugen des ABCs
14. Dreimaliges Spülen der Schnitte in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur
15. Inkubation der Schnitte in gefiltertem 3`3 Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich), gelöst in PBS mit 0,05%igem  $H_2O_2$  für 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer
16. Dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur
17. Einmaliges Waschen der Schnitte in Aqua bidest. für 5 Minuten bei Raumtemperatur
18. Gegenfärben der Schnitte mit Hämalauin für 10 Sekunden bei Raumtemperatur
19. Bläuen der Schnitte in Leitungswasser für 10 Minuten bei Raumtemperatur
20. Einmaliges Spülen der Schnitte in Aqua bidest. für 5 Minuten bei Raumtemperatur
21. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 Minuten in 50-, 70-, 80-, 96%igem Ethanol (Roth), für zweimal 3 Minuten in 100%igem Isopropanol (Roth) und für dreimal 5 Minuten in Xylol-Ersatz (Roti<sup>®</sup>Histol, Roth) als Intermedium
22. Eindecken der Schnitte im Automaten (Objektträger-Eindeckautomat Promounter RCM 2000)

### 3.4.3 Kontrollen

Als Positivkontrollen für die Staupevirus-Nukleoprotein-, GFAP- und BS-1-Reaktionen wurden bekannte Gehirnschnitte eines nachweislich an Staupe erkrankten Hundes verwendet. Für den Nachweis von CD3 und CD21 diente die Milz eines gesunden Hundes als Positivkontrolle. Die Negativkontrollen bestanden aus entsprechend verdünntem Kaninchenserum nicht immunisierter Kaninchen für Staupevirus-Nukleoprotein, GFAP und CD3 sowie PBS für den Nachweis von  $\alpha$ -D-Galaktose (Makrophagen, Mikroglia, Endothelzellen). Für CD21 (like) wurde entsprechend verdünnte Aszitesflüssigkeit von nicht immunisierten Balb/cJ-Mäusen als Negativkontrolle verwandt.

### 3.4.4 Auswertung der Immunhistologie

Die Auswertung der immunhistologischen Reaktionen erfolgte unter Verwendung eines Mikroskops (Zeiss Axiophot) mit einer eingesetzten Netzmikrometerplatte (U-OCMSQ10/10, OLYMPUS). Diese Mikrometerplatte umschließt bei Verwendung eines 10fach Okulars (WH 10x-H/22) und des 20er Objektivs ein Zählfeld von 0,25 mm<sup>2</sup> (0,5 x 0,5 mm), welches aus 100 kleinen Kästchen mit einer Fläche von jeweils 0,0025 mm<sup>2</sup> (0,05 x 0,05 mm) besteht. Die Schnitte wurden meanderförmig abgefahren und die Anzahl positiv markierter Zellen bestimmt.

Bei den Tieren der Gruppen 1 und 2 erfolgte die Zählung der positiv markierten Zellen in zehn zufällig ausgesuchten Zählfeldern der weißen Substanz (entsprechend 2,5 mm<sup>2</sup>).

Bei den Hunden der Gruppen 3 und 4 wurden analog dazu ebenfalls in zehn zufällig ausgesuchten Zählfeldern der normal erscheinenden, weißen Substanz die Anzahl positiv markierter Zellen bestimmt. Darüber hinaus erfolgte die Zählung aller positiv markierten Zellen auf der gesamten Fläche der mittels HE- und LFB-KV-Färbung determinierten Herdläsionen. Die Umrechnung auf die Anzahl positiver Zellen pro Quadratmillimeter erfolgte durch morphometrische Bestimmung (analySIS<sup>®</sup> Software, Version 3.2; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH) der Plaque-Größe in

eingescannten (MINOLTA DiMAGE Scan Multi Pro, Minolta), LFB-KV-gefärbten Schnitten der einzelnen Tiere.

Die statistische Auswertung der immunhistologischen Daten erfolgte mittels des Statistikprogrammes „Statistical Analysis System“ (SAS) für Windows, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, USA, im Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Residuen der ermittelten Werte wurden mittels des Shapiro-Wilk-Testes und des Kolmogorow-Smirnow-Testes auf ihre Normalverteilung untersucht. Da keine Normalverteilung der Daten vorlag, kamen ausschließlich nicht-parametrische Tests zur Anwendung. Im Einzelnen kamen der Kruskal-Wallis-Test zum globalen Gruppenvergleich und der Wilcoxon-Rangsummentest zum paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zum Einsatz. Dabei wurden Daten als signifikant unterschiedlich gewertet, wenn der p-Wert  $< 0,05$  lag.

## 3.5 Molekularbiologische Präparationen

### 3.5.1 Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung

Zur Vermeidung von Kontaminationen besonders mit DNA oder RNasen wurden alle Arbeitsschritte mit Latex-Einweghandschuhen durchgeführt, die regelmäßig, besonders zwischen den einzelnen Arbeitsgängen, gewechselt wurden. Zusätzlich erfolgte in regelmäßigen Abständen eine Flächendesinfektion mit 10%igem Natriumhypochlorit. Zum Ansetzen und Verdünnen von Lösungen, RNA und DNA wurde mit Diethylenpyrokarbonat (DEPC)- behandeltes Aqua bidest. eingesetzt. Es wurden ausschließlich sterile, DNase- und RNase- freie, gestopfte Pipettenspitzen sowie autoklavierte Instrumente und Plastikeinwegartikel verwendet. Der Autoklavievorgang erfolgte bei 121°C mit einem Druck von 210 kPa (entspricht 2,1 bar) für 20 Minuten. Die Isolierung der RNA und DNA sowie die Reaktionsansätze für die Reverse-Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und die Amplifikatdetektion wurden in unterschiedlichen Räumen unter Verwendung separater Instrumente durchgeführt. Weiterhin wurden alle Lösungen und Reagenzien, soweit dies möglich war, in kleine Mengen aliquotiert und autoklaviert. Um der Denaturierung von RNA vorzubeugen und ihre Integrität zu sichern, wurden alle Arbeitsschritte, soweit dies realisierbar war, auf Eis ausgeführt und die RNA bei –80°C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert und alle Arbeitsschritte wurden, soweit dies durchführbar war, ebenfalls auf Eis ausgeführt. Die Reinigung des Kryostaten erfolgte vor, bzw. zwischen dem Schneiden der einzelnen Gefrierblöcke mit 70%igem Ethanol sowie mit 10%igem Natriumhypochlorit. Die Gewebeschnitte zur RNA-Isolierung wurden mittels autoklavierter Zahnstocher in die Reaktionsgefäße überführt. Bei der RT-PCR bzw. der RT-qPCR wurden stets eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Bei der Negativkontrolle wurde die Probe durch eine äquivalente Menge DEPC-Aqua bidest. ersetzt. Als Positivkontrolle diente RNA, bzw. cDNA, bei der in Vorversuchen eine hohe Expression des jeweiligen Genes nachgewiesen worden war. Alle temperaturempfindlichen Reagenzien und Proben wurden stets in Kühlblocks aufbewahrt. Die Präparationsschritte der RT-PCR erfolgten ebenfalls auf Eis.

### 3.5.2 RNA-Isolierung, Aufreinigung und DNase-Behandlung

#### 3.5.2.1 RNA-Isolierung aus DH82- und MDCK-Zellen, Aufreinigung und DNase-Behandlung

Die RNA-Isolierung wurde nach den Grundlagen der so genannten „single-step-Methode“ (CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987) mittels TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen) ausgeführt. Die Durchführung erfolgte nach einem adaptierten Protokoll, basierend auf Herstellerangaben (GRÖNE et al., 1999). Die folgenden Angaben beziehen sich auf eine Gewebekulturflasche mit einer Grundfläche von 25cm<sup>2</sup>.

1. Medium bis zu einer Restmenge von ca. 1 ml absaugen. Bei Zellpassagen mit einem hohen Anteil Zellen im Überstand (beispielsweise persistierend Staupevirus-infizierte DH82-Zellen), diesen auffangen und mit 12.000 x g 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugieren
2. Zellen mit einem Zellschaber gründlich vom Boden der Zellkulturflasche ablösen
3. Medium-Zell-Gemisch in ein 2 ml – Reaktionsgefäß geben, 5 Minuten mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren und das Medium absaugen
4. 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz hinzufügen und mit der Pipette mehrfach auf- und abpipettieren
5. Zugabe von 300 µl Chloroform
6. Reaktionsgefäß fest verschließen und 15 Sekunden kräftig in der Hand schütteln.
7. 2 – 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
8. 15 Minuten mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugieren
9. Obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführen und die phenolhaltige Phase inklusive eines evtl. vorhandenen Sediments verwerfen
10. 700 µl Isopropanol hinzufügen (mindestens gleiches Volumen wie das der wässrigen Phase) und mischen, bis keine Schlierenbildung mehr vorhanden ist
11. Inkubation bei –20°C für mindestens 10 Minuten (besser mehrere Stunden, da dann eine deutlich höhere RNA-Ausbeute zu erwarten ist)



12. 10 Minuten mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugieren (dabei das „Gelenk“ des Reaktionsgefäßdeckels nach außen ausrichten, damit das Pellet nach dem Zentrifugieren leichter auffindbar ist)
13. Überstand absaugen und verwerfen
14. RNA-Pellet mit 600 µl 75%igem Ethanol vorsichtig waschen
15. Ethanol absaugen
16. Pellet mit 75%igem Ethanol überschichten
17. Lagerung bei -80°C

Die Aufreinigung und DNase-Behandlung der RNA erfolgte mittels des „RNeasy Mini Kits“ (Qiagen) und des „RNase free DNase Kits“ (Qiagen). Das Protokoll basiert auf Herstellerangaben und gilt für eine RNA-Probe.

1. Mit 75%igem Ethanol überschichtetes RNA-Pellet 15 Minuten mit 20.000 x g bei 4°C zentrifugieren
2. Ethanol vorsichtig abgießen
3. Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel vorsichtig auf ein Zellstofftuch stellen und Pellet ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur trocknen lassen
4. 350 µl Puffer RLT mit 250 µl Ethanol (96-100%) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol (Roth) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mischen
5. RNA-Pellet mit 100 µl DEPC-Aqua bidest. auflösen
6. Puffergemisch zum Probenvolumen hinzufügen
7. RNeasy Mini Säule auf 2 ml - „collecting tube“ geben und 700 µl des Probengemisches auf die Säule pipettieren
8. 15 Sekunden mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, „collecting tube“ und Durchfluss verwerfen
9. Säule auf neues 2 ml - Reaktionsgefäß geben und 350 µl Puffer RW 1 hinzufügen
10. 15 Sekunden mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
11. 10 µl DNase-I-Stammlösung zu 70 µl Puffer RDD geben und durch vorsichtiges Schwenken und Kippen mischen, wobei die hohe Anfälligkeit für physikalische Denaturierung beachtet werden muss

12. 80 µl DNase-Puffer-Mischlösung auf die Silikamembran der Säule pipettieren
13. 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur
14. 350 µl Puffer RW1 auf die Säule pipettieren
15. 15 Sekunden mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Reaktionsgefäß und Durchfluss verwerfen
16. Säule auf 2 ml - „collecting tube“ platzieren und 500 µl Puffer RPE hinzufügen
17. 15 Sekunden mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
18. 500 µl Puffer RPE auf die Säule pipettieren
19. 2 Minuten mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, „collecting tube“ und Durchfluss verwerfen
20. Säule auf 2 ml – Reaktionsgefäß setzen
21. 1 Minute mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Reaktionsgefäß und Durchfluss verwerfen
22. Säule auf 1,5 ml – „collecting tube“ geben
23. 30 µl RNase-freies Wasser auf die Silika-Membran der RNeasy-Säule geben
24. 1 Minute mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Säule verwerfen
25. 5 µl für die Konzentrationsbestimmung der RNA entnehmen und die restliche RNA sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren und nachfolgend bei –80°C lagern

### **3.5.2.2 RNA-Isolierung aus Kryostat-Gehirngewebe-Schnitten, Aufreinigung und DNase-Behandlung**

Die RNA-Isolierung, Aufreinigung und DNase-Behandlung aus in OCT eingebettetem Gehirn-Gewebe erfolgte mittels des „RNeasy Lipid Tissue Mini – Kits“ (Qiagen) und des „RNase – free DNase – Kits“ (Qiagen) nach einem, auf Herstellerangaben basierenden, Protokoll. Die Kryostat-Schnitte für die RNA-Isolierung wurden nach einem initialen Schnitt für die Beurteilung der Läsionen durch eine HE-Färbung als Serienschnitte gewonnen. Daran schlossen sich weitere Serienschnitte für Sonderfärbungen und Immunhistologie an. Zur RNA-Isolierung wurden 20 Serienschnitte à 10 µm verwendet, die bis zur Isolierung in einem 2 ml –

Reaktionsgefäß gesammelt und in flüssigem Stickstoff bzw. bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Das folgende Protokoll ist für eine RNA-Isolierung ausgelegt.

1. 1 ml QIAzol Lysis Reagenz zu den Kryostat-Serienschnitten geben, dabei unter einem Abzug arbeiten
2. Homogenisierung mit dem Tissue Tek Homogenisator (SLG) und Omni-Tips (SLG) bei geringster Stufe für 15 – 20 Sekunden
3. Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur
4. Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Chloroform
5. Reaktionsgefäß fest verschließen und in der Hand für 15 Sekunden kräftig schütteln
6. Inkubation für 2 – 3 Minuten bei Raumtemperatur
7. Zentrifugation mit 20.000 x g bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten
8. Obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml – Reaktionsgefäß pipettieren
9. Zugabe von 1 Volumen 70%igem Ethanol (in der Regel 600  $\mu\text{l}$ ) und vortexen des Gemisches
10. 700  $\mu\text{l}$  der Probe inklusive eines eventuellen Präzipitates auf die RNeasy Säule pipettieren, die sich auf einem 2 ml – „collecting tube“ befindet
11. Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur, Durchfluss verwerfen
12. Wiederholung von Schritt 10 mit dem Rest der Probe
13. Zugabe von 350  $\mu\text{l}$  Puffer RW1 auf die RNeasy-Säule
14. Zentrifugation mit 12.000 x g bei Raumtemperatur für 15 Sekunden
15. 10  $\mu\text{l}$  DNase-I-Stammlösung zu 70  $\mu\text{l}$  Puffer RDD geben und durch vorsichtiges Schwenken und Kippen mischen, wobei die hohe Anfälligkeit für physikalische Denaturierung beachtet werden muss
16. 80  $\mu\text{l}$  der DNase-Puffer-Lösung auf die Silikamembran der Säule pipettieren
17. 15 Minuten Inkubation bei  $15^{\circ}\text{C}$  -  $30^{\circ}\text{C}$
18. 350  $\mu\text{l}$  Puffer RW1 auf die Säule pipettieren
19. 15 Sekunden mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Reaktionsgefäß und Durchfluss verwerfen
20. Säule auf 2 ml – „collecting tube“ platzieren und 500  $\mu\text{l}$  Puffer RPE hinzufügen

21. 15 Sekunden mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
22. 500 µl Puffer RPE auf die Säule pipettieren
23. 2 Minuten mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, „collecting tube“ und Durchfluss verwerfen
24. Säule auf 2 ml – Reaktionsgefäß setzen
25. 1 Minute mit 12.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugieren, Reaktionsgefäß und Durchfluss verwerfen
26. Säule auf 1,5 ml – „collecting tube“ geben
27. Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Silika-Membran der Säule
28. Zentrifugation mit 12.000 x g bei Raumtemperatur für 1 Minute
29. Erneute Zugabe von 30µl RNase-freiem Wasser auf die Silika-Membran der Säule
30. Zentrifugation mit 12.000 x g bei Raumtemperatur für 1 Minute
31. Sofortiges Einfrieren der RNA in flüssigem Stickstoff nach Entnahme von 5 µl der RNA zur Konzentrationsbestimmung
32. Lagerung der RNA bei –80°C

### **3.5.3 Durchführung der RT-PCR**

#### **3.5.3.1 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription zur cDNA-Synthese erfolgte mittels des Omniscript-Kits (Qiagen) sowie Random Hexamers (Promega) und RNaseOut (Invitrogen). Das Protokoll basierte auf Herstellerangaben, war für bis zu 1 µg RNA anwendbar und resultierte in 19 µl cDNA. Basierend auf der vorhandenen RNA-Menge konnten die einzelnen Reaktionsvolumina vervielfacht werden. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µg RNA, die in 12 µl DEPC-Aqua bidest. gelöst war, 2 µl 10 x Puffer RT, 2 µl dNTP-Mix (5 mM je dNTP), 1 µl Random Hexamers, 1 µl RNase – Inhibitor (RNaseOut, 10 U/µl) sowie 1 µl Omniscript Reverse Transkriptase<sup>®</sup>. Die Reverse Transkription wurde unter folgenden Temperaturbedingungen durchgeführt:

1. 10 Minuten bei 25°C

2. 1 Stunde bei 37°C
3. 5 Minuten bei 93°C
4. 4°C bis zur Entnahme der Proben

Die derart gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

### 3.5.3.2 Auswahl und Synthese der Primer

Die Amplifikation der mRNA in der RT-PCR erfolgte mittels folgender Primer (Tabellen 5, 6), die aus der Literatur übernommen, bzw. anhand der bekannten mRNA-Gensequenzen ausgewählt wurden.

Bei der qualitativen PCR zur Herstellung der Standardreihen wurden publizierte Primersequenzen für MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2 und CDV (FRISK et al., 1999b; BARNES et al. 2000) und bei der quantitativen PCR für GAPDH (VON SMOLINSKI et al., 2005) benutzt.

Zur Auswahl anhand der bekannten mRNA-Gensequenzen wurden die Programme Primer3-Designer (ROZEN und SKALETSKY, 2000) bzw. Beacon Designer Version 2.1 verwendet. Die Herstellung wurde von der Firma MWG Biotech AG durchgeführt. Die Primer für MMP-12 wurden in den Bereichen hoher Sequenzhomologien zwischen Mensch, Maus, Kaninchen und Ratte ausgewählt, da keine Daten für eine kanine Sequenz verfügbar waren. Der Sense-Primer (MMP-12 S; p125) wurde aus der Literatur übernommen (ULRICH et al., 2005). Die Übereinstimmung der PCR-Amplifikate mit den entsprechenden kaninen Sequenzen hat durch Sequenzvergleiche sowohl in der Literatur als auch im Rahmen dieser Arbeit stattgefunden.

Die lyophilisierten Primer wurden nach Herstellerangaben (MWG Biotech AG) mit DEPC-Aqua bidest. gelöst und auf eine Endkonzentration von 15 pmol/µl verdünnt und in aliquotierten Mengen bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

**Tab. 5:** Übersicht über die in der qualitativen PCR verwendeten Primer, deren interne Bezeichnung, Sequenz sowie Länge des Amplikons, Accession-Nr. und Position der Primer

Primer	Interne Bez.	Sequenz (5' - 3' Richtung)	Länge des Amplikons	Acc.-Nr., Position
MMP-2 S	p 164	CCAAGAACTTCCGTCTGTCC	606 bp	AF177217; 1201-1220
MMP-2 AS	p 165	AGCTATGACCACTGCCTTGC		AF177217; 1806-1787
MMP-9 S	p 85	GAGGTTTCGACGTGAAGGCGCAGAT	200 bp	J05070; 1918-1941
MMP-9 AS	p 86	AGGTCACGTAGCCCACTTCGTCCAC		J05070; 2117-2093
MMP-12 S	p 125	CATGAAGCGTGAGGATGTAG	396 bp	NM_008605; 404-423
MMP-12 AS	p 233	CGTATGTCATCAGCAGAGAG		NM_008605; 799-780
MMP-13 S	p 210	CCTGCTGGAATCCTGAAGAA	409 bp	AF201729; 130-149
MMP-13 AS	p 211	CATGAGCCAGAAGACCAGAA		AF201729; 538-519
MMP-14 S	p 87	TGCCTGCGTCCATCAACTG	484 bp	NM_004995; 1325-1345
MMP-14 AS	p 88	ATCACCTCCGTCTCCTCCTCA		NM_004995; 1808-1788
TIMP-1 S	p 89	GCGTTATGAGATCAAGATGAC	345 bp	AF077817; 224-244
TIMP-1 AS	p 90	CTGGTCCGTCCACAAGCA		AF077817; 565-549
TIMP-2 S	p 91	GCAGAYGTAGTGATCAGRGR	315 bp	AF095638;
TIMP-2 AS	p 92	GTTYAGGCTCTTCTTCTGGG		AF095638;

**Tab. 5 (Fortsetzung):**

Primer	Interne Bez.	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Länge des Amplikons	Acc.-Nr., Position
RECK S	p 328	GGCAGAATGGACGCACTTAC	489 bp	AB110699; 1957-1976
RECK AS	p 329	ACTTCACAGCAGCACACTCG		AB110699; 2445-2426
CDV S	p 1	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	287 bp	AF378705; 769-789
CDV AS	p 2	CAAGATAACCATGTACGGTGC		AF378705; 1055-1035
GAPDH S	p 188	AAGGTCGGAGTCAACGGATT	365 bp	AB038240; 7-26
GAPDH AS	p 189	GCAGAAGAAGCAGAGATGATG		AB038240; 371-351

Bez. = Bezeichnung; Acc.-Nr. = Accession-Nr.; S = Sense Primer; AS = Antisense Primer; bp = Basenpaare; MMP = **M**atrix-**M**etalloproteinase; TIMP = „**T**issue-**I**nhibitor of Matrix-**M**etalloproteinases“; RECK = „**R**eversion-inducing-cysteine-rich protein with **K**azal motifs“; CDV = Staupevirus („**C**anine **D**istemper **V**irus“); GAPDH = **G**lyceraldehyd-3-**P**hosphat-**D**ehydrogenase

**Tab. 6:** Übersicht über die in der quantitativen PCR verwendeten Primer und Sonden, deren interne Bezeichnung, Sequenz sowie Länge des Amplikons, Accession-Nr. und Position der Primer

Primer	Interne Bez.	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Länge des Amplikons	Acc.-Nr., Position
MMP-2 S	p 278	GGAGATCTTCTTCTTCAAGGACCG	89 bp	AF177217; 1367-1390
MMP-2 AS	p 279	AGAATGTGGCTACCAGCAGGG		AF177217; 1455-1435
MMP-9 S	p 207	CATGACATCTTCCAGTACCAAG	85 bp	AB006421; 1975-1996
MMP-9 AS	p 208	GGTTCACCTCATTCCGAGAA		AB006421; 2059-2040
MMP-9 Sonde	s 209	FAM- CTACTTCTGCCAGGACCGCTTCTACT- TAMRA		AB006421; 2004-2029
MMP-12 S	p 370	CCCTTTTGATGGCCGAGGTG	117 bp	DQ395095; 1-20
MMP-12 AS	p 371	TTTGTGCCTTTGTAGGTTTTAGTCC		DQ395095; 93-117
MMP-13 S	p 229	GGCTTAGAGGTCACTGGCAAAC	118 bp	AF201729; 202-223
MMP-13 AS	p 230	TGGACCACTTGAGAGTTCGGG		AF201729; 319-299
MMP-14 S	p 231	GATTCCTTCCCAGACCTTGATGTTT	116 bp	AY534615; 242-266
MMP-14 AS	p 232	GGATGCCCAATGGAAAGACCTAC		AY534615; 173-151
TIMP-1 S	p 192	ACGGACACTTGACAGATCAAC	94 bp	AF077817; 388-407
TIMP-1 AS	p 193	GCAGCATAGGTCTTGGTGAA		AF077817; 481-462



**Tab. 6 (Fortsetzung):**

Primer	Interne Bez.	Sequenz (5' – 3' Richtung)	Länge des Amplikons	Acc.-Nr., Position
TIMP-2 S	p 195	CCATCAAGCGGATTCAGT	89 bp	AF095638; 54-71
TIMP-2 AS	p 194	GGAAGGAGCCGTGTAGATAA		AF095638; 142-123
RECK S	p 372	CATCTGTGGGCACAATGGGG	81 bp	AB110699; 2303-2322
RECK AS	p 373	GGCCCGTAGTAATCGACTGC		AB110699; 2383-2364
CDV S	p 170	GCTCTTGGGTTGCATGAGTT	83 bp	AF378705; 954-973
CDV AS	p 171	GCTGTTTCACCCATCTGTTG		AF378705; 1036-1017
GAPDH S	p 190	GTCATCAACGGGAAGTCCATCTC	84 bp	AB038240; 196-218
GAPDH AS	p 191	AACATACTCAGCACCAGCATCAC		AB038240; 279-257

Bez. = Bezeichnung; Acc.-Nr. = Accession-Nr.; S = Sense Primer; AS = Antisense Primer; bp = Basenpaare; MMP = **M**atrix-**M**etalloproteinase; TIMP = „**T**issue-**I**nhibitor of Matrix-**M**etalloproteinases“; RECK = „**R**eversion-inducing-**c**ysteine-rich protein with **K**azal motifs“; CDV = Staupevirus („**C**anine **D**istemper **V**irus“); GAPDH = **G**lyceraldehyd-3-**P**hospha**t**-**D**ehydrogenase

### 3.5.3.3 Sequenzierung von MMP-12

Die Sequenz des kaninen MMP-12 war nicht bekannt. Deshalb wurde cDNA aus persistierend mit dem Onderstepoort-Staupevirusstamm infizierten DH82- Zellen mittels Primern amplifiziert, die in einer mausspezifischen MMP-12 Sequenz (Accession-Nr. NM\_008605) in Regionen hoher Homologien zwischen Maus, Ratte, Kaninchen und Mensch lokalisiert waren. Das gewonnene Amplikon wurde mittels Gelelektrophorese identifiziert und mittels des „NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II – Kits“ (Macherey-Nagel) aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde wie folgt durchgeführt:

1. 100 µl Puffer NT mit 50 µl Probe mischen
2. Säule auf 2 ml – „collecting tube“ geben und die Probe laden
3. Zentrifugation mit 12.000 x g für 1 Minute bei Raumtemperatur, dann Durchfluss verwerfen
4. 600 µl Puffer NT3 auf die Säule geben
5. Zentrifugation mit 12.000 x g für 1 Minute bei Raumtemperatur, dann Durchfluss verwerfen
6. Zentrifugation mit 12.000 x g für 2 Minuten bei Raumtemperatur zum Trocknen der Silikamembran; Durchfluss und „collecting tube“ verwerfen
7. Säule auf ein neues 1,5 ml – Reaktionsgefäß geben
8. 25 µl Elutionspuffer NE auf die Säule geben
9. 1 Minute bei Raumtemperatur zur Erhöhung des eluierten DNA-Gehaltes inkubieren
10. Zentrifugation mit 12.000 x g für 1 Minute bei Raumtemperatur
11. Entnahme von 5 µl zur Konzentrationsbestimmung und Lagerung der DNA bis zur Sequenzierung bei –20°C

Das aufgereinigte Amplikon wurde von der Firma Seqlab (Göttingen) zweimal sequenziert. Die so ermittelte Sequenz wurde an die Genbank übermittelt und unter der Accession-Nr. DQ395095 gespeichert.

### 3.5.3.4 Herstellung der Standardreihen als Mengenstandards für die quantitative PCR

Die zur Quantifizierung der Proben in der quantitativen PCR benötigten Standardreihen wurden mittels Primern (Tabelle 5) hergestellt, die das zu untersuchende Amplikon beidseitig flankierten. Mittels dieser Primer wurde in einer qualitativen PCR cDNA aus MDCK-Zellen (**M**adin **D**arby **C**anine **K**idney; MMP-13, RECK), DH82-Zellen (MMP-2, -9, -14, TIMP-1, -2, GAPDH) bzw. persistierend mit dem Onderstepoort-Staupevirusstamm infizierten DH82-Zellen (CDV, MMP-12) amplifiziert. Die hierzu verwendete RNA wurde mittels TRIzol<sup>®</sup>-Isolierung gewonnen, aufgereinigt, einer DNase-Behandlung und einer reversen Transkription nach den oben angegebenen Protokollen unterzogen. Die gewünschte Sequenz wurde mittels einer qualitativen PCR amplifiziert. Hierzu wurde ein Multicycler<sup>®</sup> PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH) verwendet. Die Reaktion wurde mittels des „GeneAmp<sup>®</sup> RNA PCR Core Kits“ (Perkin Elmer, Applied Biosystems GmbH) durchgeführt. Die Zusammensetzung für einen Reaktionsansatz von 50 µl ist Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tab. 7:** Reaktionsansatz für die qualitative PCR

Mengen und Reagenzien		Endkonzentration in der Reaktion
38,0 µl	DEPC- Aqua bidest.	
5,0 µl	10 x PCR Puffer II	1 x PCR Puffer
2,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,25 mM MgCl <sub>2</sub>
1,0 µl	dNTP-Mix (10 mM)	0,2 mM dNTP-Mix
1,0 µl	S-Primer (15 pmol/µl)	300 nM S-Primer
1,0 µl	AS-Primer (15 pmol/µl)	300 nM AS-Primer
0,5 µl	AmpliAq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,05 U/µl
1,0 µl	cDNA	1,05 ng RNA/µl

dNTP = **D**esoxyribonukleosid**t**riphosphate; S-Primer = Sense Primer; AS-Primer = Antisense Primer

Das Temperaturprofil für die PCR bestand aus einer initialen Denaturierung bei 94°C für 1 Minute, darauf folgend 40 Zyklen bestehend aus 94°C für 1 Minute, 56°C (MMP-2, -9, -12, -13, -14) bzw. 58°C (GAPDH) bzw. 59°C (CDV, RECK) bzw. 59,5°C (TIMP-1, -2) „Annealing“-Temperatur für 2 Minuten und 72°C für 1 Minute und einem finalen Extensionsschritt bei 72°C für 5 Minuten. Nach Abschluss dieser Schritte wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und die Amplifikate bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert. Die Identifikation der jeweiligen Gene erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Ein 2%iges, mit Ethidiumbromid versetztes Agarosegel wurde pro Gel-Tasche mit 15 µl PCR-Produkt und 3 µl Bromphenol-Laufpuffer (ABgene) beladen. Zur Herstellung einer Standardreihe wurden jeweils 4 Taschen mit dem PCR-Produkt des jeweiligen Genes gefüllt. Die Auswertung des Agarose-Gels wurde mittels einer zusätzlich aufgetragenen 100bp-Leiter (ABgene) zur Verifizierung der Amplifikatlänge durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte horizontal für die Dauer von 1 Stunde bei 90 Volt mit einer maximalen Stromstärke von 250 mA. Die Visualisierung fand mit einem UV-Licht-Transilluminator (Biometra) statt. Die Daten wurden in Form einer digitalen Aufnahme unter Zuhilfenahme des BioDocAnalyse-Programmes Version 1.0 (Biometra) dokumentiert. Die jeweiligen Banden wurden unter UV-Licht-Kontrolle mit einer sterilen Skalpellklinge aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, gewogen und in ein steriles 1,5 ml – Reaktionsgefäß verbracht. Die Extraktion der DNA erfolgte mittels des „NucleoSpin® Extract II – Kits“ (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Dazu wurden zu den exzidierten Gelfragmenten pro 100 mg Agarose-Gel 200 µl Puffer NT hinzugefügt. Darauf folgend wurde die Probe bei 50°C für 5 – 10 Minuten inkubiert, bis sich die Gelfragmente komplett gelöst hatten. Während dieser Inkubationszeit wurde die Probe alle 2 – 3 Minuten kurz gevortext. Die NucleoSpin® Extract – Säule wurde auf einem 2 ml – „collecting tube“ platziert und mit der komplett lysierten Probe geladen. Nun folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 12.000 x g für 1 Minute. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurden 600 µl Puffer NT3 auf die Säule gegeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 12.000 x g für 1 Minute. Der Durchfluss wurde verworfen, bevor sich eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 12.000 x g für 2 Minuten zum Trocknen der Silika-Membran

anschloss. Nun wurde die Säule auf einem sterilen 1,5 ml – Reaktionsgefäß platziert und mit 25 µl Elutionspuffer NE beladen. Dieser wurde auf der Säule bei Raumtemperatur für 1 Minute inkubiert. Die Elution erfolgte durch Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 12.000 x g für 1 Minute. Von diesem Eluat wurden 5 µl zur Konzentrationsbestimmung entnommen und das Verbleibende bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (GeneQuant) und die gemessene DNA-Konzentration wurde in Kopienzahl pro µl Probe umgerechnet. Die Ermittlung des Molekulargewichtes bei doppelsträngiger DNA erfolgt durch Multiplikation der Anzahl der Basenpaare mit 660 Dalton pro Basenpaar. Ein Dalton entspricht dabei 1 Gramm. Ein Mol einer Substanz enthält  $6 \times 10^{23}$  Moleküle (= Kopien) [Avogadro-Konstante]. Durch Multiplikation der Avogadro-Zahl (Kopien pro Mol) mit der Konzentration der Probe (g pro µl) und Division durch das Molekulargewicht (g pro Mol) erhält man die Anzahl der Kopien pro µl. Die Umrechnung der Probenkonzentration von ng/µl auf g/µl erfolgt durch Multiplikation mit dem Faktor  $1 \times 10^{-9}$ .

$$\text{Kopien / } \mu\text{l} = \frac{6 \times 10^{23} \text{ (Kopien / Mol)} \times \text{Konzentration der Probe (ng / } \mu\text{l)} \times 10^{-9}}{\text{Molekulargewicht (g / Mol)}}$$

Aufgrund der so erhaltenen Kopienanzahl pro µl wurde eine dezimale Verdünnungsreihe von  $10^8$  Kopien / µl bis  $10^2$  Kopien / µl mit DEPC-Aqua bidest. hergestellt und als Standardreihe für das jeweilige Gen in der quantitativen PCR verwendet.

### 3.5.3.5 Reaktionsbedingungen für die Amplifizierung der jeweiligen cDNA-Sequenzen

Die quantitative RT-PCR wurde nach optimierenden Vorversuchen mit dem Mx3005P Quantitative-PCR-System (Stratagene) durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten 8x „Strip Tubes“ (Stratagene) die mit „Optical Caps“, 8x Strip (Stratagene) verschlossen wurden. Zusätzlich zu der cDNA der jeweiligen Proben wurde eine dezimale Verdünnungsreihe des jeweiligen Genes von  $10^8$  bis  $10^2$  Kopien als Standardreihe im selben Lauf amplifiziert. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz, bei dem die cDNA durch eine äquivalente Menge DEPC-Aqua bidest. ersetzt wurde. Die Reaktionen wurden mittels des „Brilliant SYBR-green QPCR Core Reagent Kit“ (Stratagene) mit einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l durchgeführt. Die Quantifizierung von MMP-2, -12, -13, -14, TIMP-1, -2, RECK, CDV und GAPDH wurde mit SYBR-green I als Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 0,05 U/ $\mu$ l SureStart™ Taq DNA Polymerase in 1 x Core PCR Puffer 10x mit 2,5 mM  $MgCl_2$  (4,0 mM bei TIMP-1), 8 % Glycerol, 3% DMSO (4% bei TIMP-1 und TIMP-2), 150 nM S-Primer (Tabelle 6), 150 nM AS-Primer (Tabelle 6), 30 nM Rox als Referenzfarbstoff und 200  $\mu$ M dNTP-Mix. Der Sybr-Green I – Farbstoff wurde in einer Endkonzentration verwendet, die einer Verdünnung des Ausgangskonzentrates von 1:40000 entsprach. Das fehlende Volumen des Reaktionsansatzes wurde auf 25  $\mu$ l mit DEPC-Aqua bidest. aufgefüllt. Das Temperaturprogramm bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten. Daran schlossen sich 40 Zyklen (CDV 35 Zyklen) bestehend aus einer Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, einer „Annealing-Phase“ bei 57°C (TIMP-1, -2, CDV) bzw. 60°C (MMP-12, RECK) bzw. 61°C (MMP-13) bzw. 63°C (MMP-14) bzw. 64°C (MMP-2, GAPDH) für 1 Minute und einer Elongationsphase bei 72°C für 30 Sekunden an. Abschließend erfolgte eine finale Elongationsphase bei 72°C für 1 Minute. Im direkten Anschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse als Identitätsnachweis des entstandenen Amplifikates durchgeführt. Das Temperaturprofil der Schmelzkurve begann mit 95°C für die Dauer 1 Minute, an das sich 41 Zyklen mit einer Dauer von je 1 Minute anschlossen. Diese begannen bei

einer Temperatur von 55°C, wobei die Temperatur bei jedem Zyklus um 1°C anstieg. Die Quantifizierung von MMP-9 erfolgte unter Verwendung eines TaqMan-Sonden-Systems. Die Reaktionen wurden analog denjenigen, bei denen SYBR-Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde, als 25 µl Reaktionsansätze durchgeführt. Es erfolgte ebenfalls das Mitführen einer Standardreihe auf derselben Platte. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz, bei dem die cDNA durch die gleiche Menge DEPC-Aqua bidest. ersetzt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 0,025 U/µl SureStart™ Taq DNA Polymerase in 1 x Core PCR Puffer 10 x mit 5,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 300nM S-Primer (Tabelle 6), 300 nM AS-Primer (Tabelle 6), 200 nM TaqMan Sonde (Tabelle 6), 80 nM Rox als Referenzfarbstoff und 200 µM dNTP-Mix. Das fehlende Volumen des Reaktionsansatzes wurde mit DEPC-Aqua bidest. auf 25 µl aufgefüllt. Das Temperaturprofil bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten. Daran schlossen sich 40 Zyklen bestehend aus einer Denaturierungsphase bei 95°C für 15 Sekunden und einer „Annealing-Phase“ bei 60°C für 1 Minute an.

### 3.5.3.6 Quantifizierung der Genexpression

Bei PCR-Reaktionen, bei denen SYBR-Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde, kam es zur Fluoreszenzemission, sobald sich der Farbstoff in doppelsträngige DNA eingelagert hatte.

Bei der Verwendung des TaqMan-Sonden-Systems befanden sich an beiden Enden der Sonde jeweils unterschiedliche, fluoreszierende Farbstoffe, von denen einer als Donor („Reporter“) und der andere als Akzeptor („Quencher“) der Energie diente. Der Reporter war dabei am 5'-Ende und der „Quencher“ am 3'-Ende der Sonde lokalisiert. Bei intakter Sonde konnte durch den „Reporter“ keine Fluoreszenz emittiert werden, da die Energie aufgrund der räumlichen Nähe auf den Quencher übertragen wurde und dieser dann zur Fluoreszenz angeregt wurde. Durch Bindung der Sonde zwischen den beiden Primern wurde diese während der Elongation durch die Taq-Polymerase gespalten. Dadurch kam es zur räumlichen Trennung von „Reporter“ und „Quencher“ und der Energietransfer war nicht länger möglich, so dass der Reporter nun selbst Fluoreszenz in einer ihm charakteristischen Wellenlänge emittieren konnte. Diese wurde dann vom Gerät detektiert. Während der Reaktion

wurde die emittierte Fluoreszenz durch das Gerät (Mx 3005P QPCR System™, Stratagene) aufgezeichnet und mittels der dazugehörigen Software ein Quotient aus dem Signal des Reporters und demjenigen des passiven Referenzfarbstoffes (ROX) gebildet. Dieser Wert stellte das normalisierte Reportersignal ( $R_n$ -Wert) dar. Durch Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz ( $R_n^-$ -Wert) der ersten PCR-Zyklen vom relativen Reportersignal ( $R_n^+$ -Wert) wurde von der Software der  $\Delta R_n$ -Wert gebildet. Der logarithmierte  $\Delta R_n$ -Wert wurde als Abszisse gegen den entsprechenden PCR-Zyklus als Ordinate in ein Koordinatensystem aufgetragen und daraus ein „Amplification Plot“ erstellt. Anhand der Fluoreszenzdaten wurde von der Software der Bereich der ersten PCR-Zyklen ermittelt, in dem die interzyklischen Fluoreszenzvariationen möglichst gering waren („Adaptive Baseline“) und mithilfe dessen die Grundlinie („Baseline“) festgelegt. Anhand dieser Grundlinie erfolgte die Berechnung des Grenzwertes („Threshold“), ab welchem das Signal als positiv gewertet wurde. Dieses traf dann mit der exponentiellen Amplifikation im Verlauf der PCR-Reaktion zusammen. Die Zykluszahl, bei der das Signal der jeweiligen Probe den Grenzwert („Threshold“) überschritt, wurde als „Threshold Cycle“ – Wert ( $C_t$ -Wert) bezeichnet. Dieser Wert gab den errechneten, relativen PCR-Zyklus an, bei dem der „Amplification Plot“ den Grenzwert („Threshold“) kreuzte. Zur Quantifizierung der Proben mit unbekannter Genexpression wurde eine logarithmische Darstellung der  $C_t$ -Werte einer dezimalen Verdünnungsreihe mit bekannter Startkopienzahl erstellt und mittels der Software eine Standardkurve errechnet. Anhand der Interpolation der ermittelten  $C_t$ -Werte der einzelnen Proben wurde die vorhandene Ausgangskopienzahl der jeweiligen cDNA in den einzelnen Proben bestimmt.

### 3.5.3.7 Auswertung der quantitativen PCR

Die für jede Probe im Einzelansatz gemessene Kopienzahl des spezifischen Genes wurde durch die Kopienanzahl des „House-Keeping-Genes“ GAPDH geteilt und dann mit dem Faktor 100 multipliziert, so dass sich für jede Probe eine relative mRNA-Expression ergab [Kopien des jeweiligen Gens / 100 Kopien GAPDH]. Die Multiplikation mit dem Faktor 100 wurde vorgenommen, um eine bessere Darstellbarkeit der Daten zu gewährleisten.



### 3.5.4 Statistische Auswertung der qPCR

Die statistische Auswertung der Daten der qPCR der Kleinhirnproben erfolgte mittels des Statistikprogrammes „Statistical Analysis System“ (SAS) für Windows, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, USA, im Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Residuen der ermittelten, normalisierten Messwerte (in Kopien des jeweiligen Gens / 100 Kopien GAPDH) wurden mittels des Shapiro-Wilk-Testes und des Kolmogorow-Smirnow-Testes auf ihre Normalverteilung untersucht. Dabei ergab sich lediglich für RECK eine Normalverteilung der Daten, weshalb ausschließlich nicht-parametrische Tests zur Auswertung herangezogen wurden. Im Einzelnen kamen der Kruskal-Wallis-Test zum globalen Gruppenvergleich und der Wilcoxon-Rangsummentest zum paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zum Einsatz. Daten wurden als signifikant unterschiedlich gewertet, wenn der p-Wert  $< 0,05$  lag.

Weiterhin wurden Korrelationen zwischen der immunhistologisch bestimmten Anzahl positiv markierter Zellen der jeweiligen Antigene und der mRNA-Expression der einzelnen Gene mittels des Spearman-Korrelationskoeffizienten bestimmt. Auch hier wurden die Werte als signifikant verschieden gewertet, wenn der p-Wert  $< 0,05$  lag.

## 4 Ergebnisse

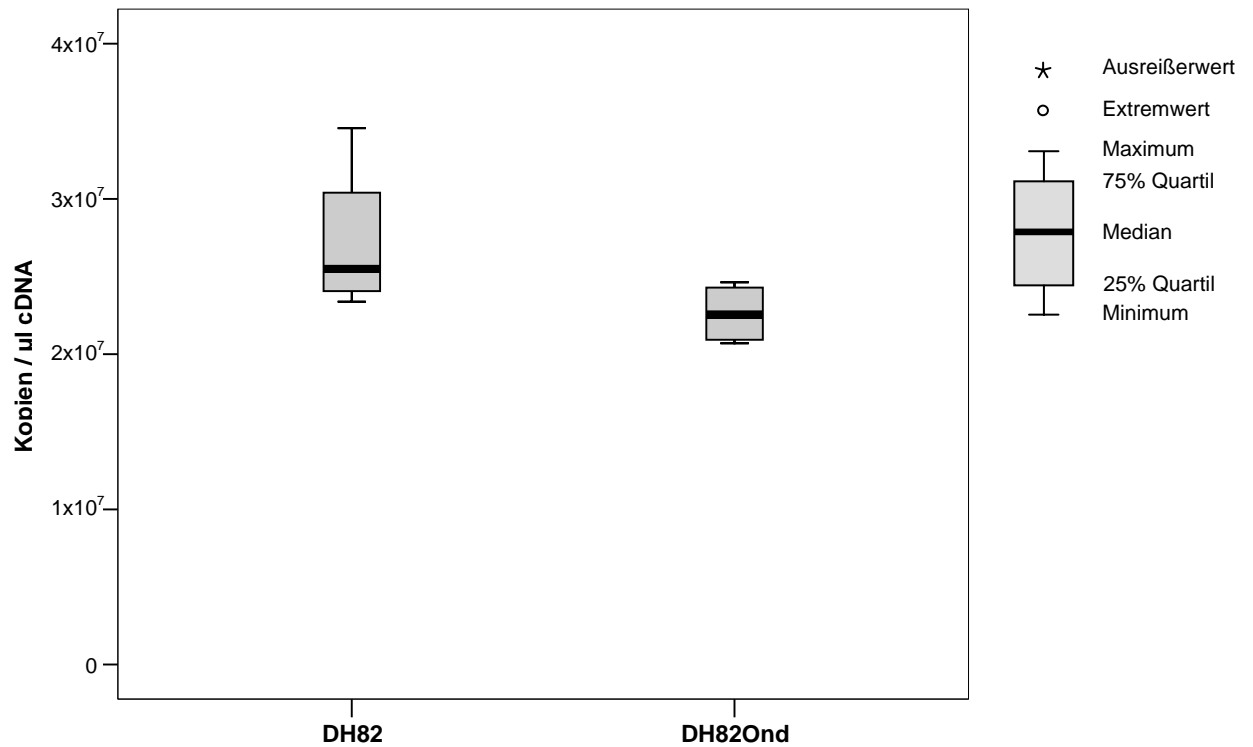
### 4.1 *In vitro* – Pilotstudie

Die Reaktionsbedingungen der quantitativen PCR wurden für die Gene MMP-2, MMP-9, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, RECK, Staupevirus-Nukleoprotein und GAPDH etabliert. Die normalisierten mRNA-Gehalte für jede Probe sowie die p-Werte im Wilcoxon-Rangsummentest für die gruppenweisen Vergleiche sind dem Anhang (Kapitel 9.4; Tab. 9-11) zu entnehmen.

#### 4.1.1 Nachweis von GAPDH- und Staupevirus-mRNA

In allen untersuchten Proben konnte GAPDH-mRNA nachgewiesen werden. Es lagen keine signifikanten Unterschiede im GAPDH-mRNA-Gehalt zwischen infizierten und nicht infizierten DH82-Zellen vor ( $p = 0,1124$ ; Abb. 1).

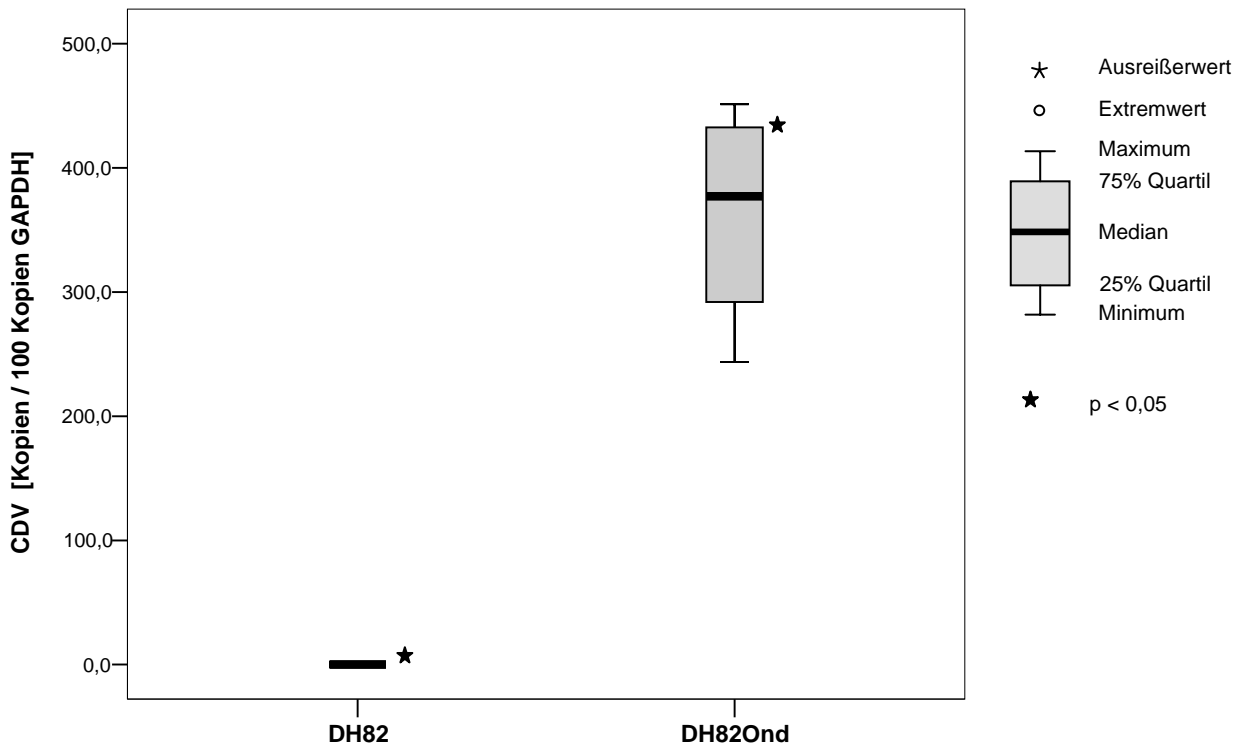
**Abb. 1:** GAPDH-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen



DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen

Die Staupevirusinfektion der persistierend infizierten DH82-Zellen wurde mittels des Nachweises von Staupevirus-Nukleoprotein-mRNA verifiziert. Diese war nur in den persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen mit einem Median von 377,02 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 243,59 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 451,28 Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0211$ ) nachzuweisen (Abb. 2).

**Abb. 2:** CDV-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen.



DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.1.2 Nachweis von MMP-, TIMP- und RECK-mRNA

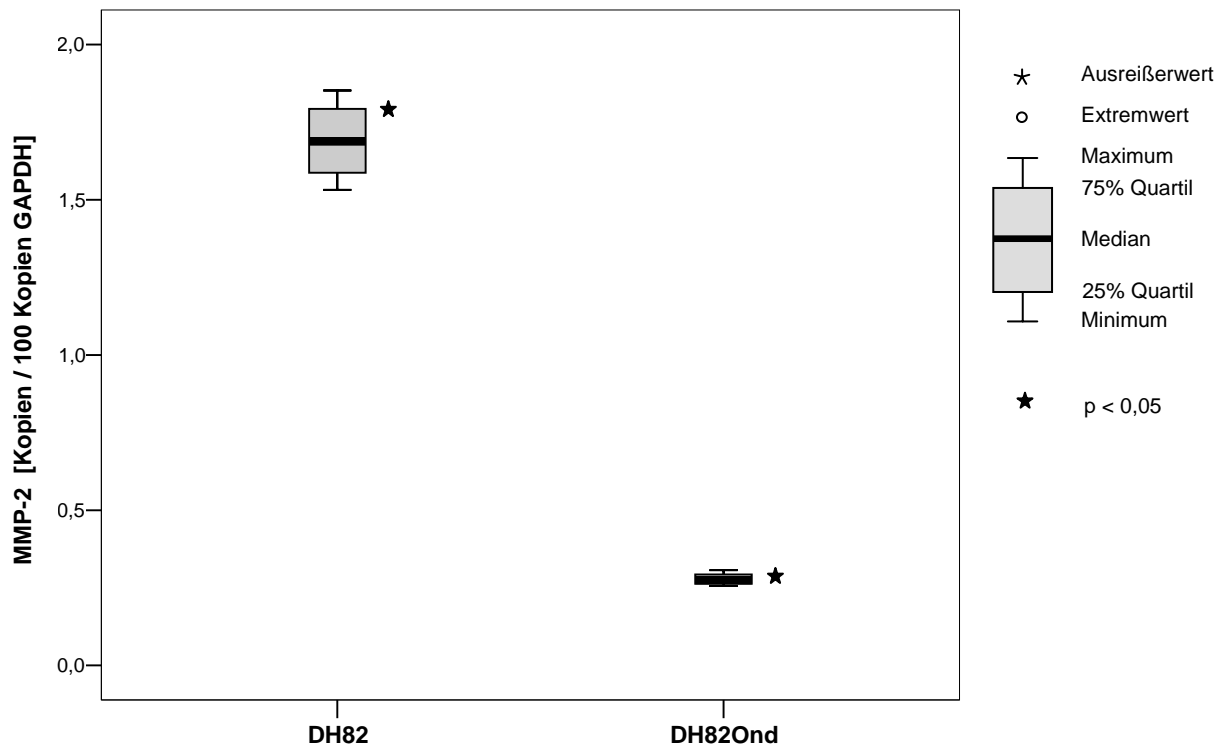
In allen untersuchten Proben war die mRNA aller untersuchten Gene (MMP-2, MMP-9, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, RECK) nachweisbar.

##### 4.1.2.1 MMP-2

MMP-2-mRNA war in den nicht infizierten DH82-Zellen statistisch signifikant höher exprimiert als in den persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen ( $p = 0,0304$ ). Dabei lag der Median der nicht infizierten Zellen mit 1,69 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 1,53 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 1,85 Kopien / 100 Kopien GAPDH) um das 6,3fache höher als bei den persistierend Staupevirus-

infizierten DH82-Zellen mit einem Median von 0,27 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,26 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,31 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Abb. 3).

**Abb. 3:** MMP-2-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen.



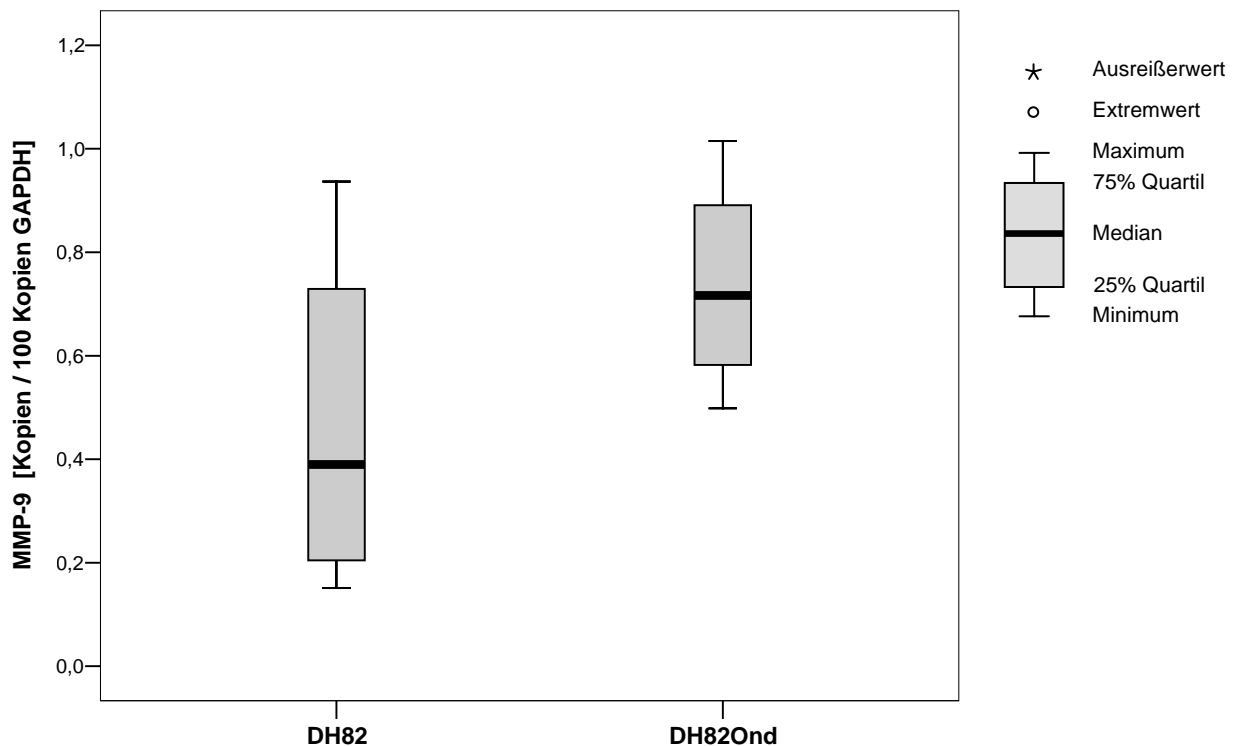
DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.1.2.2 MMP-9

Bei der MMP-9-mRNA-Expression ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen ( $p = 0,3123$ ). Der Median der nicht infizierten DH82-Zellen lag bei 0,39 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,15 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,94 Kopien / 100 Kopien GAPDH), derjenige der persistierend Staupevirus-infizierten DH82-

Zellen bei 0,72 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,5 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 1,02 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Abb. 4).

**Abb. 4:** MMP-9-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen



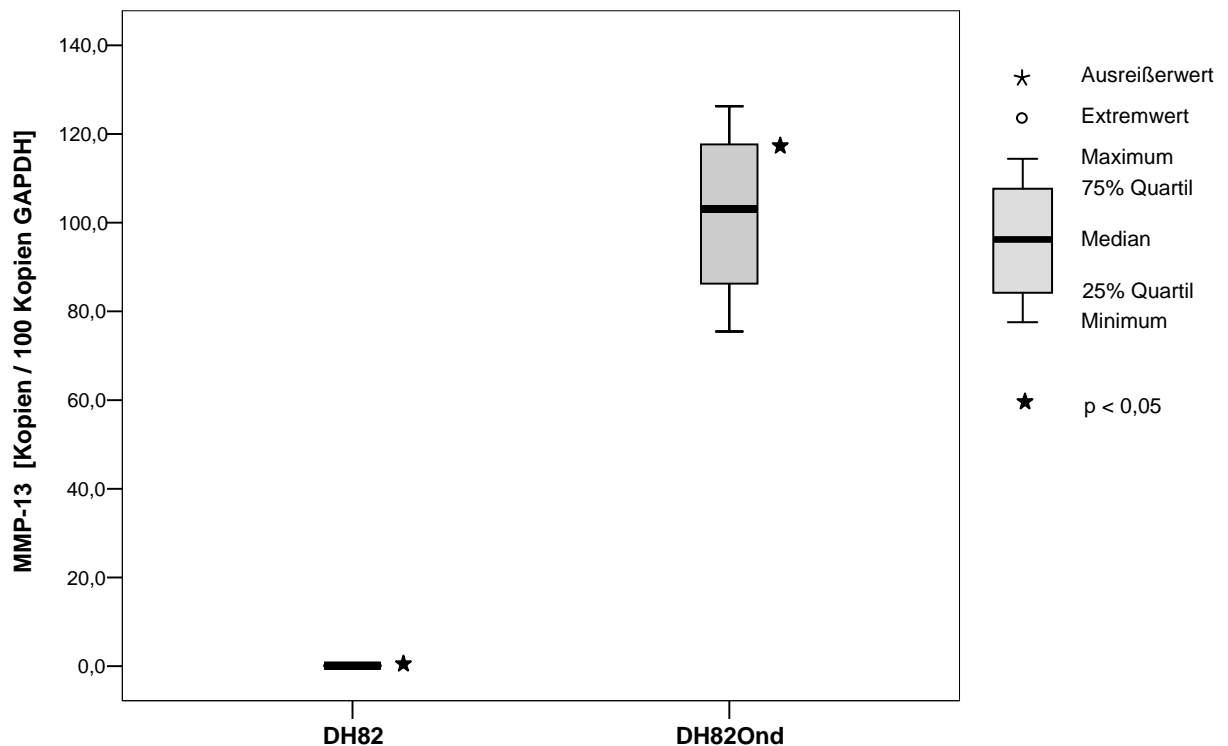
DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen

#### 4.1.2.3 MMP-13

Bei den persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen war die MMP-13-mRNA-Expression mit einem Median von 103,09 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 75,45 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 126,23 Kopien / 100 Kopien GAPDH) signifikant höher als bei nicht infizierten DH82-Zellen, die einen Median von 0,12 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,06 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,21 Kopien / 100 Kopien GAPDH) aufwiesen ( $p = 0,0304$ ). Folglich war in den

persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen eine 859fache Aufregulation der MMP-13-mRNA-Expression zu verzeichnen (Abb. 5).

**Abb. 5:** MMP-13-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen.



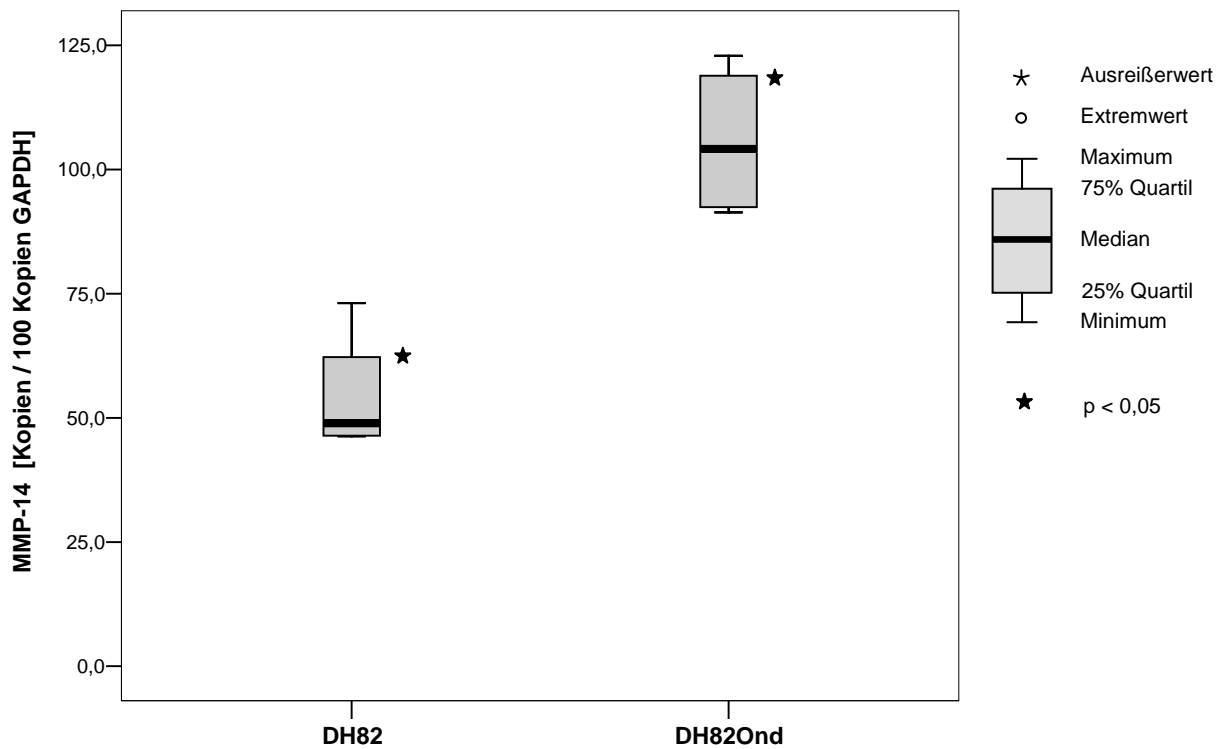
DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.1.2.4 MMP-14

Mit einem Median von 104,15 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 91,35 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 122,90 Kopien / 100 Kopien GAPDH) war die MMP-14-mRNA-Expression bei persistierend Staupevirus-infizierten Zellen signifikant höher als bei nicht infizierten DH82-Zellen mit einem Median von 48,93 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 46,30 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 73,10 Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0304$ ). Somit lag eine um das 2,1fache erhöhte

MMP-14-mRNA-Expression in den persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen verglichen mit nicht infizierten Zellen vor (Abb. 6).

**Abb. 6:** MMP-14-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen.



DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

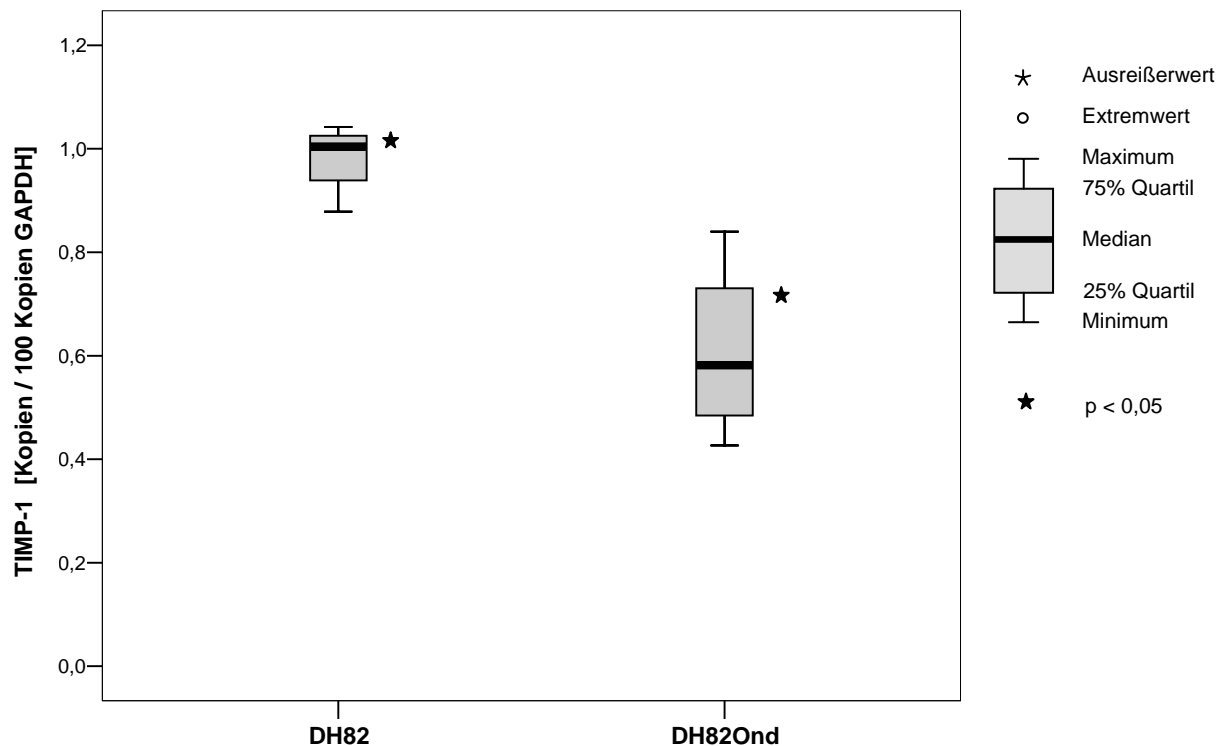
#### 4.1.2.5 TIMP-1

Die Expression der TIMP-1-mRNA war bei den persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen signifikant niedriger als bei den nicht infizierten DH82-Zellen ( $p = 0,0304$ ). Dabei lag der Median der nicht infizierten Zellen bei 1,00 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,88 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 1,04 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und derjenige der persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen bei 0,58 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,43 Kopien / 100 Kopien



GAPDH; Maximum 0,84 Kopien / 100 Kopien GAPDH), so dass eine Reduktion um das 1,7fache zu verzeichnen war (Abb. 7).

**Abb. 7:** TIMP-1-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen.



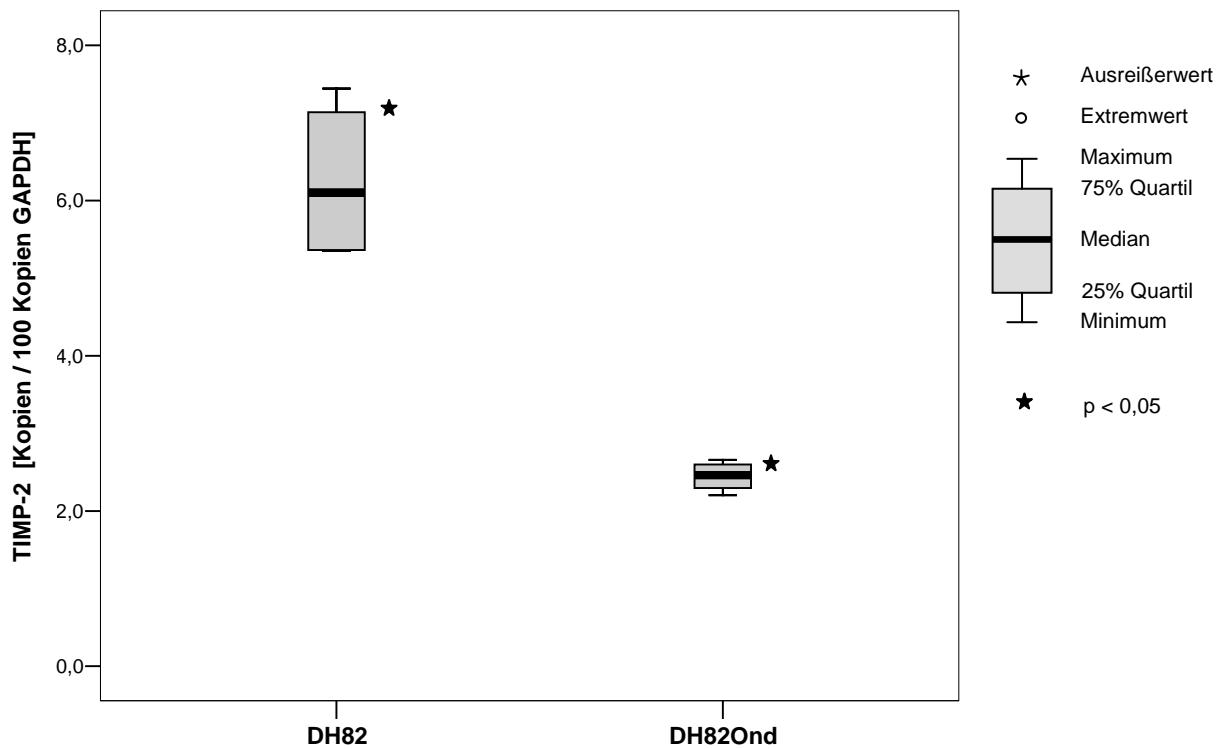
DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.1.2.6 TIMP-2

TIMP-2-mRNA war in den nicht infizierten DH82-Zellen signifikant höher exprimiert als bei den persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen ( $p = 0,0304$ ). Bei den nicht infizierten DH82-Zellen lag der Median bei 6,1 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 5,35 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 7,44 Kopien / 100 Kopien GAPDH). Im Vergleich dazu lag der Median der persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen um das 2,5fache niedriger bei 2,46 Kopien / 100 Kopien GAPDH

(Minimum 2,20 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 2,66 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Abb. 8).

**Abb. 8:** TIMP-2-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen.

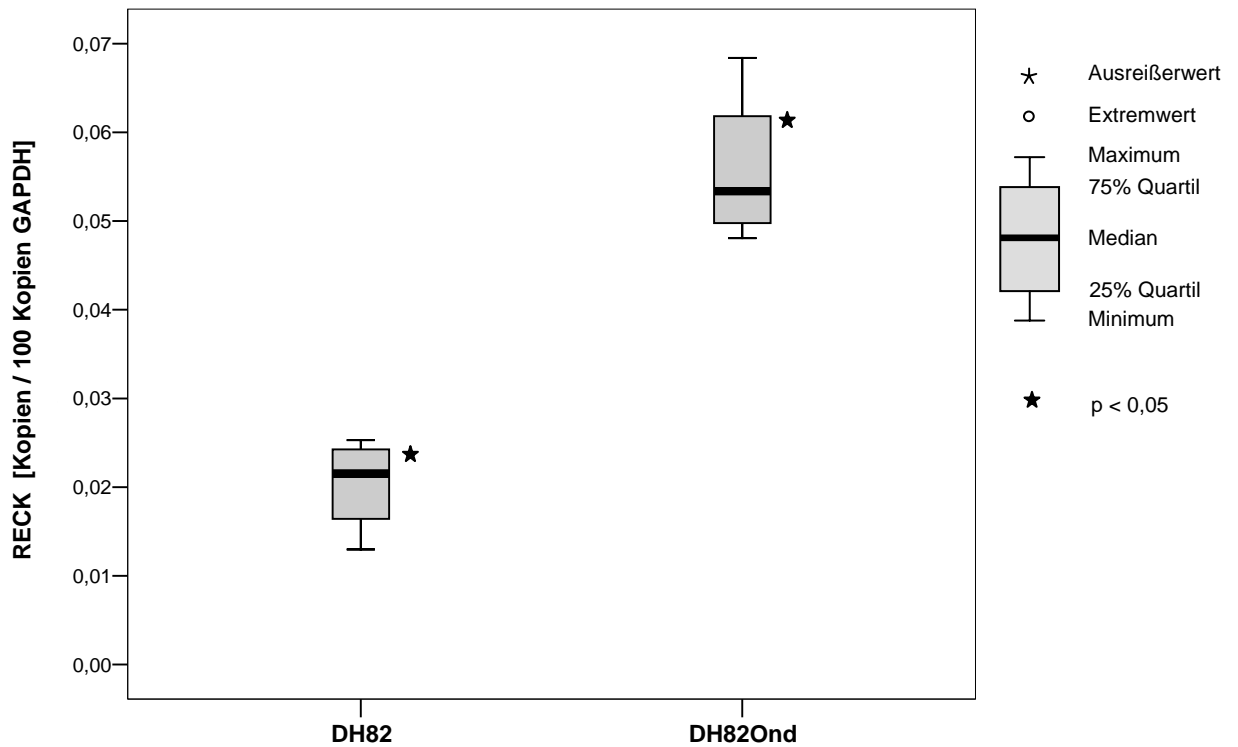


DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.1.2.7 RECK

Die RECK-mRNA-Expression der nicht infizierten DH82-Zellen lag mit einem Median von 0,02 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,01 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,03 Kopien / 100 Kopien GAPDH) um das 2,5fache niedriger als bei den persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen (Median 0,05 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,05 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,07 Kopien / 100 Kopien GAPDH). Diese Reduktion war statistisch signifikant ( $p = 0,0304$ ; Abb. 9).

**Abb. 9:** RECK-mRNA-Expression bei nicht infizierten und persistierend Staupevirus-infizierten DH82-Zellen.



DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend Staupevirus- (Stamm Onderstepoort) infizierte DH82-Zellen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

## 4.2 *In vivo* - Hauptversuch

### 4.2.1 Pathologisch-histologische Befunde

#### 4.2.1.1 Histochemische Befunde

Bei den Kontrolltieren ergaben sich mittels HE- und LFB-KV-Färbungen abgesehen von einer geringgradigen, akuten, leptomeningealen Stauungshyperämie keine pathomorphologischen Veränderungen der untersuchten Kleinhirn-Gefrierschnitte.

Anhand HE- und LFB-KV-gefärbter Kleinhirnschnitte wurde die Klassifizierung der einzelnen Läsionstypen der Staupevirus-infizierten Hunde durchgeführt. Die Läsionen waren mehrheitlich in der weißen Substanz lokalisiert. Dort befanden sie sich vorwiegend im Marklager und in den Kleinhirnlamellen. Außer dem Kleinhirn lagen vereinzelt Anteile des Stammhirns auf den Schnitten mit zur Beurteilung vor. Dort waren, vorwiegend in den periventrikulären Gebieten, ebenfalls vereinzelt Läsionen, vor allem bei chronisch-entzündlichen Plaques, nachweisbar.

Akute Läsionen waren durch das Auftreten aktivierter Astrozyten (Gemistozyten) charakterisiert. Darüber hinaus wiesen einige der Tiere lediglich eine geringgradige, akute, leptomeningeale Stauungshyperämie auf. Die LFB-KV-Färbung ergab keine verminderte Anfärbbarkeit der Myelinscheiden.

In den subakuten, nicht entzündlichen Läsionen waren, außer den schon in den akuten Läsionen zu beobachtenden Gemistozyten, fokale geringgradige Astrogliosen, Vakuolisierungen und Gitterzellen nachweisbar. In diesen Lokalisationen war eine graduell variierende, reduzierte Anfärbbarkeit der Myelinscheiden in der LFB-KV-Färbung vorhanden und demnach eine Demyelinisierung vorhanden.

Gleichartige Befunde waren bei den subakuten, entzündlichen Läsionen zu erheben, bei denen als Ausdruck der Entzündung, geringgradige, perivaskuläre Akkumulationen von Lymphozyten und wenigen Makrophagen vorlagen. Weiterhin lagen vereinzelt intranukleäre und / oder zytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörperchen vom Typ Cowdry A, selten auch vom Typ Cowdry B, vor.

Die chronischen, entzündlichen Läsionen wiesen identische Charakteristika auf wie die subakuten, entzündlichen Läsionen. Es lag lediglich ein deutlich ausgeprägteres, perivaskuläres, lympho-histiozytäres Infiltrat vor.

Aufgrund dessen wurden die subakuten und chronischen, entzündlichen Läsionen zur Gruppe der entzündlichen Läsionen subsumiert.

#### **4.2.1.2 Immunhistologische Befunde**

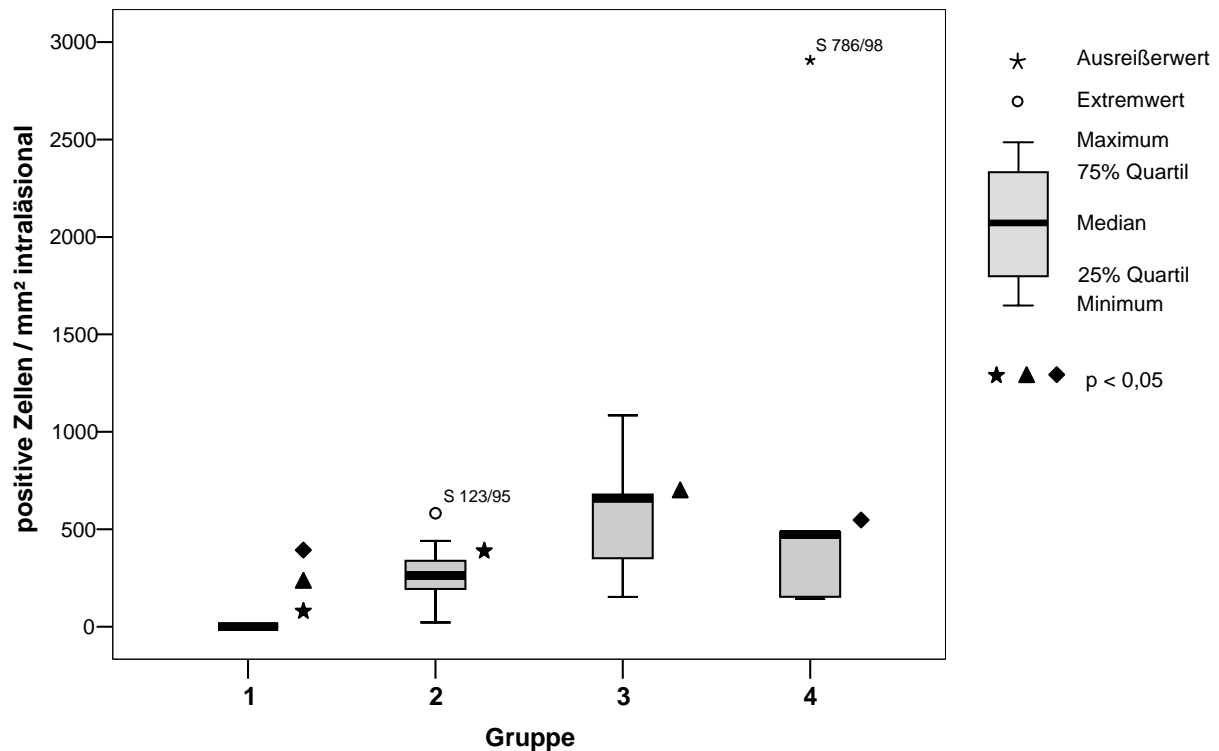
##### **4.2.1.2.1 Immunhistologischer Nachweis von Staupevirus-Nukleoprotein**

In den Kleinhirnen der Kontrollhunde konnte mittels Immunhistologie Staupevirus-Nukleoprotein nicht nachgewiesen werden.

Die Staupevirus-infizierten Hunde wiesen im Kleinhirn in der Regel Staupevirus-Antigen in zahlreichen Zellen vor allem der weißen, aber auch der grauen Substanz auf. Das Virusantigen stellte sich als feingranuläres bis grobscholliges, mittel- bis dunkelbraunes Präzipitat vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert dar. Die intranukleären Einschlusskörperchen wiesen ebenfalls eine positive Markierung auf. Die Mehrzahl der positiv markierten Zellen bestand aus Astrozyten, aber es waren auch positive Reaktionen in Neuronen, Endothelzellen / Perizyten und Mikrogliazellen vorhanden.

Der Staupevirus-Antigengehalt war deutlichen, individuellen Schwankungen unterworfen und wies keine signifikanten Differenzen zwischen den Läsionsstadien auf. Der Median der Hunde mit akuten Herden lag bei 264 positiven Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 23 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 582 positive Zellen / mm<sup>2</sup>). In den subakuten Plaques war der Median bei 660 positiven Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 153 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 1085 positive Zellen / mm<sup>2</sup>) und in den entzündlichen Läsionen bei 473 positiven Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 144 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 2907 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Abb. 10).

**Abb. 10:** Anzahl Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen positiver Zellen / mm<sup>2</sup> in den unterschiedlichen Gruppen.



1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

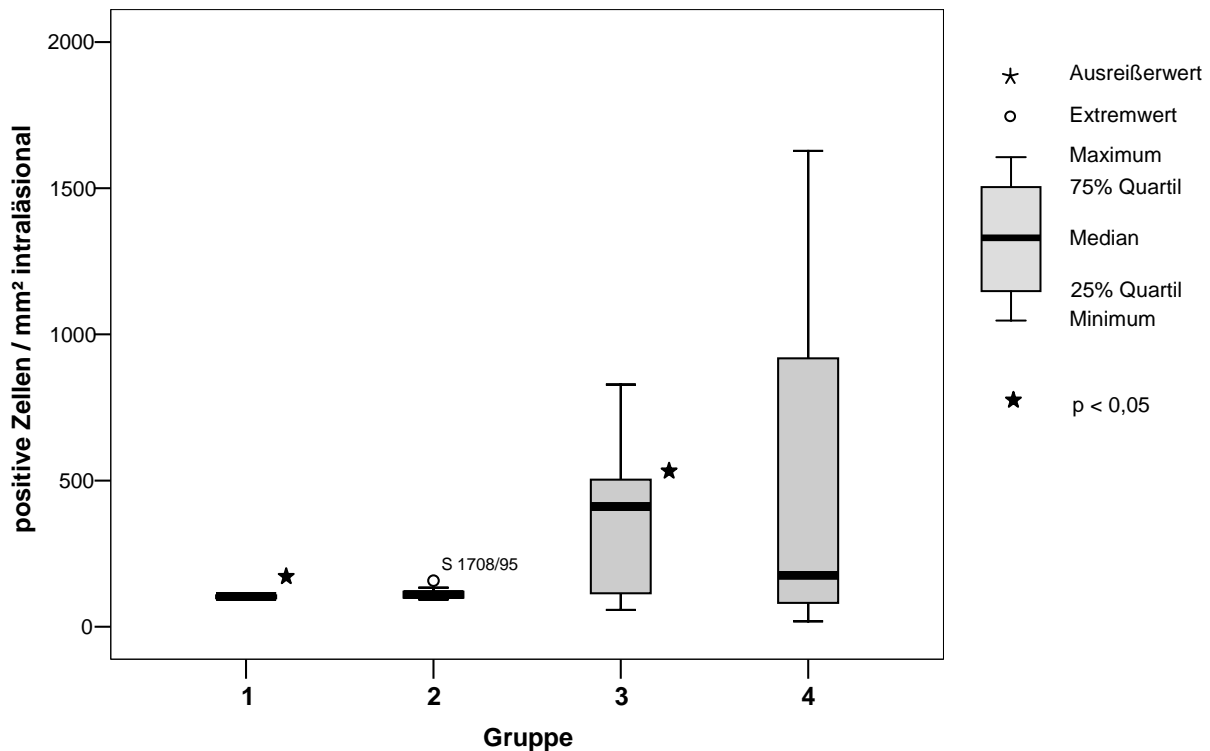
#### 4.2.1.2.2 Immunhistologischer Nachweis von GFAP

Die Kleinhirne aller untersuchten Hunde wiesen eine gering- bis mittelgradige Anzahl diffus verteilter, GFAP-positiver Astrozyten mit einem regelmäßigen Ausläufernetzwerk auf. Dabei handelte es sich um fibrilläre, langstrahlige Astrozyten, die ein feingranuläres, dunkelbraunes Farbsignal sowohl in ihrem Zytoplasma als auch in ihren Ausläufern zeigten und überwiegend in der weißen Substanz lokalisiert waren. Weiterhin konnte ein derartiges Farbsignal auch in einzelnen, subpial gelegenen, protoplasmatischen Astrozyten mit kurzen Ausläufern nachgewiesen werden.

Die Staupevirus-infizierten Hunde zeigten eine mit dem Alter der Läsionen ansteigende, intra- und periläsionale Anhäufung GFAP-positiver Zellen (Astrozyten), resultierend in der stärksten Ausprägung der Astrogliose in den subakuten und chronischen Herden. Bei den chronischen Herden (der Gruppe 4 zugehörig) fiel eine Akzentuierung der positiv markierten Zellen in der Peripherie der Läsion und periläsional auf, wohingegen das Läsionszentrum relativ wenige Astrozyten enthielt. Die regelmäßig auftretenden Gemistozyten wurden ebenfalls positiv markiert.

Im Median wiesen die Kontrollhunde 104 positive Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 93 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 109 positive Zellen / mm<sup>2</sup>) auf. Bei den Tieren der Gruppe 2 mit akuten Läsionen fanden sich im Median 93 positive Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 93 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 158 positive Zellen / mm<sup>2</sup>), bei den Tieren mit subakuten Plaques 411 positive Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 57 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 828 positive Zellen / mm<sup>2</sup>) und bei den entzündlichen Herden 176 positive Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 19 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 1628 positive Zellen / mm<sup>2</sup>). Statistisch ergab sich dadurch eine signifikante Zunahme der GFAP-Antigen positiven Zellen von den Kontrollhunden zu den Tieren mit subakuten Läsionen ( $p = 0,0454$ ; Abb. 11).

**Abb. 11:** Immunhistologisch bestimmte Anzahl GFAP-Antigen positiver Zellen / mm<sup>2</sup> in den unterschiedlichen Gruppen.



1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

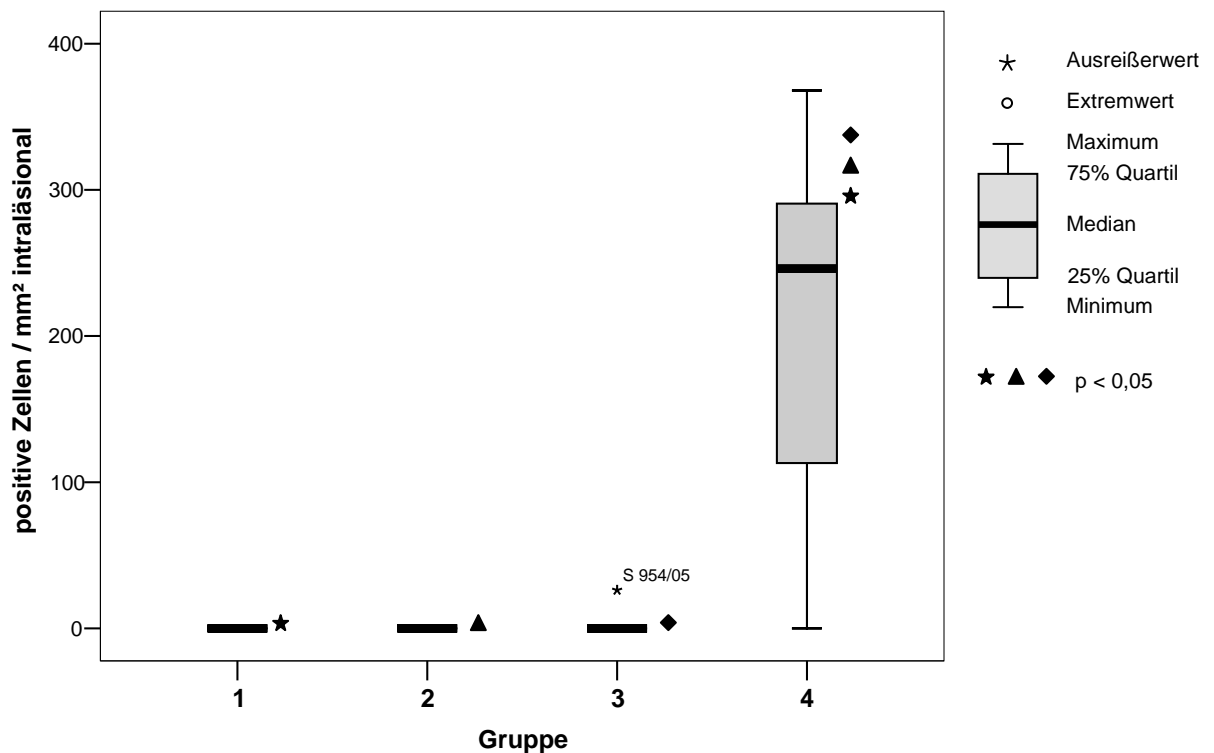
#### 4.2.1.2.3 Immunhistologischer Nachweis von CD3

Das CD3-Antigen stellte sich in positiv markierten Zellen als ein hell- bis mittelbraunes, fein- bis grobscholliges, zytoplasmatisches Präzipitat dar. Bei den Kontrollhunden konnten keine CD3-Antigen positiven Zellen detektiert werden. Die Tiere mit akuten und subakuten Läsionen wiesen wenige, in der weißen Substanz und den Meningen lokalisierte, positiv markierte Zellen auf. Die Hunde mit entzündlichen Herdveränderungen zeigten im Median intraläsional 246 positive Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 0 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 368 positive Zellen / mm<sup>2</sup>). Damit war die Expression signifikant höher als bei den Kontrolltieren ( $p = 0,0056$ )



und den Hunden mit akuten ( $p = 0,004$ ) oder subakuten nicht entzündlichen ( $p = 0,0285$ ) Läsionen (Abb. 12).

**Abb. 12:** Immunhistologisch bestimmte Anzahl CD3-Antigen positiver Zellen /  $\text{mm}^2$  in den unterschiedlichen Gruppen.



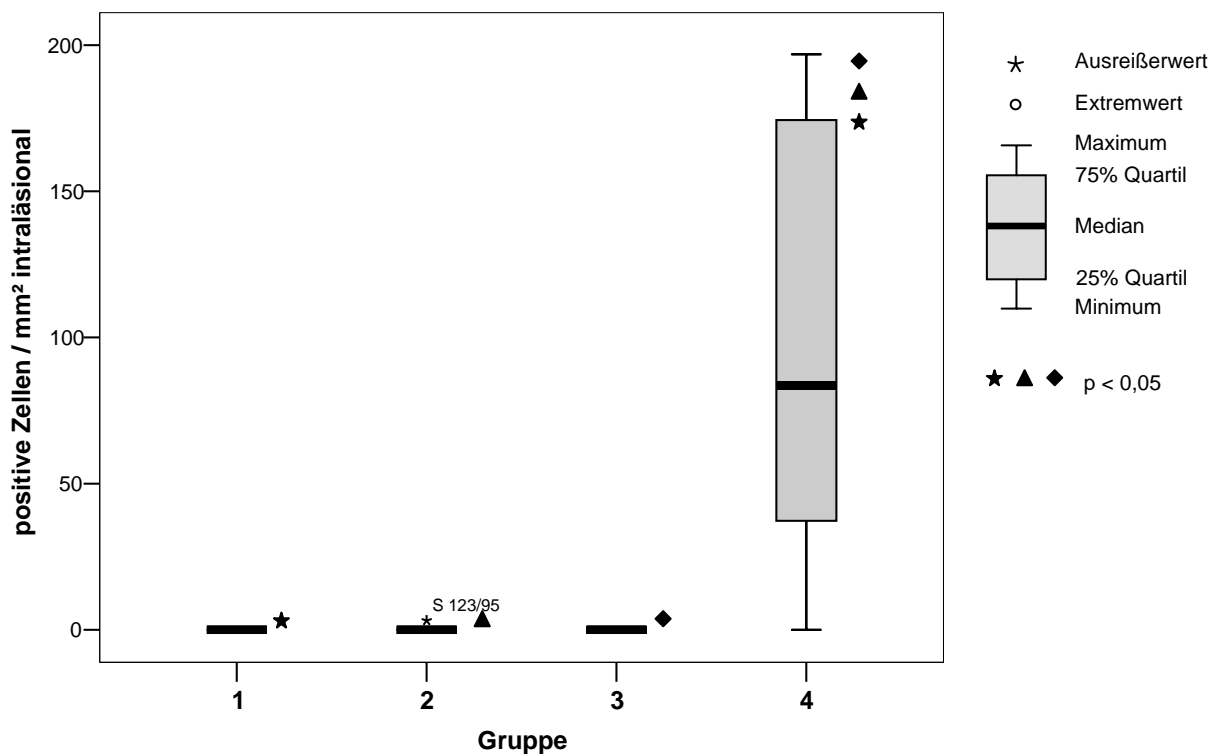
1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.2.1.2.4 Immunhistologischer Nachweis von CD21

CD21-Antigen positive Zellen waren in der Immunhistologie durch ein meist zellmembrangebundenes, mittelbraunes Präzipitat gekennzeichnet. Bei den Kontrolltieren und den Hunden mit akuten oder subakuten Herden waren keine CD21-Antigen positiven Zellen nachweisbar. Die Tiere mit entzündlichen Läsionen wiesen innerhalb der Plaques ein überwiegend perivaskulär akzentuiertes Verteilungsmuster CD21-Antigen positiver Zellen auf. Dabei fanden sich intraläsional

im Median 84 positive Zellen / mm<sup>2</sup> (Minimum 0 positive Zellen / mm<sup>2</sup>; Maximum 368 positive Zellen / mm<sup>2</sup>) und damit statistisch signifikant mehr positiv markierte Zellen als in allen anderen Gruppen (Gruppe 1: p = 0,0056; Gruppe 2: p = 0,0013; Gruppe 3: p = 0,0150; Abb. 13).

**Abb. 13:** Immunhistologisch bestimmte Anzahl CD21-Antigen positiver Zellen / mm<sup>2</sup> in den unterschiedlichen Gruppen.



1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen den einzelnen Gruppen.

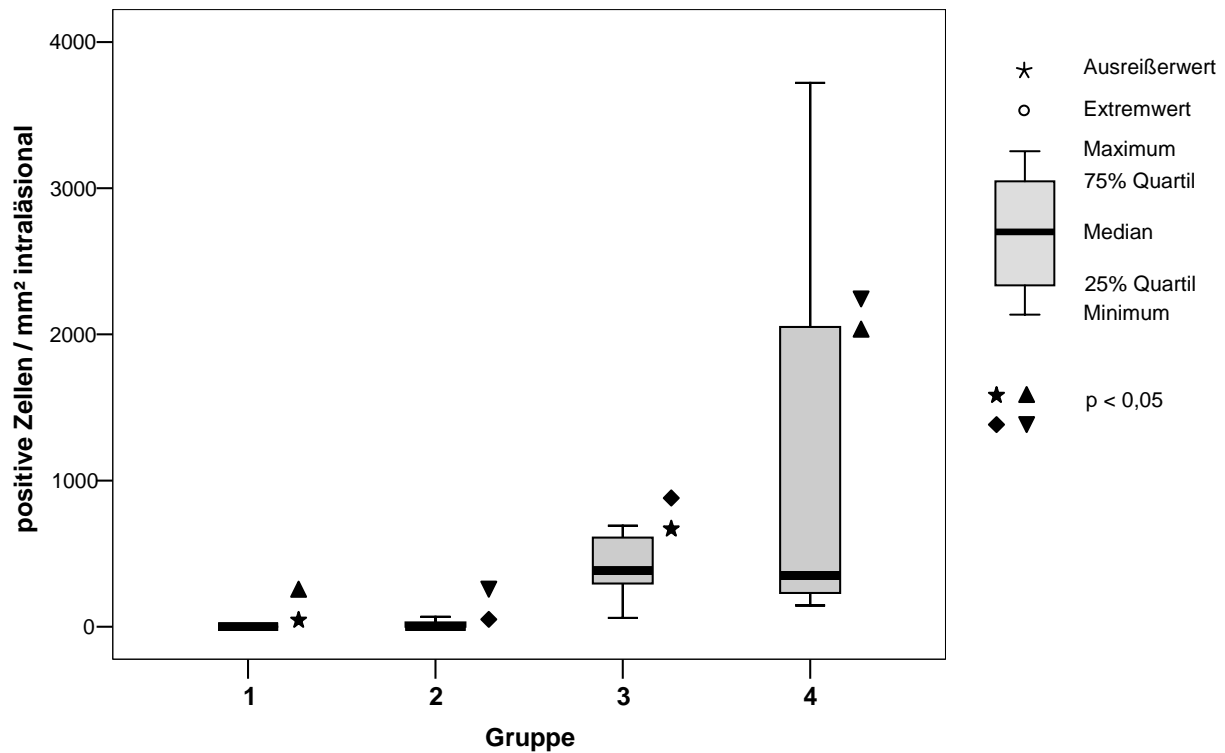
#### 4.2.1.2.5 Lektin histochemischer Nachweis von BS-1

In BS-1 positiven Zellen stellte sich das Signal als zytoplasmatisch lokalisiertes, mittel- bis dunkelbraunes, relativ grobscholliges Präzipitat dar.

In den Kleinhirnen der Kontrollhunde war eine geringe Anzahl BS-1 positiver Zellen nachweisbar. Dabei handelte es sich vorwiegend um Endothelzellen, die dieses

Lektin exprimierten. Bei den Tieren mit akuten Staupeläsionen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollhunden. Es waren überwiegend Endothelzellen und nur wenige Makrophagen / Mikroglia positiv markiert. Bei den Tieren mit subakuten, nicht entzündlichen und entzündlichen Läsionen ergab sich eine deutliche erhöhte Anzahl positiver Makrophagen / Mikroglia. Diese Zunahme positiver Zellen war zwischen den Kontrolltieren und den Tieren der Gruppen 3 bzw. 4 statistisch signifikant (Gruppe 3:  $p = 0,0008$ ; Gruppe 4:  $p = 0,0017$ ), wobei der Median intraläsional in Gruppe 3 bei 383 positiven Zellen /  $\text{mm}^2$  (Minimum 60 positive Zellen /  $\text{mm}^2$ ; Maximum 690 positive Zellen /  $\text{mm}^2$ ) und in Gruppe 4 bei 350 positiven Zellen /  $\text{mm}^2$  (Minimum 145 positive Zellen /  $\text{mm}^2$ ; Maximum 3720 positive Zellen /  $\text{mm}^2$ ) lag. Desgleichen lag eine statistisch signifikante Zunahme der Anzahl BS-1 positiver Zellen von den Tieren mit akuten Läsionen zu den Hunden mit subakuten nicht entzündlichen bzw. entzündlichen Herden vor (Gruppe 3:  $p = 0,0005$ ; Gruppe 4:  $p = 0,0013$ ; Abb. 14). In den subakuten und entzündlichen Plaques waren die positiv markierten Zellen vor allem intraläsional und periläsional lokalisiert. Eine ebenfalls positive Markierung war in den Gitterzellen nachweisbar. Die positive Signalgebung der Endothelzellen unterschied sich nicht wesentlich von den Kontrolltieren und den Tieren mit akuten Läsionen.

**Abb. 14:** Lektin histochemisch bestimmte Anzahl BS-1 positiver Zellen / mm<sup>2</sup> in den unterschiedlichen Gruppen.



1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

## 4.2.2 RT-PCR

### 4.2.2.1 Konventionelle qualitative RT-PCR

Für die Gene MMP-2, MMP-12, MMP-13 und RECK sowie für das „house-keeping“ Gen GAPDH wurden die Reaktionsbedingungen für die qualitative PCR etabliert. Die Reaktionsbedingungen für MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 und Staupevirus-Nukleoprotein waren bereits etabliert und wurden aus der Literatur übernommen (FRISK et al., 1999; BARNES et al., 2000). Die Grundlage für die Etablierung stellten nicht infizierte DH82-Zellen, persistierend Staupevirus-infizierte DH82-Zellen und MDCK-Zellen dar (s. Pilotstudie, Kapitel 4.1).

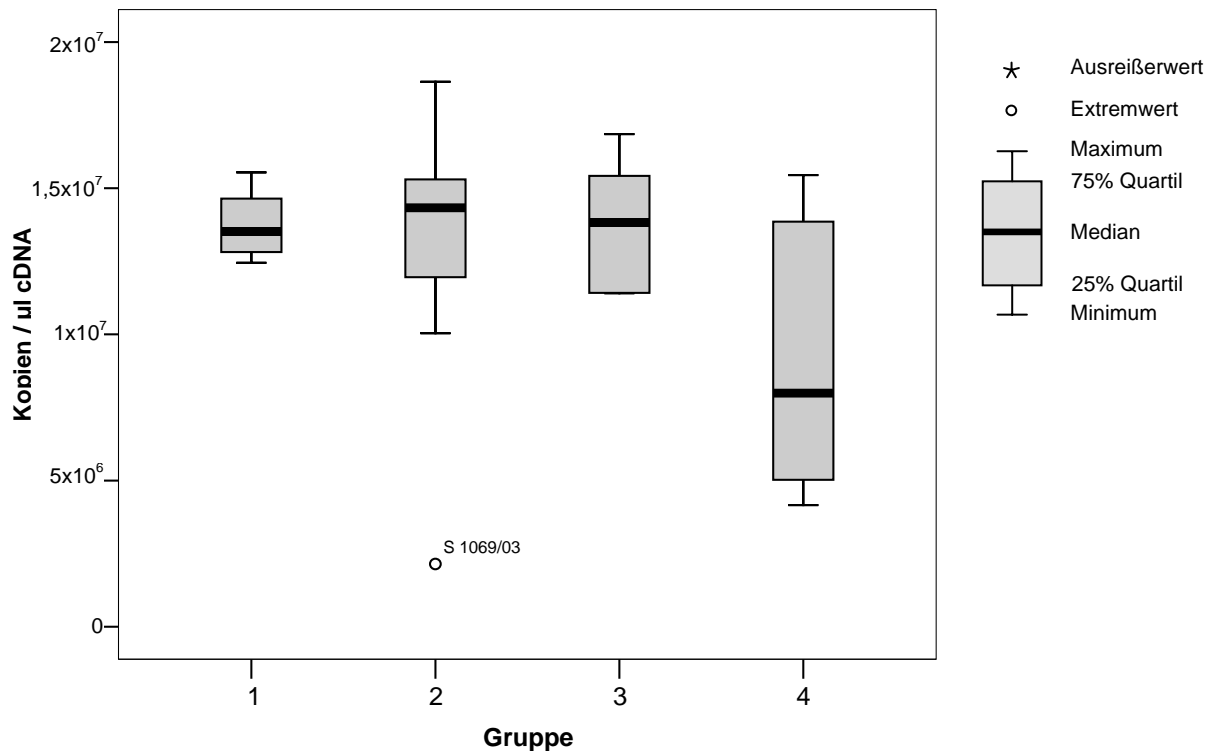
### 4.2.2.2 Quantitative-RT-PCR

Die Reaktionsbedingungen der quantitativen PCR wurden für die Gene MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, RECK, Staupevirus-Nukleoprotein und GAPDH etabliert (s. Pilotstudie, Kapitel 4.1). Die normalisierten mRNA-Gehalte für jedes Tier sowie die p-Werte im Wilcoxon-Rangsummentest für die gruppenweisen Vergleiche sind dem Anhang (Kapitel 9.4; Tab.12-15) zu entnehmen.

#### 4.2.2.2.1 Nachweis von GAPDH- und Staupevirus-mRNA

Bei allen Tieren war GAPDH-mRNA nachweisbar. Dabei ergaben sich weder signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Staupevirus-infizierten Tieren (Gruppe 1 mit 2:  $p=0,7074$ ; Gruppe 1 mit 3:  $p= 0,9495$ ; Gruppe 1 mit 4:  $p = 0,1615$ ) noch zwischen den einzelnen Läsionstypen der infizierten Tiere untereinander (Gruppe 2 mit 3:  $p = 0,9015$ ; Gruppe 2 mit 4:  $p = 0,0909$ ; Gruppe 3 mit 4:  $p = 0,1282$ ; Abb. 15).

**Abb. 15:** GAPDH-mRNA-Expression in den unterschiedlichen Gruppen, dargestellt als Kopien /  $\mu\text{l}$  cDNA



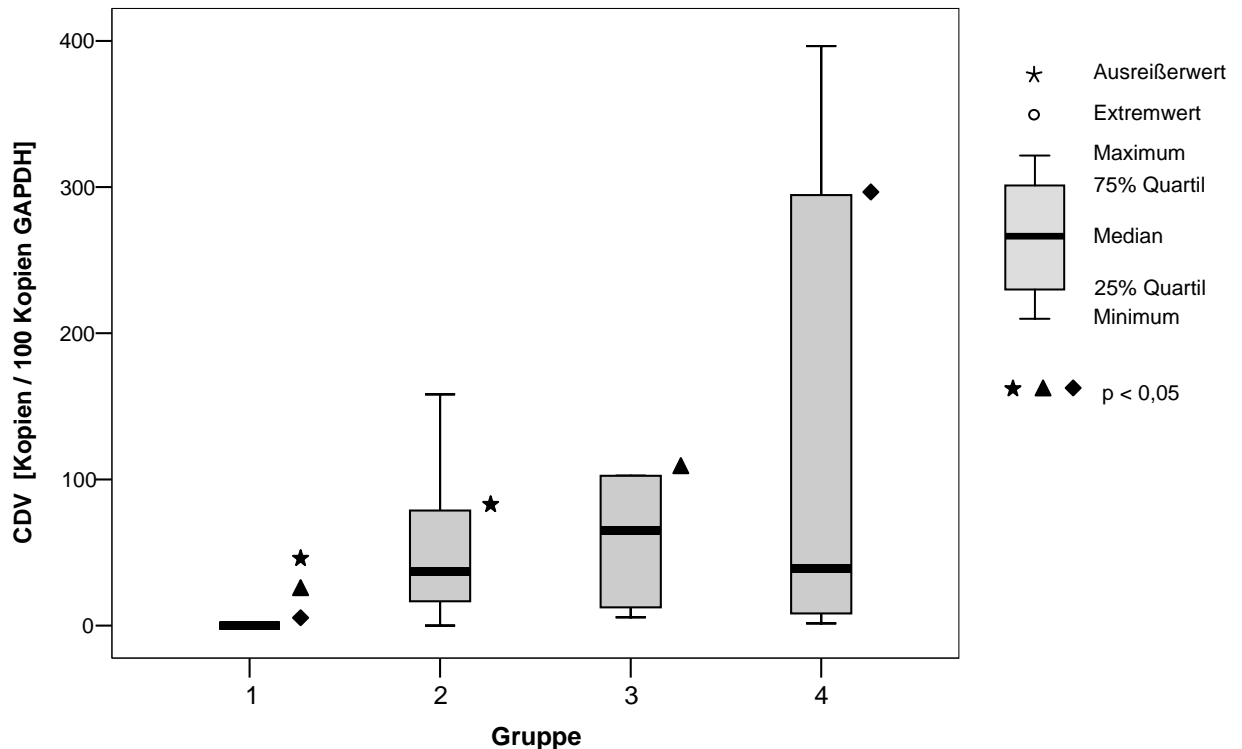
1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen

Bei keinem der Kontrollhunde war Staupevirus-mRNA nachweisbar. Die Staupevirusinfektion der erkrankten Tiere wurde durch den Nachweis von Staupevirus-mRNA verifiziert. Der Staupevirus-mRNA-Gehalt unterlag starken Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren, wobei die Gruppenzugehörigkeit keinen signifikanten Einfluss aufwies (Gruppe 2 mit 3:  $p = 0,5919$ ; Gruppe 2 mit 4:  $p = 0,8366$ ; Gruppe 3 mit 4:  $p = 0,8102$ ). Der Staupevirus-mRNA-Gehalt lag zwischen 0,03 Kopien / 100 Kopien GAPDH (S 33/05) und 686,27 Kopien / 100 Kopien GAPDH (S 2015/91).

In der Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen lag der Median bei 37,16 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,03 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 158,21 Kopien / 100 Kopien GAPDH), bei den Hunden mit subakuten Herden bei 64,93 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 5,70 Kopien / 100 Kopien GAPDH;

Maximum 686,27 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und bei den Tieren mit entzündlichen Plaques bei 39,25 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 1,52 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 396,50 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Abb. 16).

**Abb. 16:** CDV-mRNA-Expression in den unterschiedlichen Gruppen



1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

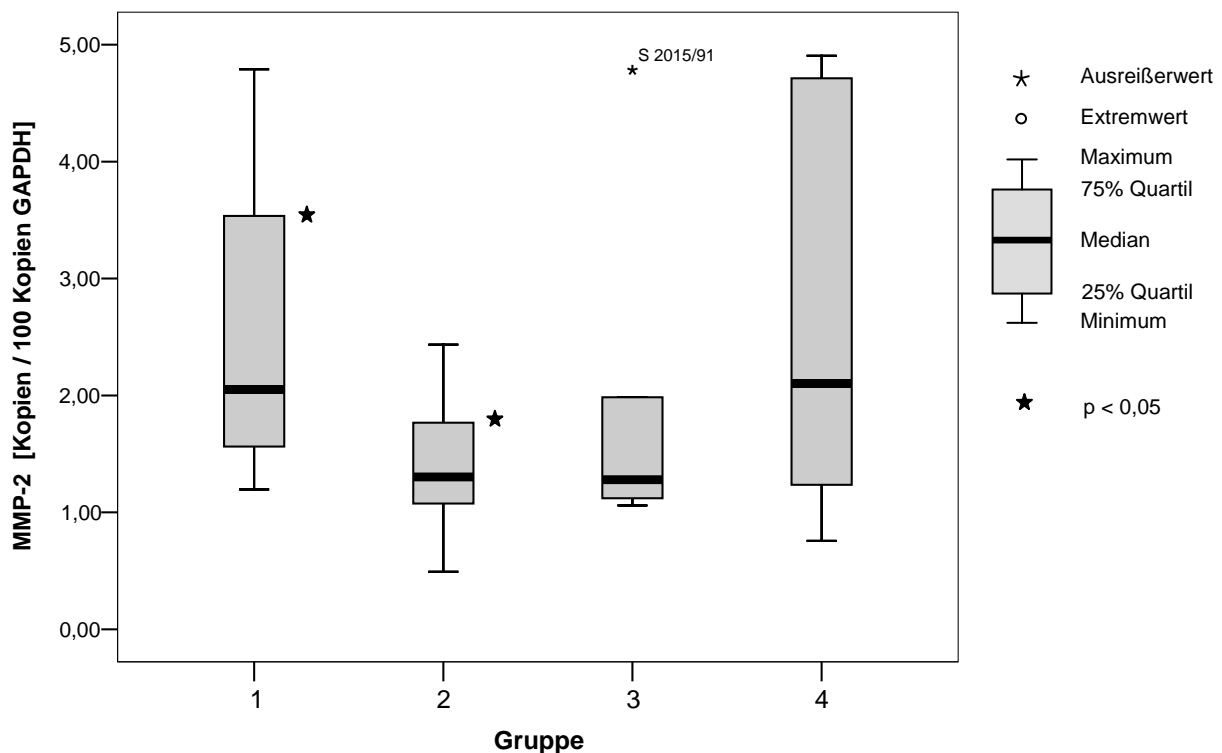
#### 4.2.2.2.2 Nachweis von MMP-, TIMP- und RECK-mRNA

##### 4.2.2.2.2.1 MMP-2

MMP-2-mRNA war bei allen untersuchten Hunden nachweisbar. Der MMP-2-mRNA-Gehalt lag zwischen 0,49 Kopien / 100 Kopien GAPDH (S 1175/90) und 4,91 Kopien / 100 Kopien GAPDH (S 786/98). Bei der gruppenweisen Betrachtung der Werte fand

sich eine signifikante Herabregulierung ( $p = 0,0316$ ) zwischen den Kontrolltieren (Median 2,05 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 1,20 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 4,79 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und den Tieren mit akuten Staupeläsionen (Median: 1,30 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,49 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 2,44 Kopien / 100 Kopien GAPDH). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollhunden und Tieren mit subakuten (Median: 1,28 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 1,06 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 4,78 Kopien / 100 Kopien GAPDH) oder entzündlichen (Median: 2,10 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,76 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 4,91 Kopien / 100 Kopien GAPDH) Läsionen sowie zwischen Tieren mit akuten und subakuten bzw. entzündlichen Kleinhirnveränderungen (Abb. 17).

**Abb. 17:** MMP-2-mRNA-Expression bei in den unterschiedlichen Gruppen.



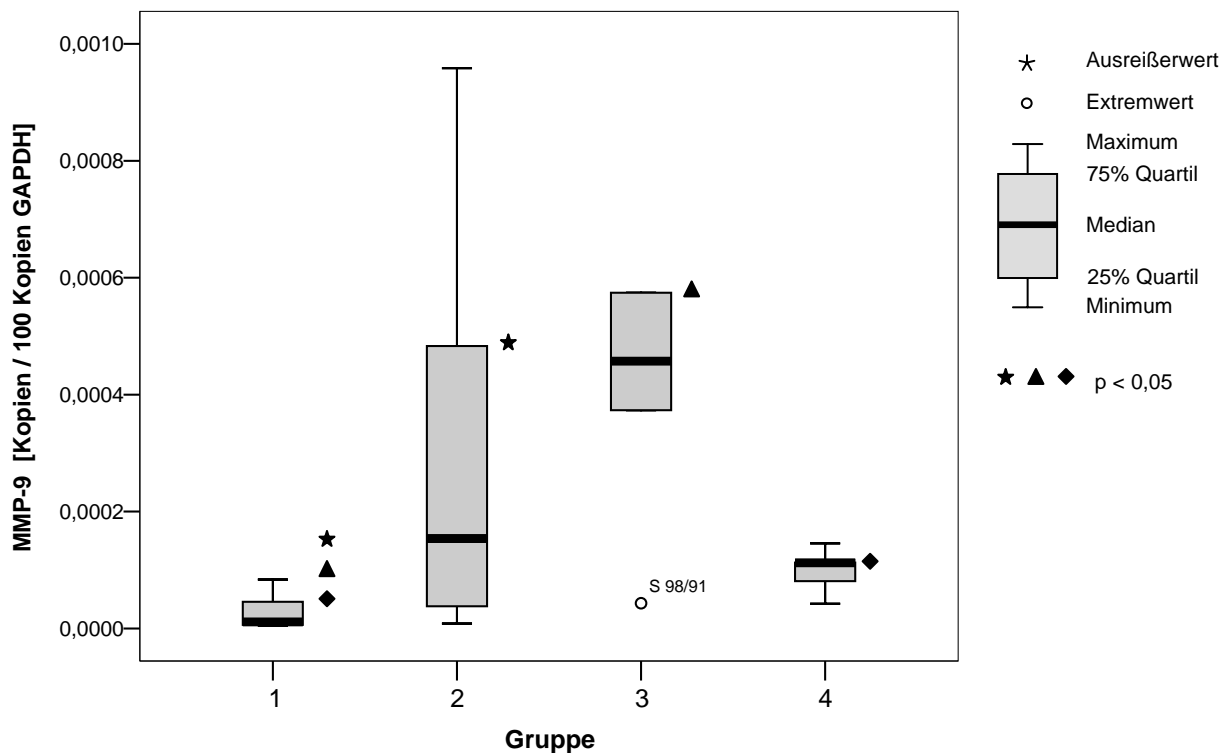
1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.



#### 4.2.2.2.2 MMP-9

MMP-9-mRNA war nicht bei allen untersuchten Tieren nachweisbar. Die Tiere, die keine messbaren MMP-9-mRNA-Gehalte aufwiesen, verteilten sich auf alle untersuchten Gruppen. Bei den Kontrolltieren war bei 1 von 8 (V 259/05), bei den Tieren mit akuten Staupeläsionen bei 3 von 14 (S 1175/90; S 1069/03; S 842/04) und bei Tieren mit subakuten bzw. entzündlichen Staupeläsionen bei jeweils 1 von 6 (S 58/05; S 2290/90) Tieren keine MMP-9-mRNA nachweisbar.

Alle Gruppen Staupevirus-infizierter Tiere wiesen gegenüber den Kontrolltieren (Median  $1,12 \times 10^{-5}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum  $4,81 \times 10^{-6}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum  $8,39 \times 10^{-5}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH) einen signifikant erhöhten MMP-9-mRNA-Gehalt auf. Der höchste MMP-9-mRNA-Gehalt war in der Gruppe der Hunde mit subakuten Staupeläsionen (Median  $4,58 \times 10^{-4}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum  $4,31 \times 10^{-5}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum  $2,97 \times 10^{-3}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH) nachweisbar ( $p = 0,0149$ ). Der MMP-9-mRNA-Gehalt der Tiere mit akuten (Median  $1,54 \times 10^{-4}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum  $8,53 \times 10^{-6}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum  $1,57 \times 10^{-3}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH) und entzündlichen Läsionen (Median  $1,12 \times 10^{-4}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum  $4,26 \times 10^{-5}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum  $1,46 \times 10^{-4}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH) ähnelten einander und waren ebenfalls signifikant höher als bei den Kontrollhunden ( $p = 0,0185$  bzw.  $p = 0,023$ ). In der Gruppe der Tiere mit akuten bzw. subakuten Läsionen fanden sich ein, respektive zwei Tiere, die als Extrem-, bzw. Ausreißerwerte klassifiziert wurden, da sie um mehr als das 1,5fache bzw. 3fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot von dieser entfernt lagen. Bei den Tieren mit akuten Läsionen wurde der Messwert des Tieres mit der Nr. S 1708/95 ( $1,57 \times 10^{-3}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH) als Extremwert klassifiziert. Bei den Hunden mit subakuten Läsionen lagen die Messwerte jeweils eines Tieres deutlich oberhalb bzw. unterhalb der anderen ermittelten Werte. Bei dem Hund Nr. S 2015/91 war ein Wert von  $2,97 \times 10^{-3}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH nachweisbar, was als Ausreißerwert klassifiziert wurde. Mit einem Wert von  $4,31 \times 10^{-5}$  Kopien / 100 Kopien GAPDH lag der Messwert des Hundes mit der Nr. S 98/91 im Extremwertbereich (Abb. 18).

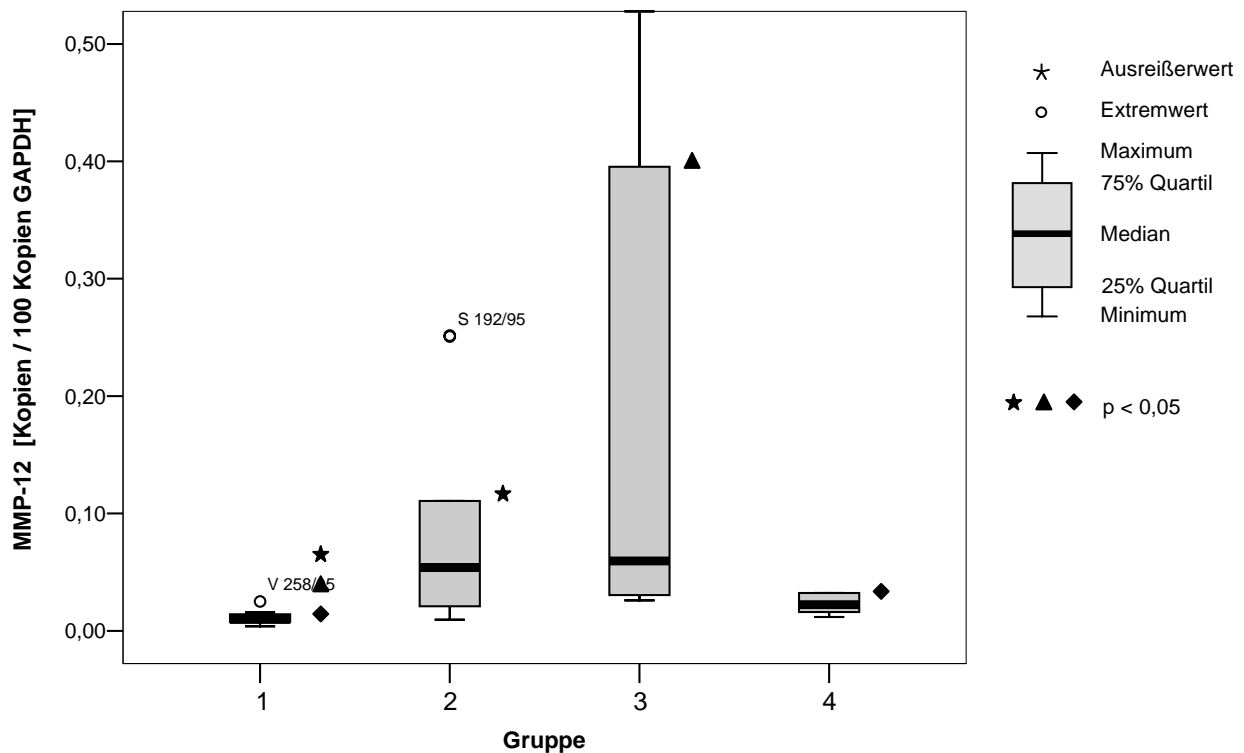
**Abb. 18:** MMP-9-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Staupeläsionen.

1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.2.2.2.3 MMP-12

Bei allen untersuchten Tieren war MMP-12-mRNA nachweisbar. Die Staupevirus-infizierten Tiere wiesen gegenüber den Kontrolltieren (Median 0,01 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,004 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,03 Kopien / 100 Kopien GAPDH) eine signifikante Erhöhung des MMP-12-mRNA-Gehaltes auf. Der höchste Gehalt war bei den Tieren mit subakuten Staupeläsionen (Median 0,06 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,03 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,87 Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0024$ ) zu verzeichnen. Ein geringerer Anstieg von den Kontrollhunden lag zu den Tieren mit akuten Läsionen (Median 0,05 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,01 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 5,83 Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0037$ ) und den

Hunden mit entzündlichen Läsionen (Median 0,02 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,01 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 1,50 Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0239$ ) vor (Abb. 19). Wie bei den MMP-9 Werten gab es auch bei MMP-12 deutliche Schwankungen der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen. Bei den Kontrolltieren lag der Messwert des Tieres mit der Nr. V 258/05 mit 0,03 Kopien / 100 Kopien GAPDH um mehr als das 1,5fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot von dieser entfernt und wurde deshalb als Extremwert klassifiziert. Bei den Tieren mit akuten Läsionen lagen die Werte der Hunde Nr. S 192/95 (0,25 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und S 979/95 (0,25 Kopien / 100 Kopien GAPDH) ebenfalls um mehr als das 1,5fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot von dieser entfernt und wurden ebenso als Extremwerte angesehen. Der Messwert des Tieres mit der Nr. S 1708/95 lag mit 5,83 Kopien / 100 Kopien GAPDH um mehr als das 3fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot von dieser entfernt und wurde aus diesem Grund als Ausreißerwert eingruppiert. Ein weiterer Extremwert war bei dem Tier Nr. S 1767/95 in der Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen mit 1,50 Kopien / 100 Kopien GAPDH zu verzeichnen.

**Abb. 19:** MMP-12-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Staupeläsionen.

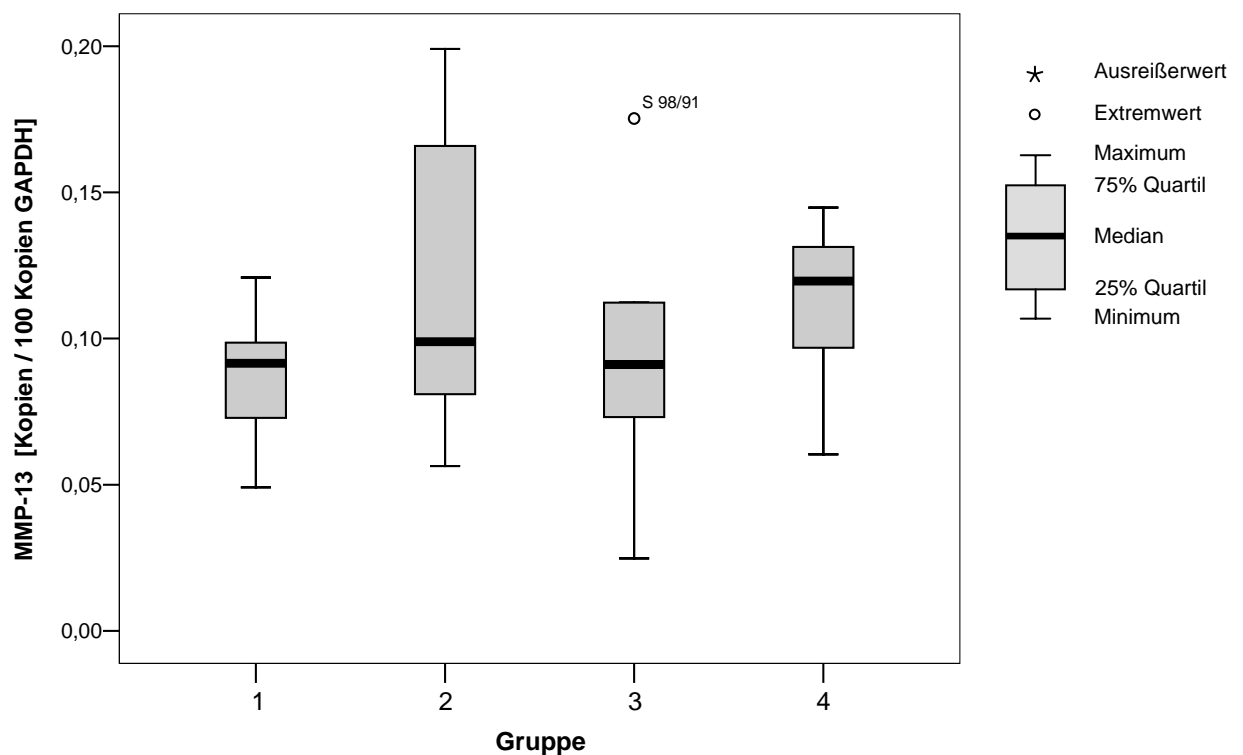
1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.2.2.2.4 MMP-13

MMP-13-mRNA war bei allen untersuchten Tieren nachweisbar. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Staupevirus-infizierten und Kontrolltieren (Gruppe 1 mit 2:  $p = 0,2601$ ; Gruppe 1 mit 3:  $p = 0,7469$ ; Gruppe 1 mit 4:  $p = 0,1066$ ) bzw. zwischen den einzelnen Gruppen Staupevirus-infizierter Tiere (Gruppe 2 mit 3:  $p = 0,3865$ ; Gruppe 2 mit 4:  $p = 0,8366$ ; Gruppe 3 mit 4:  $p = 0,3785$ ). Bei den Kontrolltieren lag der Median der mRNA-Expression bei 0,09 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,05 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,12 Kopien / 100 Kopien GAPDH), bei den Tieren mit akuten Läsionen bei 0,10 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,06 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 2,18 Kopien / 100 Kopien GAPDH), bei den Tieren mit subakuten Läsionen bei 0,09 Kopien / 100

Kopien GAPDH (Minimum 0,03 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,18 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und bei den Tieren mit entzündlichen Läsionen bei 0,12 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 0,06 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,15 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Abb. 20). Bei den Tieren mit akuten Läsionen wurden die Messwerte für die Hunde Nr. S 1708/95 (2,18 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und S 1069/03 (0,34 Kopien / 100 Kopien GAPDH) als Ausreißer- bzw. Extremwerte eingestuft. Bei den Hunden mit subakuten Veränderungen lag der Messwert des Tieres Nr. S 98/91 mit 0,18 Kopien / 100 Kopien GAPDH weiter als das 1,5fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot von dieser entfernt und wurde deshalb ebenfalls als Extremwert angesehen.

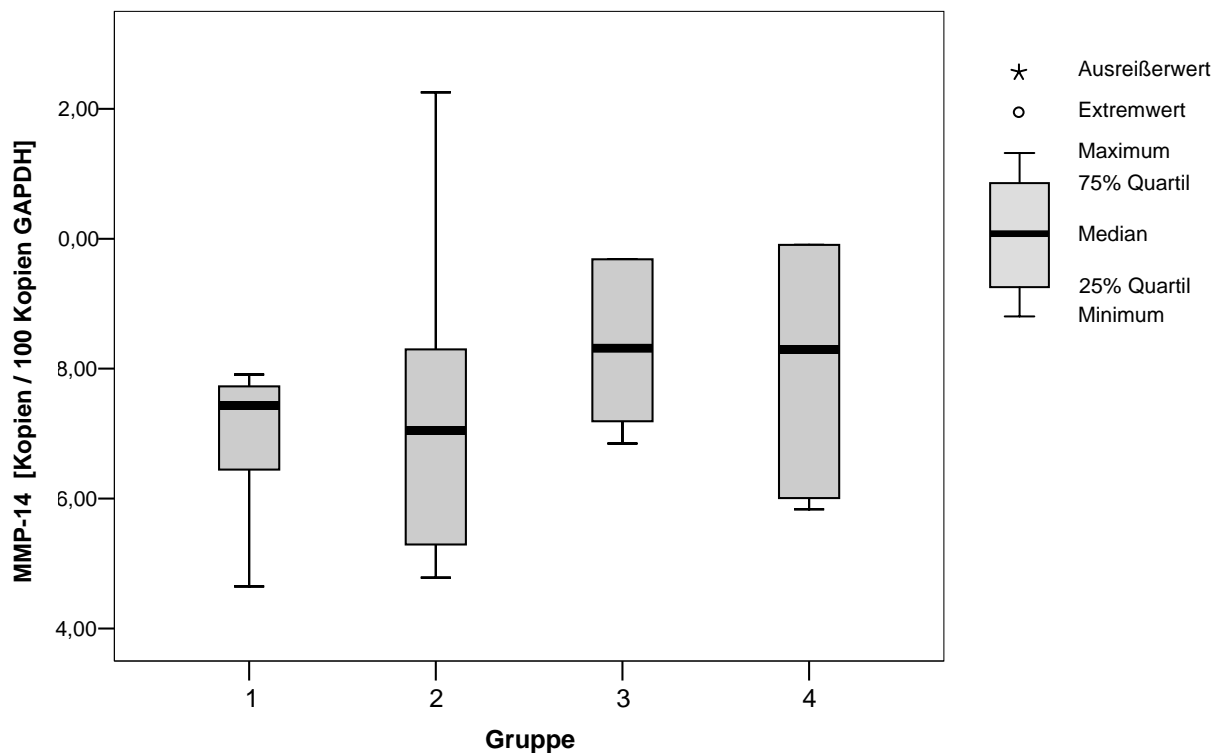
**Abb. 20:** MMP-13-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Staupeläsionen.



1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.2.2.2.5 MMP-14

Bei allen untersuchten Tieren war MMP-14-mRNA nachweisbar. Dabei ergaben sich weder signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und Staupevirus-infizierten Tieren (Gruppe 1 mit 2:  $p = 0,9185$ ; Gruppe 1 mit 3:  $p = 0,1752$ ; Gruppe 1 mit 4:  $p = 0,2725$ ), noch zwischen den einzelnen Gruppen Staupevirus-infizierter Tiere (Gruppe 2 mit 3:  $p = 0,1489$ ; Gruppe 2 mit 4:  $p = 0,2655$ ; Gruppe 3 mit 4:  $p = 0,9362$ ). Bei den Kontrolltieren lag der Median der mRNA-Expression bei 7,43 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 4,65 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 7,91 Kopien / 100 Kopien GAPDH), bei den Tieren mit akuten Läsionen bei 7,05 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 4,78 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 18,37 Kopien / 100 Kopien GAPDH), bei den Tieren mit subakuten Läsionen bei 8,32 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 6,85 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 18,78 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und bei den Tieren mit entzündlichen Läsionen bei 8,29 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 5,83 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 32,33 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Abb. 21). In den Gruppen der Tiere mit akuten, subakuten und entzündlichen Läsionen lag der Wert jeweils eines Tieres weiter als das Dreifache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot von dieser entfernt und wurde folglich als Ausreißerwert klassifiziert. Im einzelnen handelt es sich dabei in der Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen um den Hund Nr. S 192/95 (18,37 Kopien / 100 Kopien GAPDH), in der Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen um den Hund Nr. S 2015/91 (18,74 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und in der Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen um den Hund Nr. S 1767/95 (32,32 Kopien / 100 Kopien GAPDH).

**Abb. 21:** MMP-14-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Staupeläsionen

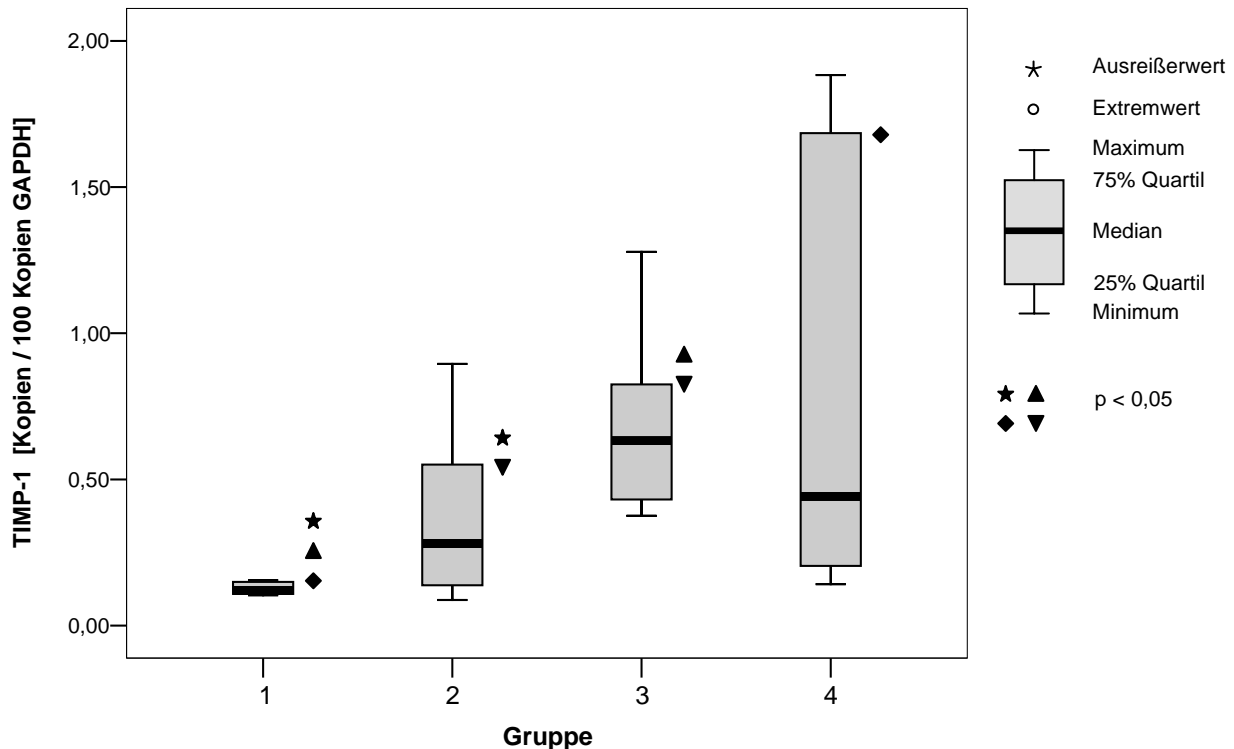
1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen

#### 4.2.2.2.6 TIMP-1

TIMP-1-mRNA war in den Proben aller untersuchten Tiere nachweisbar. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren (Median 0,12 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,10 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,16 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und allen Gruppen der Staupevirus-infizierten Tiere. Der ausgeprägteste Anstieg der TIMP-1 mRNA-Expression fand sich bei den Tieren mit subakuten Läsionen (Median 0,63 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,38 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 1,28 Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0024$ ). Geringere Anstiege lagen zu den Tieren mit akuten (Median 0,28 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,09 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,90 Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0316$ ) und entzündlichen (Median 0,44 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,14 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 1,88

Kopien / 100 Kopien GAPDH;  $p = 0,0081$ ) Veränderungen vor. Weiterhin fand sich eine signifikante Erhöhung der TIMP-1-mRNA-Expression in den subakuten Läsionen ( $p = 0,0288$ ) verglichen mit der Expression bei den Tieren mit akuten Veränderungen (Abb. 22).

**Abb. 22:** TIMP-1-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Staupeläsionen.



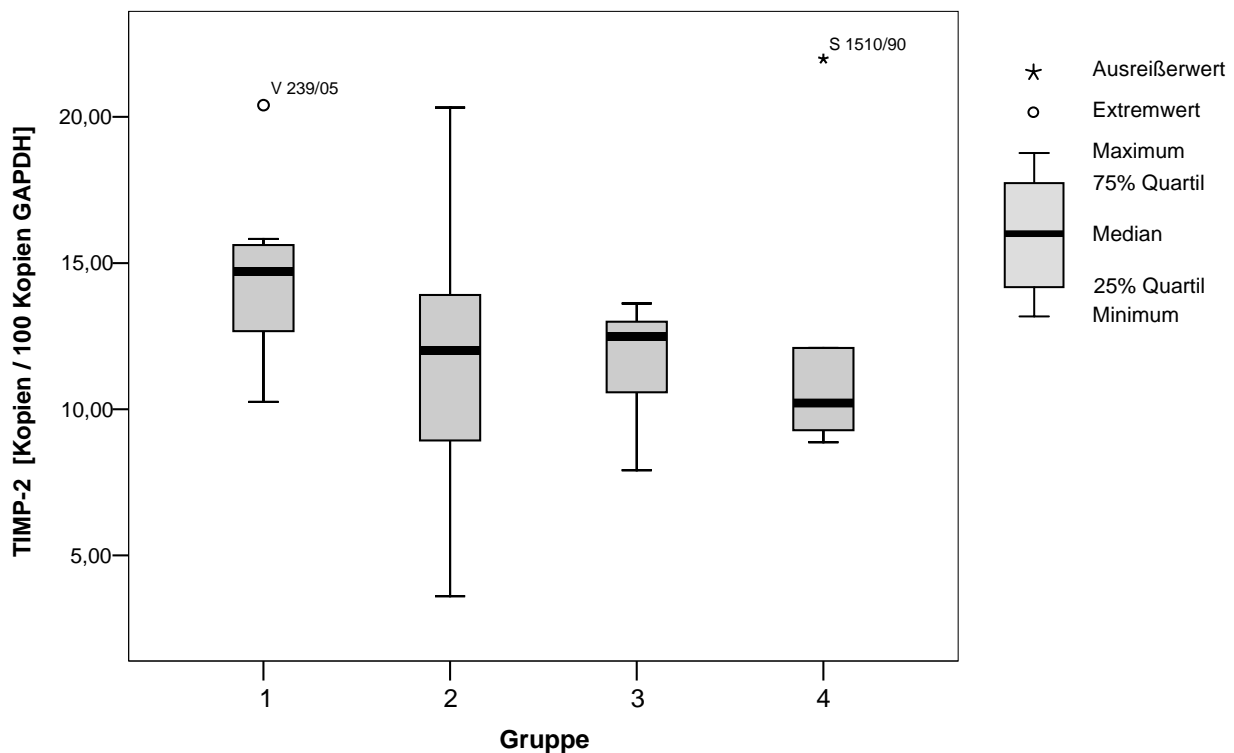
1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.2.2.2.7 TIMP-2

TIMP-2-mRNA war in den Proben aller untersuchten Tiere nachweisbar. Es ergaben sich weder signifikante Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den Staupevirus-infizierten Tieren (Gruppe 1 mit 2:  $p = 0,0518$ ; Gruppe 1 mit 3:  $p = 0,1066$ ; Gruppe 1 mit 4:  $p = 0,0814$ ), noch zwischen den verschiedenen Gruppen Staupevirus-infizierter Tiere untereinander (Gruppe 2 mit 3:  $p = 0,9671$ ; Gruppe 2 mit



4:  $p = 0,7728$ ; Gruppe 3 mit 4:  $p = 0,4712$ ). Der Medianwert lag bei den Kontrolltieren bei 14,72 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 10,25 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 20,40 Kopien / 100 Kopien GAPDH), bei den Tieren mit akuten Läsionen bei 12,02 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 3,61 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 20,32 Kopien / 100 Kopien GAPDH), bei den Tieren subakuten Läsionen bei 12,49 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 7,92 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 13,62 Kopien / 100 Kopien GAPDH) und bei den Tieren mit entzündlichen Läsionen bei 10,22 Kopien / 100 Kopien GAPDH (Minimum 8,87 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 21,98 Kopien / 100 Kopien GAPDH). In der Gruppe der Kontrollhunde wies das Tier Nr. V 239/05 mit einer TIMP-2-mRNA-Expression von 20,40 Kopien / 100 Kopien GAPDH einen um mehr als das 1,5fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot von dieser differierenden Lage auf und wurde dementsprechend als Extremwert angesehen. In der Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen lag der Messwert für das Tier mit der Nr. S 1510/90 mit 21,98 Kopien / 100 Kopien GAPDH um mehr als das 3fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot über den anderen Messwerten dieser Gruppe und wurde infolgedessen als Ausreißerwert klassifiziert (Abb. 23).

**Abb. 23:** TIMP-2-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Staupeläsionen.

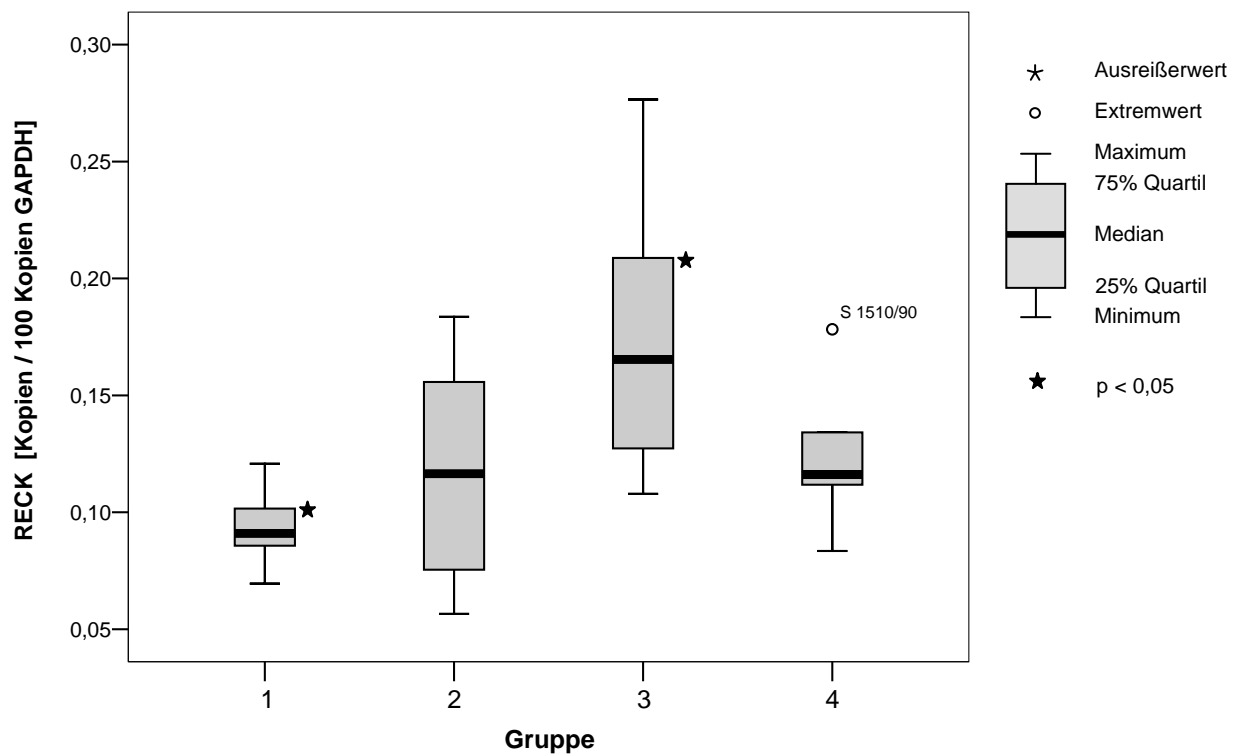
1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 4.2.2.2.8 RECK

RECK-mRNA war in den Proben aller untersuchten Tiere nachweisbar. Es lag eine signifikante Erhöhung der RECK-mRNA-Expression in der Gruppe der Tiere mit subakuten Staupeläsionen (Median 0,17 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,11 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,28 Kopien / 100 Kopien GAPDH) im Vergleich zu den Kontrolltieren (Median 0,09 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Minimum 0,07 Kopien / 100 Kopien GAPDH; Maximum 0,12 Kopien / 100 Kopien GAPDH) vor ( $p = 0,0037$ ). Darüber hinaus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollhunden und Staupavirus-infizierten Tieren bzw. den einzelnen Gruppen Staupavirus-infizierter Hunde untereinander. Der Median der mRNA-Expression lag sowohl bei den Tieren mit akuten als auch mit entzündlichen

Läsionen bei 0,12 Kopien / 100 Kopien GAPDH, das Maximum bei jeweils 0,18 Kopien / 100 Kopien GAPDH. Das Minimum lag bei akuten Läsionen bei 0,06 Kopien / 100 Kopien GAPDH und bei entzündlichen Läsionen 0,08 Kopien / 100 Kopien GAPDH. In der Gruppe der entzündlichen Läsionen lag der Messwert des Hundes S 1510/90 um mehr als das 1,5fache der Boxenlänge im Box-and-Whisker-Plot über den Messwerten der anderen Hunde aus dieser Gruppe, so dass er als Extremwert gewertet wurde (Abb. 24).

**Abb. 24:** RECK-mRNA-Expression bei unterschiedlichen Staupeläsionen.



1 = Kontrollgruppe; 2 = Gruppe der Tiere mit akuten Läsionen; 3 = Gruppe der Tiere mit subakuten Läsionen; 4 = Gruppe der Tiere mit entzündlichen Läsionen; Gleiche Symbole kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den einzelnen Gruppen.

### 4.2.3 Korrelationen zwischen Immunhistologie und mRNA-Expression

Es wurden Korrelationen zwischen der immunhistologischen Anzahl positiver markierter Zellen der untersuchten Antigene und der mRNA-Expression der unterschiedlichen Gene bestimmt. Die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho und die jeweiligen p-Werte sind der Tabelle 8 zu entnehmen. Es wurde eine statistisch signifikante Korrelation angenommen, wenn der p-Wert  $p < 0,05$  war.

Die Anzahl Staupevirus-Antigen positiver Zellen korrelierte positiv mit der mRNA-Expression von MMP-9, -12, TIMP-1 und RECK. Zwischen der Anzahl der BS-1 positiven Zellen und der TIMP-1- und RECK-mRNA-Expression fand sich ebenfalls eine positive Korrelation. Demgegenüber stand eine negative Korrelation zwischen TIMP-2 und der Anzahl Staupevirus-Antigen bzw. GFAP-Antigen positiver Zellen.

**Tab. 8:** Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rho und p-Werte zwischen der Anzahl Antigen-positiver Zellen und dem mRNA-Gehalt

mRNA-Expression		Anzahl Antigen-positiver Zellen		CDV	GFAP	CD3	CD21	BS-1
		Korr.-Koeff.	p-Wert					
<b>MMP-2</b>	Korr.-Koeff.	-0,148	-0,332	0,263	0,194	-0,023		
	p-Wert	0,427	0,073	0,139	0,280	0,902		
<b>MMP-9</b>	Korr.-Koeff.	0,575	0,231	0,073	0,198	0,368		
	p-Wert	0,002	0,256	0,717	0,321	0,064		
<b>MMP-12</b>	Korr.-Koeff.	0,513	0,128	-0,089	0,018	0,301		
	p-Wert	0,003	0,500	0,622	0,920	0,094		
<b>MMP-13</b>	Korr.-Koeff.	0,146	-0,016	0,054	0,199	0,051		
	p-Wert	0,435	0,933	0,766	0,268	0,782		
<b>MMP-14</b>	Korr.-Koeff.	0,348	0,062	0,111	0,076	0,178		
	p-Wert	0,055	0,745	0,537	0,673	0,328		
<b>TIMP-1</b>	Korr.-Koeff.	0,620	0,210	0,334	0,154	0,646		
	p-Wert	0,000	0,264	0,058	0,391	0,000		

**Tab. 8 (Fortsetzung):**

mRNA-Expression		Anzahl Antigen-positiver Zellen		CDV	GFAP	CD3	CD21	BS-1
		Korr.-Koeff.	p-Wert					
<b>TIMP-2</b>	Korr.-Koeff.	-0,448	-0,501	-0,050	-0,052	-0,128		
	p-Wert	0,011	0,005	0,782	0,772	0,487		
<b>RECK</b>	Korr.-Koeff.	0,459	0,131	0,195	0,163	0,417		
	p-Wert	0,009	0,489	0,277	0,364	0,018		
<b>CDV</b>	Korr.-Koeff.	0,339	-0,043	0,091	0,111	0,183		
	p-Wert	0,114	0,848	0,666	0,599	0,393		

MMP = **M**atrix-**M**etalloproteinase; TIMP = „Tissue-Inhibitor of Matrix-**M**etalloproteinases“; RECK = „**R**ersion-inducing-**c**ysteine-rich protein with **K**azal motifs“; CDV = Staupevirus („**C**anine **D**istemper **V**irus“); GFAP = Saures Gliafaserprotein („**g**lial **f**ibrillary **a**cid **p**rotein“); BS-1 = **B**andeiraea **s**implicifolia; Korr.-Koeff. = Korrelations-Koeffizient nach Spearman-Rho;  statistisch signifikant mit  $p < 0,05$

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt der mRNA verschiedener Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, -9, -12, -13 und -14) und ihrer Inhibitoren (TIMP-1, -2 und RECK) mittels RT-qPCR in unterschiedlichen Herdläsionen bei der CDV-Infektion des Hundes untersucht. Diese Ergebnisse wurden mit der Expression des CDV-Nukleoprotein-Antigens sowie der Anzahl CD3-, CD21-, BS-1- und GFAP-positiver Zellen in Korrelation gesetzt. Ziel dieser Untersuchungen war es, durch den Vergleich der mRNA-Expression der MMPs, TIMPs und RECK in den verschiedenen Plaquetypen mit dem pathohistologischen Bild Rückschlüsse auf die pathogenetische Bedeutung dieser Enzyme für demyelinisierende Erkrankungen zu ermöglichen.

Im Rahmen einer Pilotstudie erfolgte die Charakterisierung der mRNA-Expression der oben erwähnten MMPs und TIMPs sowie von CDV, RECK und GAPDH bei nicht infizierten und persistierend mit dem Onderstepoort-Staupevirusstamm-infizierten DH82-Zellen mittels RT-qPCR.

### 5.1 *in vitro* - Pilotstudie

#### 5.1.1 Auswirkungen einer persistierenden CDV-Infektion auf die Expression von MMPs und ihren Inhibitoren bei kaninen DH82-Zellen

Die Untersuchung der mRNA-Expression der MMPs und TIMPs in den persistierend CDV-infizierten und nicht infizierten DH82-Zellen ergab für einige der untersuchten Gene differenzierte, infektionsabhängige Veränderungen, die sich in drei Gruppen mit einem jeweils gemeinsamen Expressionsmuster einteilen ließen. Es fanden sich Gene mit herabregulierter (MMP-2, TIMP-1, TIMP-2), aufregulierter (MMP-13, MMP-14, RECK) und nur unwesentlich veränderter (MMP-9) Expression in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen.

In die Gruppe der **Gene mit herabregulierter Expression** in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen fallen MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2. Die **MMP-2**-mRNA-Expression war bei den persistierend CDV infizierten DH82-Zellen im Vergleich zu den nicht infizierten DH82-Zellen dramatisch reduziert. Dies könnte im Zusammenhang mit der Virusinfektion stehen, da KIM und KIM (2004) beim Vergleich von Leberzelllinien (Chang-Zellen) und humanen Hepatitis B (HBV) – Virus Hepatomzellen ebenfalls eine deutlich reduzierte MMP-2-mRNA-Expression in den Virus-infizierten Zellen fanden. Der dafür verantwortliche pathogenetische Mechanismus konnte allerdings bislang nicht geklärt werden. Der Einfluss einer erhöhten MMP-2 Expression auf das Invasivitäts- und Metastasierungspotential von Tumoren beruht auf den Matrix-degradierenden Eigenschaften, denn zu den Substraten zählen unter anderem Typ IV Kollagen und Laminin, welche Hauptkomponenten der Basalmembranen darstellen (LEBLOND und INOUE, 1989; KLEINER und STETLER-STEVENSON, 1999). Mittels zymographischer Studien zur Plasmaaktivität von MMP-2 bei Hunden mit malignen Lymphomen konnte gezeigt werden, dass erkrankte Hunde einen signifikant erhöhten MMP-2-Gehalt im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen (GENTILINI et al., 2005). Gleichartige Beobachtungen liegen für kanine Mammatumoren vor, bei denen sich eine erhöhte MMP-2-Expression in einfachen Adenomen, verglichen mit unverändertem Drüsengewebe des gleichen Tieres fand (PALTIAN, 2006). Die Reduktion der MMP-2-mRNA-Expression in persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen könnte demnach für eine vermindertes Invasivitäts- und Metastasierungspotential dieser Zellen sprechen.

**TIMP-1** zeigte in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen eine signifikant niedrigere mRNA-Expression als bei nicht infizierten DH82-Zellen. Der Einfluss einer erhöhten TIMP-1-Expression auf die Tumormalignität wird in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert. Er wird mit einem erhöhten Proliferations- und Metastasierungspotential beispielsweise in malignen Non-Hodgkin-Lymphomen, Mamma-, Magen- oder Kolonkarzinomen in Verbindung gebracht (ZHENG et al., 1995; MIMORI et al., 1997; LUPARELLO et al., 1999; KOSSAKOWSKA et al., 2000). GUEDEZ et al. (2001) stellten fest, dass die TIMP-1-Expression bei humanen B-Zell-

Lymphompatienten direkt mit dem histologischen Tumorgrad korrelierte und mittels semi-quantitativer PCR konnten in „High-grade“-Lymphomen signifikant mehr TIMP-1-Transkripte nachgewiesen werden als bei „Low-grade“-Lymphomen. Die Proliferations-fördernde Aktivität wird unter anderem auf den zellstimulierenden Einfluss von TIMP-1 zurückgeführt, der unabhängig von der MMP-inhibitorischen Funktion besteht. Ursächlich wird eine direkte Interaktion mit einem, bis dato, nicht näher charakterisierten Oberflächenrezeptor, der von verschiedenen Zelltypen, unter anderem von Keratinozyten und Mammakarzinomzellen, exprimiert wird, angenommen (LUPARELLO et al., 1999; WÜRTZ et al., 2005). Darüber hinaus wird TIMP-1 eine anti-apoptotische Wirkung zugesprochen, die auf einer Hemmung der MMP-Aktivität und der daraus resultierenden Stabilisierung von Basalmembranen und extrazellulärer Matrix beruht. Dadurch wird die Anzahl der Apoptosen vermindert, die gewöhnlich durch einen Verlust der Zell-Matrix-Interaktion infolge einer Separierung einzelner Zellen aus dem Zellverband auftreten (BOUDREAU et al., 1995; WÜRTZ et al., 2005). Im Gegensatz zu diesen Befunden war eine erhöhte TIMP-1-Expression mit einer Suppression des tumorigenen und Metastasierungspotentials von Melanomzelllinien verbunden (KHOKA, 1994). Die reduzierte TIMP-1-mRNA-Expression in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen könnte aufgrund der multiplen Funktionen von TIMP-1 sowohl für eine Hemmung als auch eine Förderung der Proliferations- und Invasionsfähigkeit der Tumorzellen sprechen. Es wäre denkbar, dass es durch die virale Infektion neben der Reduktion der TIMP-1-mRNA-Expression auch zu einer verminderten Expression TIMP-1-spezifischer Oberflächenrezeptoren und einer daraus resultierenden Proliferationshemmung kommt. Darüber hinaus liegt eine Verschiebung des MMP- / TIMP-Verhältnisses in Richtung einer proteolytischen Dominanz vor, da eine unveränderte, bzw. erhöhte MMP-9-, -13- und -14-mRNA-Expression bei reduzierter TIMP-1-mRNA-Expression vorliegt. Daraus resultiert eventuell eine erhöhte Labilität der extrazellulären Matrix, wodurch die Abtrennung einzelner Zellen aus dem Tumorzellverband und die daraus resultierende Anoikis begünstigt werden könnte. Gleichzeitig wird durch die Labilität allerdings die Invasion von Tumorzellen, die der Anoikis entgangen sind, gefördert. Weil zusätzlich eine ausgeprägte Regulation der MMP- und TIMP-Funktion auf post-



transkriptioneller Ebene erfolgt, können in der vorliegenden Studie keine Aussagen über die Auswirkungen der beobachteten mRNA-Expressionsunterschiede auf die biologische Aktivität getroffen werden.

Das **TIMP-2** Expressionsmuster ähnelte demjenigen von TIMP-1. Dabei wiesen die persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen eine signifikante Reduktion der TIMP-2-mRNA-Expression verglichen mit den nicht infizierten DH82-Zellen auf. Der Einfluss eines erhöhten TIMP-2 Niveaus auf die Tumormalignität wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Bei Patienten mit Mammakarzinomen korrelierte eine erhöhte TIMP-2 Expression direkt mit einer längeren Überlebenszeit (NAKAPOULOU et al., 2002). Neuere Studien dagegen sprechen für eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten TIMP-2 Expression und einem fatalen Ausgang bei verschiedenen humanen Tumoren, beispielsweise bei Plattenepithelkarzinomen und kolorektalen Karzinomen (DE VICENTE et al., 2005; ROCA et al., 2006). Hohe TIMP-2 mRNA-Transkript- und Proteinmengen wurden auch in neoplastischen T-Zelllinien nachgewiesen, wohingegen die Expressionshöhe in normalen, peripheren T-Lymphozyten im Blut und in hyperplastischen Tonsillen geringer war (STETLER-STEVENSON et al., 1997). Diese Publikationen besagen, dass sowohl TIMP-1 als auch TIMP-2 neben ihrer Funktion als MMP-Inhibitoren eine Wachstumsfaktoraktivität entfalten. Dabei wird angenommen, dass ein TIMP-2-spezifischer, zellulärer Oberflächenrezeptor vorhanden ist, da HAYAKAWA et al. (1994) feststellten, dass es zu einer kompetitiven Hemmung des <sup>125</sup>I-TIMP-2 Einbaus in Zellen einer humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie (Raji-Zellen) durch nicht markiertes TIMP-2 kommt, nicht aber durch TIMP-1. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass TIMP-2 direkt die Adenylatzyklase in humanen Fibrosarkomzellen (HT-1080) zur Produktion von cAMP anregt, welches seinerseits die cAMP-abhängige Proteinkinase aktiviert und dadurch das Zellwachstum fördert (CORCORAN und STETLER-STEVENSON, 1995). Vergleichbar mit diesen Ergebnissen könnte eine erniedrigte TIMP-2-mRNA-Expression in persistierend CDV infizierten DH82 Zellen für eine, durch die virale Infektion initiierte, reduzierte Wachstumsfaktoraktivität sprechen und somit zu einer reduzierten Tumorprogression beitragen.

In die Gruppe der **Gene mit aufregulierter Expression** in den persistierend CDV-

infizierten DH82-Zellen fallen MMP-13, MMP-14 und RECK. **MMP-13** zeigte in persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen eine signifikant höhere mRNA-Expression als in nicht-infizierten DH82-Zellen. Eine erhöhte MMP-13-Expression wird mit einem erhöhten Tumorinvasions- und –metastasierungspotential in Verbindung gebracht (ETOH et al., 2000; ALA-AHO et al., 2002; LEEMAN et al., 2002; CULHACI et al., 2004). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ergibt sich aus der intratumoralen Verteilung der MMP-13-Expression. In Plattenepithelkarzinomen fand sich die MMP-13-Expression vorwiegend innerhalb der Zellen der Tumorperipherie. Darüber hinaus konnte zusätzlich eine MMP-13-Expression durch peritumorale, stromale Fibroblasten nachgewiesen werden (JOHANSSON et al., 1997; CAZORLA et al., 1998). Interessanterweise liegt in Larynx- und Vulvakarzinomen eine Kolo-kalisation der MMP-13 Expression mit derjenigen von MMP-2 und -14 vor (CAZORLA et al., 1998; JOHANSSON et al., 1999). Daraus kann möglicherweise geschlossen werden, dass diese drei MMPs eine proteolytische Kaskade bilden, die zu einer potenten, extrazellulären, kollagenolytischen Aktivität führt und somit die Invasivität und Metastasierung der Tumorzellen fördert (KNÄUPER et al., 1996). Die erhöhte MMP-13-Expression in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen könnte im Zusammenhang mit der ebenfalls erhöhten MMP-14-Expression für das Vorliegen einer proteolytischen Kaskade, wie sie von CAZORLA et al. (1998) und JOHANSSON et al. (1999) beschrieben wurde, sprechen. Gegen das Vorliegen einer derartigen, funktionell aktiven, proteolytischen Kaskade spricht die stark erniedrigte MMP-2-mRNA-Expression in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen. Die Bedeutung der erhöhten MMP-13-mRNA-Expression auf die Tumordignität kann in dieser Studie nicht abschließend beurteilt werden, da keine Untersuchungen über die biologische Aktivität durchgeführt wurden.

Bei **MMP-14** wurden ähnliche Veränderungen der mRNA-Expression gefunden wie bei MMP-13. Es war ebenfalls eine signifikant erhöhte MMP-14-mRNA-Expression in persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen verglichen mit nicht infizierten DH82-Zellen nachweisbar. In verschiedenen, neueren Studien variierte der MMP-14 Gehalt in kultivierten Tumorzellen stark, abhängig von der Dignität der verwendeten Zelllinie. In Mammakarzinomzellkulturen, die einer Behandlung mit Concanavalin A

unterzogen wurden, wurde eine erhöhte MMP-14-mRNA-Expression in MDA-MB-231 Zellen (aggressive, humane Mammakarzinomzellen) und eine verringerte MMP-14-mRNA-Expression in MCF-7 Zellen (wenig invasive, humane Mammakarzinomzellen) beobachtet (HAUPT et al., 2006). Möglicherweise führt eine persistierende CDV-Infektion von DH82-Zellen durch eine Erhöhung der MMP-14-mRNA-Expression ebenfalls zu einer Steigerung der Tumormalignität. GILLES et al. (2001) und KAJITA et al. (2001) stellten fest, dass die Degradierung der extrazellulären Matrix durch ein Zusammenspiel unterschiedlicher MMPs erfolgt, wohingegen die Zellmigration vorwiegend mit dem MMP-14-assoziierten Abbau von Zelloberflächen-Adhäsionsmolekülen (z.B. CD44) und der Degradierung spezifischer EZM-Proteine, wie beispielsweise Laminin-5, in Verbindung gebracht wird. Demnach kann vermutet werden, dass eine erhöhte MMP-14-mRNA-Expression in persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen zu einer gesteigerten Migrationsfähigkeit dieser Zellen und einem daraus resultierenden erhöhten Invasivitäts- und Metastasierungspotential führen könnte.

Die **RECK**-mRNA-Expression lag bei den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen bemerkenswert höher als bei den nicht infizierten DH82-Zellen. Im Zusammenhang mit der reduzierten MMP-2-Expression könnte dies für eine Virus-induzierte Reduktion des Invasivitäts- und Metastasierungspotentials der DH82-Zellen durch eine Verminderung der extrazellulären Proteolyse sprechen. OH et al. (2001) stellten fest, dass RECK sowohl die MMP-2- als auch die MMP-9- und -14-Aktivität hemmt. TAKAHASHI et al. (1998) wiesen nach, dass eine Wiederherstellung der RECK-Expression in Tumorzelllinien weder die Lebensfähigkeit der Tumorzellen noch das Wachstum, die Motilität oder die chemotaktische Aktivität *in vitro* oder *in vivo* alterierte. *In vitro* ergab sich jedoch eine verminderte Invasionskapazität und in experimentellen *in vivo*-Untersuchungen eine reduzierte Metastasenbildung. Die Inhibition von MMP-2 wird auf eine RECK-vermittelte Hemmung der MMP-2-Aktivierung unter anderem bei der Konversion der Intermediärform durch Autoproteolyse in die aktive Form zurückgeführt (OH et al., 2001). Weil zusätzlich eine ausgeprägte Regulation der MMP- und RECK-Aktivität auf post-transkriptioneller Ebene erfolgt, können in der vorliegenden Studie keine Aussagen

über die Auswirkungen der beobachteten mRNA-Expressionsunterschiede auf die biologische Funktion getroffen werden. Verschiedene neuere Studien zeigen, dass die Höhe der RECK-Expression als prognostischer Marker bei humanen Neoplasien, z. B. Magen-, nicht kleinzelligen Lungen- und Mammakarzinomen verwendet werden kann (SPAN et al., 2003; TAKENAKA et al., 2005; SONG et al., 2006). Auch bei kaninen Neoplasien konnte in verschiedenen Tumorzelltypen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* eine verminderte RECK-Expression verglichen mit gesundem Kontrollgewebe nachgewiesen werden. Es konnten jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen der RECK-Expression und klinikopathologischen Faktoren nachgewiesen werden (TAKAGI et al., 2005). Dabei muss jedoch bedacht werden, dass in dieser Studie nur sehr geringe Tierzahlen je Tumortyp untersucht wurden (n = 1 bis n = 10).

In die Gruppe der Gene mit nur **unwesentlich veränderter mRNA-Expression** fällt nur **MMP-9**. Bei humanen, malignen Lymphomen wurde eine starke Erhöhung der MMP-9-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden. Allerdings ergaben sich daraus keine signifikanten Korrelationen mit dem histologischen Differenzierungsgrad, dem Tumorstadium oder der Überlebenszeit (HAZAR et al., 2004). Andere Autoren fanden eine starke Erhöhung der MMP-9-Expression bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen, die signifikant mit einer geringeren Überlebenszeit korrelierte (SAKATA et al., 2004). Weitere Studien zeigten, dass die Reed-Sternberg-Zellen in Hodgkin-Lymphomen größtenteils MMP-9 negativ sind, wohingegen das peritumorale, nicht-neoplastische Gewebe teilweise positiv markiert war (THORNS et al., 2003). Bei Hunden konnte in benignen Mammamischtumoren eine höhere MMP-9-Expression als bei gesunden Kontrolltieren nachgewiesen werden (PALTIAN, 2006). Diese unterschiedlichen MMP-9-Expressionen sind möglicherweise auf die verschiedenen Tumorzelltypen zurückzuführen. In der vorliegenden Studie lag zwar absolut gesehen eine unveränderte MMP-9-mRNA-Expression vor, aber durch die erhöhte RECK-Expression in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen könnte es dennoch zu einer funktionell gesteigerten Hemmung der MMP-9 Aktivität kommen. Kontrovers zu diesen Befunden steht die parallel erfolgte Reduktion von TIMP-1 und -2, die für eine verminderte Inhibition von

MMP-9 spricht. Dabei muss allerdings bedacht werden, dass es sich um eine *in vitro*-Studie ohne funktionelle Charakterisierung des Invasionsverhaltens handelt, so dass keine Aussagen über die biologische Aktivität getroffen werden können.

### 5.1.2 Schlussbetrachtung

Der Einfluss einer viralen Infektion auf die Expression proteolytischer Enzyme und ihrer Inhibitoren bei Tumorzellen ist bislang nicht geklärt. Verschiedene Studien berichten über eine Virus-bedingte Onkolyse (GROTE et al., 2001; HEINZERLING et al., 2005). Die diesem Phänomen zugrunde liegende Pathogenese ist noch in weiten Bereichen unklar. Teilweise wird der onkolytische Effekt einer viralen Infektion darauf zurückgeführt, dass Unterschiede in intrazellulären Signalkaskaden oder Zellrezeptorausstattungen von Tumorzellen und nicht transformierten Zellen vorliegen (STOJDL et al., 2000; PENG et al., 2002). Ob durch eine virale Infektion von Tumorzellen zusätzlich angiogenetische, Invasivitäts- oder Metastastasierungs-fördernde Eigenschaften, wie sie durch MMPs, TIMPs und RECK dargestellt werden, beeinflusst werden, ist bislang nicht geklärt. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine vergleichende Quantifizierung der mRNA-Expression von nicht infizierten DH82-Zellen und persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen durchgeführt. Dabei ergaben sich sowohl Daten, die für eine Reduktion des malignen Potentials stehen, wie z.B. die Reduktion der MMP-2-mRNA-Expression und der Anstieg der RECK-mRNA-Expression, als auch Ergebnisse, die für eine Zunahme der Malignität sprechen, wie beispielsweise die erhöhte MMP-13-mRNA-Expression. Es kann vermutet werden, dass eine persistierende Infektion mit CDV zu einer Wiederherstellung der RECK-Expression bei persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen, resultierend in einer dramatischen Senkung der MMP-2-Expression, führt. In diesem Zusammenhang ist die vorliegende Aufregulierung der RECK-Expression als mögliche kontra-regulatorische Maßnahme zur Verhinderung einer proteolytischen Dominanz zu sehen. Dabei muss bedacht werden, dass es sich bei den verwendeten Zellen um eine Tumorzelllinie handelt, die persistierend infiziert war. In weiteren Studien sollte deshalb abgeklärt werden, wie sich eine akute CDV-Infektion auf die untersuchten Genexpressionen auswirkt. Die funktionelle Aktivität der nachgewiesenen

proteolytischen Enzyme sollte ebenfalls geprüft werden. Dies kann mit Hilfe eines Zweikammer-Kultursystems erfolgen, wobei die beiden Kammern durch einen mit Gelatinegel-beschichteten Filter getrennt sind. Weiterhin sollte das biologische Verhalten von Tumoren, die mit dem CDV infiziert werden, *in vivo* untersucht werden.

## 5.2 *in vivo* - Hauptversuch

### 5.2.1 Nachweis von Staupevirus-Antigen / -mRNA und Phänotypisierung der Läsionen

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung der **HE-** und **LFB-KV-**gefärbten Gehirnschnitte der mit CDV-infizierten Tiere zur Klassifizierung der einzelnen Herdläsionen bei der demyelinisierenden Leukoenzephalitis des Hundes konnten im Kleinhirn unterschiedliche Plaques nachgewiesen werden. Diese reichten von Tieren mit lichtmikroskopisch kaum sichtbaren, akuten Herden (Gruppe 2, n = 14), über Tiere mit subakuten, demyelinisierenden Plaques ohne Entzündung (Gruppe 3, n = 6) bis hin zu Hunden mit entzündlichen Läsionen mit Entmarkung (Gruppe 4, n = 6). Hierbei erfolgte die Einteilung in die akuten Herde anhand des positiven Nachweises von CDV-Nukleoprotein und CDV-mRNA. Die LFB-KV-Färbung zeigte in diesen Arealen keine Entmarkung, so dass diese Lokalisationen als Frühstadium einer CDV-Infektion gedeutet wurden. In den subakuten, nicht entzündlichen und entzündlichen Herden war eine graduell variierende, mittel- bis hochgradige Demyelinisierung nachweisbar. Die Einteilung erfolgte in Anlehnung an frühere Veröffentlichungen, und die Befundbeschreibungen ähnelten denjenigen früherer Publikationen (KRAKOWKA et al., 1985; ALLDINGER et al., 1993 und 1996; WÜNSCHMANN et al., 1999).

**Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen** war bei allen infizierten Hunden in unterschiedlicher Menge nachweisbar, wohingegen bei keinem der Kontrolltiere eine positive Reaktion detektierbar war. Die höchste Expression war in den subakuten Herden ohne Entzündung vorhanden, gefolgt von den entzündlichen und den akuten Läsionen. Diese Ergebnisse entsprechen in der Tendenz denjenigen früherer Studien, auch wenn sich, möglicherweise aufgrund der geringen Tierzahl, keine Signifikanzen ergaben (ALLDINGER et al., 1993; GAEDKE et al., 1997 und 1999;

WÜNSCHMANN et al., 1999; GRÖTERS et al., 2005). In den Gruppen 2 (akute Herde) und 3 (subakute, nicht entzündliche Plaques) war das Signal diffus in den Herden verteilt und sowohl zytoplasmatisch als auch intranukleär lokalisiert. In den Plaques der Gruppe 4 zeigte sich ein mit der Chronizität der Veränderungen einhergehendes, differenziertes Expressionsmuster des CDV-Nukleoprotein-Antigens. Dieses äußerte sich in einer starken Reduktion der positiven Zellen im Läsionszentrum. In der Läsionsperipherie dagegen war eine Vielzahl positiv markierter Zellen vorhanden (ALLDINGER et al., 1993). Aufgrund des Schwundes an Virusprotein im Zentrum der Läsionen kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass es sich um einen kontinuierlichen Prozess der Antigeneliminierung handelt.

Der Nachweis der viralen mRNA des **Staupevirus-Nukleoproteins** war in allen Kleinhirnen CDV-infizierter Tiere möglich, wohingegen die Kleinhirne aller Kontrolltiere negativ waren. In verschiedenen Studien konnte die höchste CDV-mRNA-Expression in akuten Läsionen mit einer Reduktion in subakuten und chronischen Plaques nachgewiesen werden (MARKUS et al., 2002; GRÖTERS et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entsprachen in ihrer Tendenz diesen Befunden, allerdings waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Möglicherweise beruht dies auf der geringen Probenanzahl, vornehmlich in den Gruppen mit subakuten und entzündlichen Herden. Dabei ist weiterhin zu beachten, dass sich die Gruppe der entzündlichen Läsionen aus den subakuten und chronischen, entzündlichen Plaques zusammensetzt. Die Zusammenlegung dieser beiden Gruppen erfolgte, da sich ähnliche Werte ergaben und eine statistische Auswertung aufgrund der geringen Tierzahl bei einer Einzelbetrachtung von subakuten Herden mit Entzündung (n=4) und chronisch, entzündlichen Plaques (n=2) nicht durchführbar gewesen wäre.

**GFAP**-positive Astrozyten fanden sich bei den Kontrolltieren als diffus in der weißen Substanz verteilt liegende Zellen mit einem schlanken, fibrillären Erscheinungsbild, die ein hellbraun markiertes Zytoplasma zeigten. Zusätzlich fanden sich bei den CDV-infizierten Tieren teils zahlreiche, ebenfalls positiv markierte Gemistozyten, die sich deutlich von den extraläsional gelegenen Astrozyten unterschieden. Die Anzahl

GFAP-positiver Astrozyten pro mm<sup>2</sup> war bei den Tieren der Gruppe 3 (subakute Läsionen ohne Entzündung) signifikant höher als bei allen anderen Gruppen. Die entzündlichen Läsionen wiesen im Median wieder eine reduzierte Anzahl positiver Zellen verglichen mit den subakuten Herden ohne Entzündung auf, wobei eine ungleichmäßige Verteilung positiver Zellen in den Läsionen beobachtet werden konnte. Das Läsionszentrum zeigte eine stark verminderte, teilweise nahezu vollständig fehlende, Anzahl GFAP-exprimierender Astrozyten. Die positiv-markierten Zellen waren vorwiegend in der Läsionsperipherie angeordnet. Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen anderer Autoren überein (VANDEVELDE et al., 1983; ALLDINGER et al., 1993; GAEDKE et al., 1997 und 1999; WÜNSCHMANN et al., 1999; GRÖTERS et al., 2005).

**CD3**-positive Zellen waren überwiegend in entzündlichen Läsionen nachweisbar. Dort waren signifikant mehr positive Zellen pro mm<sup>2</sup> nachweisbar als bei den Kontrollhunden oder den anderen Herdveränderungen. Die positiv-markierten Lymphozyten fanden sich vor allem perivaskulär, aber auch in geringeren Mengen innerhalb der Läsionen verteilt. Die wenigen, positiven Zellen in den akuten und subakuten Herden fanden sich in den Meningen und in der weißen Substanz. Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen anderer Autoren, die eine starke Infiltration mit T-Lymphozyten in demyelinisierten Arealen bei der Staupevirusinfektion nachweisen konnten, überein, wobei perivaskulär hauptsächlich CD4+ und intraläsional CD8+ Lymphozyten vorhanden waren (TIPOLD et al., 1999; WÜNSCHMANN et al., 1999).

**CD21**-Antigen-positive Zellen waren nur in der Gruppe mit entzündlichen Läsionen nachweisbar, und die Expression war signifikant höher als bei allen anderen Gruppen. In der Mehrzahl der Fälle lag eine perivaskuläre Akzentuierung der CD21-positiven Lymphozyten vor. Diese Befunde entsprechen denjenigen anderer Studien (WÜNSCHMANN et al., 1999; MARKUS et al., 2002).

Mit dem Lektin **BS-1** markierte Makrophagen / Mikroglia waren bei den Tieren mit subakuten und entzündlichen Läsionen in einer signifikant höheren Anzahl vorhanden als bei Kontrollhunden und Tieren mit akuten Herden. Diese Zellen befanden sich vorwiegend intraläsional und bestanden, vor allem in späteren Stadien, überwiegend aus Gitterzellen. Zusätzlich lagen ebenfalls positiv markierte



Zellen in den perivaskulären Infiltraten der entzündlichen Stadien vor. Makrophagen / Mikroglia wird durch ihre Fähigkeit verschiedenste Zelloberflächenmoleküle (z.B. Integrine) und Matrix-degradierende bzw. -modifizierende Enzyme (z.B. MMPs) zu exprimieren eine entscheidende Rolle bei der Transmigration von Entzündungszellen in das Gehirnparenchym und der Demyelinisierung zugesprochen (RAIVICH und BANATI, 2004). Diese Daten stimmen mit denjenigen früherer Studien überein (GRÖNE et al., 2000; SEEHUSEN, 2006).

### **5.2.2 mRNA-Expression der MMPs und ihrer Inhibitoren bei der kaninen CDV-Infektion**

Die Untersuchung der mRNA-Expression der MMPs und TIMPs sowie von RECK in den Kleinhirnproben der Kontroll- und CDV-infizierten Hunde zeigte für einige der untersuchten Gene differenzierte, Läsionstyp-abhängige Veränderungen. Es ergaben sich drei Gruppen mit einem jeweils gemeinsamen, Läsionstyp-abhängigen Expressionsmuster. Es fanden sich Gene mit herabregulierter Expression in den akuten Herden (MMP-2), aufregulierter Expression vor allem in den akuten und subakuten Plaques ohne Entzündung (MMP-9, MMP-12, TIMP-1 und RECK) und solche mit nur unwesentlich veränderter Expression (MMP-13, MMP-14, TIMP-2).

In die Gruppe der Gene mit **herabregulierter mRNA-Expression in den akuten Herden** fällt nur **MMP-2**. Die mRNA-Expression wies dabei eine signifikante Reduktion bei den Tieren mit akuten Läsionen im Vergleich zu den Kontrollhunden auf. In den subakuten Herden ohne Entzündung entsprach die Expression nahezu derjenigen in den akuten Plaques, allerdings ergab sich, vermutlich aufgrund eines Ausreißerwertes, kein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren. Die Expression bei den entzündlichen Läsionen stimmte annähernd mit derjenigen der Kontrolltiere überein. Die Reduktion der MMP-2-mRNA-Expression in akuten Staupeherden unterscheidet sich von den Ergebnissen von MIAO et al. (2003), die mittels Immunhistologie keine Änderung der Anzahl MMP-2 positiver Zellen nachweisen konnten. Diese Differenz ist möglicherweise auf eine Diskrepanz zwischen der transkriptionellen und translationellen Expression zurückzuführen. Ähnliche Befunde konnten KHUTH et al. (2001) bei der MMP-2-mRNA-Expression und der

proteolytischen Aktivität von MMP-2 bei experimentell CDV-infizierten Swiss-Mäusen erheben. Dabei war die MMP-2-mRNA-Expression nahezu unverändert, während eine deutlich erhöhte MMP-2 Protein-Expression und gelatinolytische Aktivität mittels Immunhistologie bzw. Zymographie nachweisbar war. Bei Theilervirus-infizierten Mäusen war die MMP-2-mRNA-Expression in frühen Stadien (Tag 14 p. i.) im Vergleich zu den Kontrolltieren erniedrigt und ähnelte damit den Befunden der vorliegenden Arbeit (ULRICH, 2006a). Allerdings wiesen die Theilervirus-infizierten Mäuse im Gegensatz zu den CDV-infizierten Hunden eine signifikant erhöhte MMP-2-Expression in chronischen Stadien auf (ULRICH et al., 2006b). Diese wurde der ausgeprägt vorhandenen Astroglieose zugeschrieben, da nach ROSENBERG (2002) Astrozyten einen Hauptsyntheseort von MMP-2 im Gehirn darstellen. Dies könnte den Unterschied zu den entzündlichen Läsionen CDV-infizierter Hunde erklären, da diese eine Reduktion der Astrozytenzahl, vor allem im Läsionszentrum aufweisen. Bei der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) konnten weder bei Ratten, noch bei Mäusen mit molekularbiologischen Methoden Änderungen der MMP-2-Expression verglichen mit Kontrolltieren nachgewiesen werden, wobei Tiere untersucht wurden, die den Höhepunkt klinischer Ausfallserscheinungen aufwiesen (CLEMENTS et al., 1997; TOFT-HANSEN et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Studien entsprechen denjenigen Daten, die für entzündliche Läsionen CDV-infizierter Hunde gewonnen wurden. Bei der Multiplen Sklerose (MS) kommt es abhängig von dem jeweiligen Subtyp der Erkrankung zu einem divergierenden Expressionprofil der MMP-2-mRNA. GALBOIZ et al. (2001) konnten zeigen, dass die MMP-2-mRNA in peripheren Blutleukozyten bei Patienten mit schubartig remittierender MS höher exprimiert war als bei gesunden Kontrollen. Im Gegensatz dazu fanden die Autoren eine erniedrigte MMP-2-mRNA-Expression bei Patienten mit sekundärer, progressiver MS, sowohl verglichen mit gesunden Kontrollen als auch mit Patienten mit schubartig remittierendem Verlauf. Es ist in Betracht zu ziehen, dass es bei einer Staupevirusinfektion möglicherweise ebenfalls zu unterschiedlichen Verlaufsformen kommen kann, die ein divergierendes MMP-2-mRNA-Expressionsprofil aufweisen, das im vorliegenden Fall demjenigen von Patienten mit sekundärer, progressiver MS gleicht.

In die Gruppe der Gene mit **aufregulierter Expression vor allem in den akuten und subakuten Plaques ohne Entzündung** fallen MMP-9, MMP-12, TIMP-1 und RECK. **MMP-9**-mRNA konnte bei 6 der 34 untersuchten Hunde (17,6 %) nicht nachgewiesen werden, wobei sich die Tiere, die keine messbaren MMP-9-mRNA-Gehalte aufwiesen, auf alle untersuchten Gruppen verteilten. Insgesamt lag die Höhe der MMP-9-mRNA-Expression bei allen Tieren nahe der Nachweisgrenze. Die CDV-infizierten Tiere zeigten, unabhängig vom Läsionsstadium eine signifikant erhöhte MMP-9-Expression verglichen mit den Kontrollhunden. Die höchste Expression war bei subakuten Herden ohne Entzündung nachzuweisen, gefolgt von derjenigen bei akuten Plaques und schließlich bei entzündlichen Läsionen. Diese Beobachtungen entsprechen denjenigen einer immunhistologischen Studie von MIAO et al. (2003), bei der die höchste Expression von MMP-9 in akuten Herden, gefolgt von subakuten Plaques ohne Entzündung gefunden wurde. Hierbei wurde die Expression vorwiegend von Makrophagen / Mikroglia, Astrozyten und Gemistozyten, aber auch von Plexus chorioideus-Zellen getragen. In den subakuten Herden mit Entzündung und den chronischen Läsionen war zusätzlich eine MMP-9-Expression durch die perivaskulär infiltrierenden Zellen vorhanden. Mittels *in-situ*-Hybridisierung konnte ebenfalls ein Anstieg der MMP-9-Expression im Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden. Allerdings kam es dort zu einem weiteren Anstieg in den chronischen Läsionen, der im Gegensatz zu den Ergebnissen der RT-qPCR steht, wo ein Abfallen der Expression in den späten Stadien zu beobachten war (GRÖTERS et al., 2005). Die MMP-9-mRNA-Expression war in der *in-situ*-Hybridisierung, vergleichbar mit den immunhistologischen Befunden von MIAO et al. (2003), intraläsional bei CDV-infizierten Hunden vorwiegend in Gitterzellen, Gemistozyten, Astrozyten und Lymphozyten lokalisiert. Darüber hinaus exprimierten zahlreiche Zellen der perivaskulären, mononukleären Infiltrate MMP-9-mRNA (GRÖTERS et al., 2005). Ähnliche Befunde konnten KHUTH et al. (2001) bei experimentell CDV-infizierten Mäusen erheben. Dabei konnte eine lediglich unwesentlich veränderte MMP-9-mRNA-Expression gemessen werden, die im Gegensatz zu einer stark erhöhten, immunhistologisch und zymographisch bestimmten Proteinexpression bzw. proteolytischen Aktivität stand. Ähnliche Befunde

wie in der vorliegenden Arbeit konnten auch bei der EAE gefunden werden. Dabei wiesen CLEMENTS et al. (1998) die höchste MMP-9-mRNA-Expression bei der EAE zum Zeitpunkt des Auftretens erster klinischer Symptome mit einer danach wieder abfallenden Expression nach. Etwas abweichend zu diesen Daten fanden KIESEIER et al. (1998) die höchste MMP-9-mRNA-Expression zum Zeitpunkt der stärksten klinischen Erkrankungsausprägung. Zeitgleich lag auch die höchste, zymographisch gemessene, MMP-9 Enzymaktivität vor. Im Gegensatz zu den Befunden bei EAE und CDV-infizierten Hunden konnte bei der murinen Theilervirus-Infektion keine Änderung der MMP-9-mRNA-Expression im Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden (ULRICH et al., 2006b). Eine Aufregulierung der MMP-9-Expression ähnlich wie in der vorliegenden Studie wird auch für verschiedene, humane Erkrankungen beschrieben. Dazu gehören unter anderem MS, Apoplexie, HIV-assoziierte Demenz, Herpes-simplex-Virusenzephalitis sowie aseptische und bakterielle Meningitis (LIUZZI et al., 2000; AVOLIO et al., 2003; MARTINEZ-TORRES et al., 2004; BOZ et al., 2006; LINDBERG et al., 2006; ROSELL et al., 2006). Bei der MS wurde in verschiedenen Studien bei Patienten mit klinischer und magnetresonanztomographisch aktiver MS ein deutlich höherer MMP-9-Gehalt im Serum und im Liquor gefunden als bei inaktiven Krankheitsstadien derselben Patienten (FAINARDI et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit lag eine positive Korrelation zwischen der intraläsionalen Anzahl CDV-Nukleoprotein-Antigen-positiver Zellen und der MMP-9-mRNA-Expression vor. Daraus kann möglicherweise gefolgert werden, dass es durch direkte, virale Einflüsse zu einer MMP-9 vermittelten Degradierung der extrazellulären Matrix kommt. Dies könnte ein Faktor sein, der zur initialen, direkt virusvermittelten Demyelinisierung beiträgt.

**MMP-12** zeigte bei allen Gruppen CDV-infizierter Tiere eine erhöhte mRNA-Expression verglichen mit den Kontrollhunden. Zwischen den einzelnen Läsionstypen lagen keine signifikanten Unterschiede vor. Allerdings war im Median die höchste Expression in den subakuten, nicht entzündlichen Herden vorhanden. Zwischen der Anzahl intraläsionaler CDV-Nukleoprotein-Antigen-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> und der MMP-12-mRNA-Expression fand sich eine positive Korrelation. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren immunhistologischen

Untersuchungen, bei denen ebenfalls in akuten und subakuten Läsionen die höchste MMP-12-Expression vorlag (MIAO et al., 2003). MMP-12, das auch als Makrophagen-Elastase bezeichnet wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Leukozytenextravasation und der Myelindegradation (CUZNER und OPDENAKKER, 1999). Mittels *in-situ*-Hybridisierung konnte die höchste MMP-12-mRNA-Expression in Entzündungszellen, vor allem Makrophagen und Mikroglia, lokalisiert werden (PAGENSTECHER et al., 1998). SHIPLEY et al. (1996) stellten fest, dass MMP-12 essentiell für die zelluläre Migration ist, da Makrophagen bei MMP-12 –„knock-out“-Mäusen sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* nahezu keine migratorische Kapazität aufwiesen, wenn sie mit Makrophagen von Wildtyp-Mäusen verglichen wurden. Ähnlich wie in der vorliegenden Studie konnte bei EAE und der murinen Theilervirus-Enzephalomyelitis eine starke Aufregulierung der MMP-12-mRNA-Expression bei erkrankten bzw. infizierten Tieren verglichen mit gesunden Kontrollmäusen nachgewiesen werden (TOFT-HANSEN et al., 2004; ULRICH et al., 2006b). Ein weiteres MS-Tiermodell, bei dem ebenfalls eine Aufregulierung sowohl der MMP-12-mRNA- als auch –Protein-Expression bei erkrankten Tieren gefunden wurde ist eine experimentell induzierte Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ in Rattengehirnen (ANTHONY et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit zeigte MMP-12 die höchste mRNA-Expression in akuten und subakuten Staupeläsionen, war aber auch bei entzündlichen Läsionen höher exprimiert als bei Kontrolltieren. Zusätzlich war in den subakuten und entzündlichen Plaques die größte Anzahl Mikroglia und mononukleärer Entzündungszellen vorhanden. Dies könnte für eine Hypersensitivitätsreaktion vom verzögerten Typ sprechen, wie sie von WÜNSCHMANN et al. (1999) in Kombination mit einer Antikörper-vermittelten Zytotoxizität für die Pathogenese von subakuten und entzündlichen Läsionen CDV-infizierter Hunde vermutet wird. Bei Patienten mit aktiven MS-Läsionen finden sich, vergleichbar mit entzündlichen Staupeläsionen, Makrophagen sowohl im Parenchym als auch perivaskulär (BRÜCK et al., 1996). VOS et al. (2003) konnten in diesen Makrophagen MMP-12 nachweisen und schlossen daraus, dass MMP-12, eventuell in Kombination mit anderen MMPs, durch eine lokale Degradierung der Basallamina-Komponenten und der extrazellulären Matrix zu einer Migration dieser Zellen geführt

haben könnte. Darüber hinaus könnte ein Abbau der extrazellulären Matrix in der Umgebung der Myelinscheiden eine Akkumulation von Makrophagen in dieser Lokalisation fördern (SHIPLEY et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit war die Mehrzahl der Mikroglia / Makrophagen intra- bzw. periläsional lokalisiert, so dass vermutet werden kann, dass diese Zellen eine Hauptquelle der MMP-12-Produktion darstellen und wie von CHANDLER et al. (1996) diskutiert wird neben ihrer Fähigkeit extrazelluläre Matrix zu spalten auch basisches Myelinprotein abbauen.

Die **TIMP-1**-mRNA-Expression wies einen signifikanten Anstieg bei allen Gruppen CDV-infizierter Hunde gegenüber den Kontrolltieren auf. Bei den infizierten Hunden war die höchste TIMP-1-mRNA-Expression bei den subakuten Läsionen ohne Entzündung vorhanden, gefolgt von den entzündlichen Herden und den akuten Plaques, wobei der Anstieg von den akuten zu den subakuten Läsionen ohne Entzündung ebenfalls signifikant war. Im Gegensatz zu diesen Befunden wiesen GRÖTERS et al. (2005) mittels *in-situ*-Hybridisierung eine stetige Zunahme der Anzahl TIMP-1-mRNA-exprimierender Zellen von den Kontrolltieren zu den chronischen CDV-Läsionen nach. Dabei handelte es sich in akuten Läsionen überwiegend um eine neuronale und astrozytäre Expression. In subakuten, entzündlichen und chronischen Läsionen dagegen bestand die Mehrzahl der positiv markierten Zellen aus infiltrierenden, mononukleären Entzündungszellen. Die Differenzen, die sich in der mRNA-Expression zwischen *in-situ*-Hybridisierung und RT-qPCR ergaben, lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, dass die TIMP-1-Expression in den Astrozyten pro Zelle stärker ausgeprägt ist als bei infiltrierenden, mononukleären Entzündungszellen und sich damit eine erhöhte Gesamtzahl exprimierender Zellen in den chronischen Läsionen bei reduzierter Gesamtexpression ergibt. Auch auf Proteinebene konnte eine erhöhte TIMP-1-Expression bei CDV-infizierten Hunden nachgewiesen werden (MIAO et al., 2003). Bei der murinen Theilervirus-Enzephalomyelitis lag eine mittel- bis hochgradige Aufregulierung der TIMP-1-mRNA-Expression vor, die einen Peak in der frühen und einen weiteren in der späten Infektionsphase aufwies. Es wird vermutet, dass es sich dabei in der frühen Infektionsphase um eine Reaktion auf die neuronale Infektion handelt und in der späten Infektionsphase um eine astrozytäre Expression (ULRICH

et al., 2006b). In der vorliegenden Arbeit fand sich die höchste TIMP-1-mRNA-Expression in den subakuten Herden, was vergleichbar mit den Befunden bei der murinen Theilervirus-Enzephalomyelitis für eine astrozytäre Reaktion sprechen könnte, da dies auch der Läsionstyp mit der höchsten Anzahl GFAP-positiver Astrozyten war. Bei EAE stellten TOFT-HANSEN et al. (2004) eine Erhöhung der TIMP-1-mRNA-Expression, die vorwiegend von Makrophagen getragen wurde, fest. Die Tatsache, dass TIMP-1 von Makrophagen exprimiert wurde, weist darauf hin, dass Makrophagen bei EAE und MS möglicherweise durch eine Regulation des MMP-/TIMP-Verhältnisses eine Rolle bei der Steuerung der MMP-Aktivität spielen. In MS-Studien fanden sich widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der TIMP-1-Expression. Manche Autoren finden mit einer Erhöhung der TIMP-1-Expression verglichen mit gesunden Kontrollen ähnliche Ergebnisse wie bei EAE (LEE et al., 1999; ÖZENCI et al., 1999), wohingegen in anderen Studien eine Reduktion der TIMP-1 Menge nachgewiesen wurde (AVOLIO et al., 2003; BOZ et al., 2006). In der vorliegenden Studie konnte eine positive Korrelation zwischen der TIMP-1-mRNA-Expression und der Anzahl CDV-Nukleoprotein-Antigen-positiver Zellen gefunden werden. Zusätzlich bestand eine positive Korrelation zwischen der TIMP-1-mRNA-Expression und der intraläsionalen Anzahl GFAP-positiver Zellen. Mit immunhistologischen Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Mehrzahl aller CDV-infizierten Zellen in akuten Läsionen um Astrozyten handelt (MUTINELLI et al., 1989; ALLDINGER et al., 2000). Laut PAGENSTECHER et al. (1998) sind bei der EAE Astrozyten der vorherrschende Zelltyp bei der TIMP-1-Produktion, wohingegen MMPs eher von Makrophagen / Mikroglia und einwandernden Entzündungszellen produziert werden. Dadurch, dass sowohl die Anzahl GFAP-positiver Astrozyten als auch die TIMP-1- und RECK-mRNA-Expression in der Gruppe mit subakuten Läsionen ohne Entzündung am höchsten waren, kann vermutet werden, dass die Astrogliose einen Versuch der Eindämmung neurodegenerativer Veränderungen darstellt, da FAULKNER et al. (2004) in einem transgenen Mausmodell zeigten, dass die Schwere eines Rückenmarktraumas deutlich zunimmt, wenn keine reaktiven Astrozyten vorhanden sind. In diesem Modell wurden Mäuse verwandt, bei denen Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase an den

GFAP-Promotor gekoppelt wurde, so dass durch Ganciclovir-Gabe die Teilung reaktiver Astrozyten verhindert werden konnte (BUSH et al., 1998). Das Fehlen reaktiver Astrozyten führte zu einer verminderten Regeneration der Blut-Hirn-Schranke, erhöhten Entzündungszellinfiltrationen und einer stark erhöhten Degeneration der grauen und weißen Substanz, resultierend in Degenerationen von Neuronen und Oligodendrozyten sowie einer erhöhten Demyelinisierung (BUSH et al., 1998; FAULKNER et al., 2004). In chronischen, entzündlichen Stadien der CDV-Infektion kommt es zu einer Reduktion der Astrozytenzahl im Läsionszentrum, wohingegen ein gliotischer Randsaum bestehen bleibt (GRÖTERS et al., 2005; SEEHUSEN, 2006). Möglicherweise handelt es sich auch hierbei um den Versuch einer regionären Begrenzung der Demyelinisierung, indem das MMP- / TIMP-Verhältnis zugunsten inhibitorischer Faktoren verschoben wird.

Über den Einfluss der **RECK**-Expression bei entzündlichen Veränderungen ist bislang nur wenig bekannt. Bisher liegt lediglich eine Studie von VAN LENT et al. (2005) über die Expression und Lokalisation von RECK bei Patienten mit rheumatoider Arthritis vor. Dabei fanden die Autoren eine RECK-Expression in der Synovialmembran sowohl bei Patienten mit rheumatoider Arthritis als auch bei Osteoarthritis und gesunden Kontrollen. RECK-mRNA war dabei am niedrigsten in Synovialmembranen von Patienten mit rheumatoider Arthritis exprimiert. Mittels konfokaler Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in der Synovialis lediglich eine zytoplasmatische RECK-Expression aufweisen, wohingegen RECK in Fibroblasten auch auf der Zellmembran nachgewiesen werden konnte (VAN LENT et al., 2005). RECK zeigte eine signifikante Erhöhung der mRNA Expression bei den subakuten Läsionen ohne Entzündung verglichen mit den gesunden Kontrolltieren. Da RECK in der Lage ist, mehrere MMPs, darunter auch MMP-9 zu hemmen (TAKAHASHI et al., 1998), kann die erhöhte Expression, parallel zu derjenigen von MMP-9 möglicherweise als gegenregulatorische Maßnahme zur Verhinderung einer schwerwiegenden Matrixdegeneration aufgefasst werden. Darüber hinaus könnte eine Aufregulierung der RECK-Expression in der Gruppe mit subakuten Staupeläsionen als Versuch der Integrationssicherung der extrazellulären Matrix aufgefasst werden, um durch eine Hemmung der MMP-9-Aktivität zu einer



verminderten Infiltration mit Entzündungszellen zu führen. Weiterhin lag eine positive Korrelation der RECK-mRNA-Expression mit der Anzahl intraläsionaler CDV-Nukleoprotein-Antigen- und BS-1-positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> vor. Es kann vermutet werden, dass eine erhöhte RECK-Expression neuroprotektive Funktionen aufweist, da möglicherweise eine weitere, MMP-vermittelte Degradation der extrazellulären Matrix und des Myelins gemindert wird. Dieses ist allerdings möglicherweise auf mRNA-Ebene nicht verifizierbar, da laut RHEE und COUSSENS (2002) sowohl bei der MMP- als auch bei der RECK-Aktivität komplexe, post-transkriptionelle Regulierungsmechanismen vorliegen. Dabei reguliert RECK post-transkriptionell sowohl MMP-2 als auch MMP-9 und -14. Funktionell kommt es durch membrangebundenes RECK zu einer Hemmung der Sekretion von pro-MMP-9, wohingegen sowohl membrangebundenes als auch lösliches RECK direkt die katalytische Aktivität von MMP-2, -9 und -14 inhibieren kann (RHEE und COUSSENS, 2002).

In die Gruppe der Gene mit nur **unwesentlich veränderter Expression** fallen MMP-13, MMP-14 und TIMP-2. Die **MMP-13**-mRNA-Expression wies, vergleichbar mit den immunhistologischen Daten von MIAO et al. (2003), keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und verschiedenen Stadien CDV-infizierter Hunde auf. Bei EAE ergaben sich differierende Aussagen über die MMP-13 Expression, so konnten PAGENSTECHER et al. (1998) eine geringgradige Aufregulierung der MMP-13-mRNA-Expression nachweisen, während CLEMENTS et al. (1997) und TOFT-HANSEN et al. (2004) keine deutlichen Änderungen gegenüber den gesunden Kontrollen feststellten. Bei der murinen Theilervirus-Enzephalomyelitis findet sich eine Aufregulierung der MMP-13-mRNA-Expression sowohl in frühen, wie auch in späten Infektionsphasen (ULRICH et al., 2006b). Darüber hinaus liegen Beobachtungen vor, dass es zu einer erhöhten MMP-13-Expression bei Apoplexie-Patienten und bei experimenteller, bakterieller Meningitis kommt (KIESEIER et al., 1999; HORSTMANN et al., 2003).

**MMP-14** zeigte keine Änderung der mRNA-Expression zwischen Kontrolltieren und verschiedenen Stadien CDV-infizierter Hunde. Auf Proteinebene konnte mittels Immunhistologie eine Zunahme der Anzahl positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> vor allem in

subakuten Herden ohne Entzündung nachgewiesen werden (MIAO et al., 2003). Die Erhöhung der MMP-14-Expression, die auf mRNA-Ebene in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden konnte, ist möglicherweise auf eine verminderte Endozytose von MMP-14 und daraus folgender reduzierter Degradierung zurückzuführen, da JIANG et al. (2001) zeigten, dass es *in vitro* zu einer erhöhten MMP-14 Aktivität kam, wenn die Dynamin-abhängige Endozytose gehemmt war. Diese ist dafür verantwortlich, dass es zu einem Transport von MMP-14 in die Endosomen mit einer dort lokalisierten Degradierung kommt. In einer weiteren Untersuchung wurde eine im Verlauf der Erkrankung zunehmende Anzahl MMP-14 positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> bei CDV-infizierten-Hunden mittels *in-situ*-Hybridisierung nachgewiesen (GRÖTERS et al., 2005). Gleichartige Befunde ergaben sich bei der Theilervirus-Enzephalomyelitis, bei der ULRICH et al. (2006b) in chronischen Stadien eine Aufregulierung der MMP-14-mRNA-Expression feststellten. Diese abweichenden Ergebnisse sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass MMP-14 überwiegend von Mikroglia, Makrophagen, Astrozyten, Gemistozyten und perivaskulären, mononukleären Entzündungszellen exprimiert wird (MIAO et al., 2003). Die Quantität dieser Zellen ist zwar deutlichen, intraläsionalen Schwankungen in den einzelnen Plaque-Typen unterworfen, allerdings änderte sich die jeweilige Zellzahl pro Schnitt nur unwesentlich, da die unveränderte, extraläsionale Fläche proportional meist deutlich größer war als die intraläsionalen Areale. Bei EAE ergab sich ein, von der Tierart abhängiges, differenziertes MMP-14-Expressionsmuster. Bei Mäusen fand sich eine Aufregulierung der MMP-14-mRNA-Expression mittels *in-situ*-Hybridisierung und RT-qPCR, wohingegen keine Änderungen bei Ratten gemessen werden konnten (CLEMENTS et al., 1997; PAGENSTECHER et al., 1998, TEESALU et al., 2001, TOFT-HANSEN et al., 2004). Bei MS-Patienten fanden KOUWENHOVEN et al. (2001) in Blutmonozyten keine Änderung der MMP-14-mRNA-Expression verglichen mit gesunden Kontrollen. GALBOIZ et al. (2001) und BAR-OR et al. (2003) dagegen konnten eine Aufregulierung der MMP-14-mRNA-Expression nachweisen. Die Befunde bei EAE und MS entsprechen demnach je nach Studie denjenigen der vorliegenden Arbeit.

**TIMP-2** wies keine Änderung der mRNA-Expression zwischen Kontrolltieren und verschiedenen Stadien CDV-infizierter Hunde auf. Diese Ergebnisse differieren von denjenigen, die MIAO et al. (2003) auf Proteinebene erhoben haben. Dabei fand sich eine erhöhte TIMP-2 Expression in akuten Läsionen, die mit der Chronizität der Veränderungen wieder abfiel. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine erhöhte Translation bei gleich bleibender Transkriptionsaktivität. Vergleichbar zu den Befunden dieser Arbeit waren bei der EAE ebenfalls keine signifikanten Änderungen der TIMP-2-mRNA vorhanden (PAGENSTECHEER et al., 1998; TOFT-HANSEN et al., 2004). Auch bei der murinen Theilervirus-Enzephalomyelitis konnten ULRICH et al. (2006b) nur geringfügige Änderungen der TIMP-2-mRNA-Expression feststellen, die sich in der späten Infektionsphase in einer geringgradigen Aufregulierung manifestierten. Bei Patienten mit MS wurden widersprüchliche Daten bezüglich der TIMP-2-Expression gefunden. In Blutmonozyten fanden LICHTINGHAGEN et al. (1999) und ÖZENCI et al. (1999) keine signifikanten Unterschiede in der TIMP-2-mRNA-Expression zwischen Kontrollen und MS Patienten. Eine andere Studie dagegen berichtet über eine erhöhte TIMP-2-Expression im Serum bei Patienten mit MS (LEE et al., 1999). AVOLIO et al. (2003) stellten eine erhöhte TIMP-2-Expression bei Patienten mit schubartig remittierender MS fest, nicht aber bei Patienten mit primär oder sekundär progressiver MS. In der vorliegenden Arbeit fand sich bei CDV-infizierten Hunden eine negative Korrelation zwischen der TIMP-2-mRNA-Expression und der Anzahl intraläsionaler CDV-Nukleoprotein-Antigen-positiver Zellen. Weiterhin bestand eine negative Korrelation zwischen der TIMP-2-mRNA-Expression und der intraläsionalen Anzahl GFAP-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup>. Insgesamt ergaben sich in der TIMP-2-mRNA-Expression weder Unterschiede zwischen Kontrolltieren und CDV-infizierten Tieren noch zwischen den einzelnen Läsionstypen untereinander. Daraus kann möglicherweise abgeleitet werden, dass es bei einer Erhöhung der Anzahl CDV-Nukleoprotein-Antigen- bzw. GFAP-positiver Zellen pro mm<sup>2</sup> intraläsional zu einer Abnahme der TIMP-2-Expression kommt, wohingegen das umliegende, normal erscheinende Gewebe eine Aufregulierung aufweist. Da die Quantifizierung in der vorliegenden Studie an kompletten Kleinhirnschnitten durchgeführt wurde, lassen sich derartige Variationen nicht beurteilen. ROSENBERG (2002) stellte fest, dass es

abhängig von der TIMP-2-Konzentration zu gegenteiligen funktionellen Auswirkungen kommen kann. Niedrigen TIMP-2-Konzentrationen kam dabei ein fördernder Effekt auf die Aktivierung von MMP-2 zu, wohingegen in höheren Konzentrationen eine Hemmung auftrat. In der vorliegenden Studie könnte dies ebenfalls zutreffen, da aufgrund der verwendeten Methodik nicht bekannt ist, ob Unterschiede in den Konzentrationen und Relationen von MMPs und TIMPs zueinander innerhalb der Herde bzw. extraläsional vorliegen.

### 5.2.3 Schlussbetrachtung

Die Pathogenese der Demyelinisierung bei der Staupeenzephalitis ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt. Initial wird eine direkt virusinduzierte Genese angenommen, wohingegen in späteren Stadien immunpathologische Prozesse die Entmarkung dominieren (SUMMERS und APPEL, 1994; BAUMGÄRTNER und ALLDINGER, 2005). Zusammenfassend muss angenommen werden, dass es aufgrund der zeitlich variierenden Expressionsmuster der MMP-, TIMP- und RECK-Expression zu einer Imbalance zwischen proteolytischen Enzymen und inhibitorischen Faktoren kommt. Dabei konnte in subakuten Läsionen ohne Entzündung eine starke Aufregulation von MMP-9 und -12 nachgewiesen werden, die nur teilweise von einer gegenregulatorischen TIMP-1- und RECK-Erhöhung begleitet war. Ein weiterer direkter Inhibitor von MMP-9 und -12, TIMP-2 zeigte dagegen keine Änderung der Expression. Da in der vorliegenden Arbeit vornehmlich eine Quantifizierung der mRNA-Expression in kompletten Kleinhirnschnitten vorgenommen wurde, können keine Aussagen über die räumliche Verteilung bzw. den Hauptsyntheseort der untersuchten Gene getroffen werden. Um genauere Kenntnisse über die Bedeutung der gemessenen mRNA-Expressionen zu erhalten, sollten weitere, funktionelle Untersuchungen der proteolytischen Aktivität mit *in-situ*-Zymographie in den unterschiedlichen Stadien der demyelinisierenden Staupeenzephalitis durchgeführt werden. Bei der Regulierung, Aktivierung und Hemmung der MMPs handelt es sich um ein hochkomplexes Geschehen, das anhand von Tiermodellen mit bestimmten MMP-transgenen „knock-out“-Mäusen untersucht werden sollte, um den Einfluss der unterschiedlichen proteolytischen

Gene auf die Pathogenese und den zeitlichen Verlauf demyelinisierender ZNS-Erkrankungen näher zu charakterisieren.

## 6 Zusammenfassung

### **Matrix-Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes – eine molekularbiologische *in vivo* und *in vitro* Studie -**

**Christina Puff**

Im Literaturteil erfolgt eine kurze Übersicht über die Klassifikation der Morbilliviren, ihr Wirtsspektrum und die Pathogenese der kaninen CDV-Infektion. Weiterhin wird eine kurze Zusammenfassung über die Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes gegeben. Ein weiterer Teilaspekt widmet sich den Paramyxoviren als onkolytische Viren. Darüber hinaus werden die Klassifizierung, der Aufbau, die Aktivierung, die Regulation und die Substrate der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihrer Inhibitoren erläutert und ihre Rolle anhand verschiedener physiologischer und pathologischer Prozesse verdeutlicht. Zusätzlich wird auf die Eigenschaften und Funktionen des Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) als MMP-Inhibitor eingegangen.

Im Rahmen einer Pilotstudie werden nicht infizierte und persistierend CDV-infizierte DH82-Zellen bezüglich ihrer MMP-mRNA-Expression mittels Reverser Transkriptase quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) verglichen. Bei der mRNA-Expression der untersuchten Gene ergaben sich drei Gruppen mit einem jeweils gemeinsamen Expressionsmuster. Es fanden sich Gene mit signifikant herabregulierter (MMP-2, TIMP-1, TIMP-2), signifikant aufregulierter (MMP-13, MMP-14, RECK) Expression in den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen und solche, mit nur unwesentlich veränderter Expression (MMP-9). GAPDH-mRNA war bei allen, CDV-mRNA bei allen persistierend infizierten DH82-Zellen nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei den persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen zu einer ausgeprägten Herabregulierung der MMP-2-mRNA-Expression

kommt. Zugleich liegt eine erhöhte RECK-Expression vor. Daraus lässt sich möglicherweise schließen, dass es zu einer Virus-induzierten, RECK-vermittelten Inhibition der proteolytischen Kapazität der DH82-Zellen kommt, die zu einer Reduktion der Invasivität dieser Zellen führen könnte. Widersprüchlich zu diesen Daten fand sich eine Erhöhung der mRNA-Expression, unter anderem von MMP-13 und MMP-14, was für das Vorhandensein einer proteolytischen Kaskade sprechen könnte, die ihrerseits die invasiven Eigenschaften der Zellen erhöht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die Kleinhirne von insgesamt 34 Hunden, von denen 26 eine CDV-Infektion aufwiesen und 8 einer klinisch gesunden Kontrollgruppe entstammten, untersucht.

Die histochemischen und immunhistologischen Untersuchungen sowie die RNA-Isolierung fanden an O.C.T. eingebetteten Kleinhirnproben statt. Hierbei wurden die Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin (HE)- und einer Luxol-Fast-Blue Kresylechtviolett (LFB-KV)-Färbung zur Darstellung des Demyelinisierungsgrades unterzogen. Mittels Immunhistologie erfolgte der Nachweis von CDV-Nukleoprotein-Antigen und die Phänotypisierung der beteiligten Zellpopulationen mit Antikörpern, die Astrozyten (GFAP) und Lymphozyten (CD3, CD21) positiv markierten. Die Darstellung von Mikroglia und Makrophagen erfolgte mit dem Lektin BS-1.

Die mRNA-Expression von MMP-2, -9, -12, -13, -14, TIMP-1, -2, RECK, CDV und GAPDH wurde mittels RT-qPCR untersucht.

Die Kontrolltiere und die CDV-infizierten Hunde wurden anhand des histologischen Bildes und des immunhistologischen Nachweises von CDV-Nukleoprotein in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 bestand aus den gesunden Kontrolltieren, Gruppe 2 aus den Hunden mit akuten Läsionen, Gruppe 3 aus den Tieren mit subakuten, nicht entzündlichen Staupherden mit Entmarkung und Gruppe 4 aus den Tieren mit entzündlichen, demyelinisierten Plaques.

Bei allen CDV-infizierten Tieren war CDV-Nukleoprotein-Antigen nachweisbar, wobei unterschiedlich starke Ausprägungen und Intensitäten vorlagen. CDV-mRNA war bei allen infizierten Tieren detektierbar. GFAP-positive Zellen waren in allen untersuchten Gruppen vorhanden, wobei sich eine signifikante Zunahme der intraläsionalen Anzahl bei subakuten, nicht entzündlichen Herden im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab. Bei den entzündlichen Läsionen lag eine zonale, intraläsionale Verteilung der Astrozyten vor. Zentral waren nur noch wenige Astrozyten vorhanden, wohingegen in der Peripherie ein gliotischer Randsaum nachweisbar war. Eine Erhöhung der Anzahl CD3- und CD21-positiver Lymphozyten fand sich in der Gruppe der entzündlichen Herdveränderungen. Die Anzahl BS-1-positiver Makrophagen / Mikroglia war sowohl bei den subakuten Plaques ohne Entzündung als auch bei den entzündlichen Herden signifikant höher als bei den Kontrolltieren oder den Hunden mit akuten Läsionen.

Bei der mRNA-Expression der untersuchten Gene ergaben sich drei Gruppen mit einem jeweils gemeinsamen, läsionstypabhängigem Expressionsmuster. Es fanden sich Gene mit signifikant herabregulierter Expression in den akuten Herden (MMP-2), signifikant aufregulierter Expression vor allem in den akuten und subakuten Plaques ohne Entzündung (MMP-9, MMP-12, TIMP-1 und RECK) und solche mit nur unwesentlich veränderter Expression (MMP-13, MMP-14, TIMP-2). GAPDH-mRNA war bei allen, CDV-mRNA bei allen infizierten Tieren nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in akuten und subakuten, nicht entzündlichen Läsionen der CDV-Infektion zu einer Aufregulierung der MMP-9- und MMP-12-mRNA-Expression kommt, was für eine initiale, direkt Virus-vermittelte Degradierung der extrazellulären Matrix sprechen könnte, die zur Demyelinisierung beiträgt, da eine positive Korrelation zwischen der Anzahl intraläsionaler CDV-Nukleoprotein-Antigen-positiver Zellen und der MMP-12-mRNA-Expression nachweisbar war. Sowohl die Anzahl GFAP-positiver Astrozyten, als auch die TIMP-1- und RECK-mRNA-Expression waren in der Gruppe mit subakuten Läsionen ohne Entzündung am höchsten, so dass vermutet werden kann, dass TIMP-1 und RECK



von Astrozyten exprimiert werden. Dies könnte zu einer Hemmung der Matrixdegeneration in der direkten Umgebung der Astrozyten führen und somit könnten TIMP-1 und RECK Myelin-protective Faktoren darstellen.

## 7 Summary

### **Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine demyelinating distemper encephalitis – a molecular biological *in vivo* and *in vitro* study –**

**Christina Puff**

In the literature section a short overview about the classification of morbilliviruses, their hosts and the pathogenesis of canine distemper virus (CDV) infection is given. Additionally, a short summary of the pathogenesis of canine demyelinating distemper encephalitis is provided. Another part deals with paramyxoviruses as oncolytic viruses. Furthermore, classification, structure, activation, regulation and substrates of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors are detailed. In addition, the characteristics and functions of the reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) as an inhibitor of MMPs are elucidated.

In a pilot study, non infected and persistently CDV infected DH82 cells were compared concerning their MMP-mRNA expression pattern using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The genes investigated could be divided according to their mRNA-expression profile in three groups. There are genes with a significant down- (MMP-2, TIMP-1, TIMP-2) or up-regulation (MMP-13, MMP-14, RECK) and with no significant changes (MMP-9) in the persistently CDV-infected DH82 cells. GAPDH mRNA was detected in all samples, CDV mRNA only in persistently CDV-infected DH82 cells.

Summarized, the persistently CDV-infected DH82 cells showed a marked down-regulation of the MMP-2 mRNA expression and, simultaneously, an up-regulation of the RECK-mRNA expression. This might indicate a virally induced inhibition of the

proteolytic capacity of DH82 cells due to the up-regulation of RECK. This effect may lead to a reduced invasive potential of tumor cells. Contrary, an up-regulation of the mRNA expression of MMP-13 and MMP-14 was found. Possibly, this contributes to a proteolytic cascade with an increase of the invasive properties of DH82 cells.

In the second part of the study, the cerebella of 34 dogs, 26 of the animals infected with CDV and 8 healthy control dogs, were investigated. Histochemical and immunohistological investigations as well as mRNA-isolation were performed, using O.C.T. embedded cerebella. A hematoxylin – eosin and luxol fast blue kresyl echt violet stain, for determination of the degree of demyelination, have been used. Immunohistologically, CDV-nucleoprotein-antigen was detected. Antibodies specific for astrocytes (GFAP) and lymphocytes (CD3, CD21) were used for phenotyping of the involved cells. Microglia and macrophages were marked with the lectin BS-1. The mRNA expression of MMP-2, -9, -12, -13, -14, TIMP-1, -2, RECK, CDV and GAPDH were investigated using RT-qPCR.

The healthy control animals and the CDV infected dogs were classified into 4 groups on the basis of the histopathological investigations and the detection of CDV nucleoprotein. Group 1 consisted of the healthy animals, group 2 of the dogs with acute lesions, group 3 of the animals with subacute, demyelinating plaques without inflammation and group 4 of the dogs with inflammatory, demyelinating lesions.

CDV nucleoprotein antigen could be demonstrated in all CDV infected animals with varying quantity and intensity. CDV mRNA was detectable in all infected dogs. GFAP positive cells were found in all groups with a significant increase in the intralesional number in non inflammatory plaques, compared to healthy dogs. The inflammatory lesions showed a zonal, intralesional distribution of the astrocytes. Centrally there were only few astrocytes and the periphery demonstrated a gliotic border. An increase in the amount of CD3 and CD21 positive cells was found in the inflammatory plaques. The number of BS-1 positive macrophages / microglia was

significantly increased in subacute plaques without inflammation and inflammatory lesions compared to healthy dogs and acute plaques.

The genes investigated, could be divided in three groups, each with a lesion-type dependent mRNA expression profile. There were genes with a significant down-regulation in the acute lesions (MMP-2), significant up-regulation mainly in the acute and subacute plaques without inflammation (MMP-9, MMP-12, TIMP-1, RECK) and others with only minor changes in the mRNA expression (MMP-13, MMP-14, TIMP-2). GAPDH mRNA was detected in all, CDV mRNA in all infected dogs.

Summarized, an up-regulation of the MMP-9 and MMP-12 expression in acute and subacute non inflammatory lesions of nervous distemper could possibly be an indicator for an initial, direct virally mediated degradation of the extracellular matrix. This might contribute to demyelination, because there is a positive correlation between the intralesional number of CDV-nucleoprotein-positive cells and MMP-12 mRNA expression. Both, the number of GFAP-positive astrocytes and the TIMP-1 and RECK mRNA expression are highest in the group with subacute lesions without inflammation, therefore it could be speculated, that TIMP-1 as well as RECK are expressed by astrocytes. This might lead to an inhibition of matrix degradation in the directly adjacent environment of the astrocytes. Therefore TIMP-1 and RECK might represent myelin-protecting factors.

## 8 Literaturverzeichnis

**ALA-AHO, R., N. JOHANSSON, A. H. BAKER und V. M. KAHARI (2002):**

Expression of collagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells.

Int. J. Cancer 97, 283-289

**ALEXANDER, D. J. (2000):**

Newcastle disease and other avian paramyxoviruses.

Rev. Sci. Tech. 19, 443-462

**ALLDINGER, S., W. BAUMGÄRTNER und C. ÖRVELL (1993):**

Restricted expression of viral surface proteins in canine distemper encephalitis.

Acta Neuropathol. 85, 635-645

**ALLDINGER, S., A. WÜNSCHMANN, W. BAUMGÄRTNER, C. VOSS und E. KREMMER (1996):**

Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis.

Acta Neuropathol. 92, 273-280

**ALLDINGER, S., S. FONFARA, E. KREMMER und W. BAUMGÄRTNER (2000):**

Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques.

Acta Neuropathol. 99, 138-146

**ANDERSON, B. D., T. NAKAMURA, S. J. RUSSELL und K. W. PENG (2004):**

High CD46 receptor density determines preferential killing of tumor cells by oncolytic measles virus.

Cancer Res. 64, 4919-4926

**ANTHONY, D. C., K. M. MILLER, S. FEARN, M. J. TOWNSEND, G. OPDENAKKER, G. M. WELLS, J. M. CLEMENTS, S. CHANDLER, A. J. GEARING und V. H. PERRY (1998):**

Matrix metalloproteinase expression in an experimentally-induced DTH model of multiple sclerosis in the rat CNS.

J. Neuroimmunol. 87, 62-72

**APPEL, M. J. G. (1969):**

Pathogenesis of canine distemper.

Am. J. Vet. Res. 30, 1167-1182

**APPEL, M. J. G. (1987):**

Canine distemper virus.

In: Horzinek, M. C. M. (Hrsg.) Virus infections of vertebrates Vol. 1. Elsevier Science Publishers b. V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, pp133-159

- APPEL, M. J., C. REGGIARDO, B. A. SUMMERS, S. PEARCE-KELLING, C. J. MARE, T. H. NOON, R. E. REED, J. N. SHIVELY und C. ÖRVELL (1991):**  
Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinass (collared peccaries).  
Arch. Virol. 119, 147-152
- APPEL, M. J., R. A. YATES, G. L. FOLEY, J. J. BERNSTEIN, S. SANTINELLI, L. H. SPELMAN, L. D. MILLER, L. H. ARP, M. ANDERSON, M. BARR, ET AL. (1994):**  
Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America.  
J. Vet. Diagn. Invest. 6, 277-288
- ASADA, T. (1974):**  
Treatment of human cancer with mumps virus.  
Cancer 34, 1907-1928
- AVOLIO, C., M. RUGGIERI, F. GIULIANI, G. M. LIUZZI, R. LEANTE, P. RICCIO, P. LIVREA und M. TROJANO (2003):**  
Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes.  
J. Neuroimmunol. 136, 46-53
- AXTHELM, M. K. und S. KRAKOWKA (1987):**  
Canine distemper virus: the early blood-brain barrier lesion.  
Acta Neuropathol. 75, 27-33
- BAILEY, D., A. BANYARD, P. DASH, A. OZKUL und T. BARRETT (2005):**  
Full genome sequence of peste des petits ruminants virus, a member of the Morbillivirus genus.  
Virus Res. 110, 119-124
- BAKER, A. H., D. R. EDWARDS und G. MURPHY (2002):**  
Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.  
J. Cell Sc. 115, 3719-3727
- BARBER, G. N. (2004):**  
Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector.  
Viral Immunol. 17, 516-527
- BARNES, A., A. BEE, S. BELL, W. GILMORE, A. MEE, R. MORRIS und S. D. CARTER (2000):**  
Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82.  
J. Vet. Immunol. Immunopathol. 75, 9-25

- BARON, M. D., Y. KAMATA, V. BARRAS, L. GOATLEY und T. BARRETT (1996):**  
The genome sequence of the virulent Kabete 'o' strain of rinderpest virus:  
comparison with the derived vaccine.  
J. Gen. Virol. 77, 3041-3046
- BAR-OR, A., R. K. NUTTALL, M. DUDDY, A. ALTER, H. J. KIM, I. IFERGAN, C. J. PENNINGTON, P. BOURGOIN, D. R. EDWARDS und V. W. YONG (2003):**  
Analysis of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis.  
Brain 126, 2738-2749
- BARRETT, T., P. WOHLSEIN, C. A. BIDEWELL und C. F. ROWELL (2004):**  
Canine distemper virus in a californian sea lion (*Zalophus californianus*).  
Vet. Rec. 154, 334-336
- BAUMGÄRTNER, W., C. ÖRVELL und M. REINACHER (1989):**  
Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissue.  
Acta Neuropathol. 78, 504-512
- BAUMGÄRTNER, W. (1993):**  
Virale Infektionskrankheiten bei Welpen und Junghunden unter besonderer Berücksichtigung der Staupevirusinfektion.  
Prakt. Tierarzt 74, 26-32
- BAUMGÄRTNER, W. und S. ALLDINGER (2005):**  
The pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination.  
in: "Experimental models of multiple sclerosis". Editiert von E. Lavi und C. S. Constantinescu, Springer Science + Business Media, Inc., U.S.A.
- BELLINI, W. J., J. S. ROTA und P. A. ROTA (1994):**  
Virology of measles virus.  
J. Infect. Dis. 170 Suppl. 1: S15-S23
- BESTETTI, G., R. FATZER und R. FANKHAUSER (1978):**  
Encephalitis following vaccination against distemper and infectious hepatitis in the dog. An optical and ultrastructural study.  
Acta Neuropathol. 43, 69-75
- BLUMING, A. Z. und J. L. ZIEGLER (1971):**  
Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection.  
Lancet 2, 105-106
- BODE, W., C. FERNANDEZ-CATALAN, H. TSCHESCHE, F. GRAMS, H. NAGASE und K. MASKOS (1999):**  
Structural properties of matrix metalloproteinases.  
Cell Mol. Life Sci. 55, 639-652

- BÖHLE, A. S. und H. KALTHOFF (1999):**  
Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis.  
Langenbecks Arch. Surg. 384, 133-140
- BOSSART, K. N., L. F. WANG, M. N. FLORA, K. B. CHUA, S. K. LAM, B. T. EATON und C. C. BRODER (2002):**  
Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins.  
J. Virol. 76, 11186-11198
- BOUDREAU, N., C. J. SYMPSON, Z. WERB und M. J. BISSELL (1995):**  
Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix.  
Science 267, 891-893
- BOZ, C., M. OZMENOGLU, S. VELIOGLU, K. KILINC, A. OREM, Z. ALIOGLU und V. ALTUNAYOGLU (2006):**  
Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta.  
Clin. Neurol. Neurosurg. 108, 124-128
- BREW, K., D. DINAKARPANDIAN und H. NAGASE (2000):**  
Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.  
Biochim. Biophys. Acta 1477, 267-283
- BRÜCK, W., N. SOMMERMEIER, M. BERGMANN, U. ZETTL, H. H. GOEBEL, H. A. KRETZSCHMAR und H. LASSMANN (1996):**  
Macrophages in multiple sclerosis.  
Immunobiology 195, 588-600
- BUSH, T. G., T. C. SAVIDGE, T. C. FREEMAN, H. J. COX, E. A. CAMPBELL, L. MUCKE, M. H. JOHNSON und M. V. SOFRONIEW (1998):**  
Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice.  
Cell 93, 189-201
- CARSON, M.J. (2002):**  
Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis.  
Glia 40, 218-231
- CATTET, M. R., P. J. DUIGNAN, C. A. HOUSE und D. J. AUBIN (2004):**  
Antibodies to canine distemper and phocine distemper viruses in polar bears from the Canadian arctic.  
J. Wildl. Dis. 40, 338-342



**CAZORLA, M., L. HERNANDEZ, A. NADAL, M. BALBIN, J. M. LOPEZ, F. VIZOSO, P. L. FERNANDEZ, K. IWATA, A. CARDESA, C. LOPEZ-OTIN und E. CAMPO (1998):**

Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx.  
J. Pathol. 186, 144-150

**CHAKRABORTI, S., M. MANDAL., S. DAS, A. MANDAL und T. CHAKRABORTI (2003):**

Regulation of matrix metalloproteinases: an overview.  
Mol. Cell Biochem. 253, 269-285

**CHANDLER, S., J. COSSINS, J. LURY und G. WELLS (1996):**

Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 228, 421-429

**CHANG, H. C., L. T. LIU und W. C. HUNG (2004):**

Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK.  
Cell Signal. 16, 675-679

**CHU, P. Y., L. A. SALAMONSEN, C. S. LEE und P. J. WRIGHT (2002):**

Matrix metalloproteinases (MMPs) in the endometrium of bitches.  
Reproduction 123, 467-477

**CHUA, K. B., L. F. WANG, S. K. LAM und B. T. EATON (2002):**

Full length genome sequence of Tioman Virus, a novel paramyxovirus in the genus rubulavirus isolated from fruit bats in Malaysia.  
Arch. Virol. 147, 1323-1348

**CLEMENTS, J. M., J. A. COSSINS, G. M. A. WELLS, D. J. CORKILL, K. HELFRICH, L. M. WOOD, R. PIGOTT, G. STABLER, G. A. WARD, A. J. H. GEARING und K. M. MILLER (1997):**

Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor- $\alpha$  inhibitor.  
J. Neuroimmunol. 74, 85-94

**COBBOLD, S. und S. METCALFE (1994):**

Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW).  
Tissue Antigens 43, 137-154

- COHEN, M., A. MEISSER, L. HAENGGELI und P. BISCHOF (2006):**  
Involvement of MAPK pathway in TNF-(alpha)-induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells.  
Mol. Hum. Reprod. 12, 225-232
- CORCORAN, M. L. und W. G. STETLER-STEVENSON (1995):**  
Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism.  
J. Biol. Chem. 270, 13453-13459
- COSSINS, J. A., J. M. CLEMENTS, J. FORD, K. M. MILLER, R. PIGOTT, W. VOS, P. VAN DER VALK und C. J. A. DE GROOT (1997):**  
Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions.  
Acta Neuropathol. 94, 590-598
- COUGHLAN, A. R., D. H. ROBERTSON, D. BENNETT, C. MAY, R. J. BEYNON und S. D. CARTER (1998):**  
Matrix metalloproteinases 2 and 9 in canine rheumatoid arthritis.  
Vet. Rec. 143, 219-223
- CULHACI, N., K. METIN, E. COPCU und E. DIKICIOGLU (2004):**  
Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness.  
BMC Cancer 4, 42
- CUNNINGHAM, L. A., M. WETZEL und G. A. ROSENBERG (2005):**  
Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia.  
Glia 50, 329-339
- CURRAN, S. und G. I. MURRAY (1999):**  
Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis.  
J. Pathol. 189, 300-308
- CUZNER, M. L. und G. OPDENAKKER (1999):**  
Plasminogen activators and matrix metalloproteinases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system.  
J. Neuroimmunol. 94, 1-14
- DEEM, S. L., L. H. SPELMAN, R. A. YATES und R. J. MONTALI (2000):**  
Canine distemper in terrestrial carnivores: a review.  
J. Zoo Wildl. Med. 31, 441-451
- DEMEDTS, I. K., G. G. BRUSSELLE, K. R. BRACKE, K. Y. VERMAELEN und R. A. PAUWELS (2005):**  
Matrix metalloproteinases in asthma and COPD.  
Curr. Opin. Pharmacol. 5, 257-263

**DE VICENTE, J. C., M. F. FRESNO, L. VILLALAIN, J. A. VEGA und J. S. LOPEZ ARRANZ (2005):**

Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma.

Oral Oncol. 41, 568-579

**DHIMAN, N., R. M. JACOBSON und G. A. POLAND (2004):**

Measles virus receptors: SLAM and CD46.

Rev. Med. Virol. 14, 217-229

**DI GUARDO, G., G. MARRUCHELLA, U. AGRIMI und S. KENNEDY (2005):**

Morbilliviruses infections in aquatic mammals: a brief overview.

J. Vet. Med. A 52, 88-93

**DORIG, R. E. A. MARCIL, A. CHOPRA und C. D. RICHARDSON (1993):**

The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain).

Cell 75, 295-305

**DZWONEK, J., M RYLSKI und L. KACZMAREK (2004):**

Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain.

FEBS Lett. 567, 129-135

**EASTON, A. J., J. B. DOMACHOWSKE und H. F. ROSENBERG (2004):**

Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis.

Clin. Microbiol. Rev. 17, 390-412

**ECHIZENYA, M., S. KONDO, R. TAKAHASHI, J. OH, S. KAWASHIMA, H. KITAYAMA, C. TAKAHASHI und M. NODA (2005):**

The membrane-anchored MMP-regulator RECK is a target of myogenic regulatory factors.

Oncogene 24, 5850-5857

**EGEBLAD, M. und Z. WERB (2002):**

New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.

Nat. Rev. Cancer 2, 161-174

**ETOH, T., H. INOUE, Y. YOSHIKAWA, G. F. BARNARD, S. KITANO und M. MORI (2000):**

Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness.

Gut 47, 50-56

- FAINARDI, E., M. CASTELLAZZI, T. BELLINI, M. C. MANFRINATO, E. BALDI, I. CASETTA, E. PAOLINO, E. GRANIERI und F. DALLOCCHIO (2006):**  
Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis.  
Mult. Scler. 12, 294-301
- FAULKNER, J. R., J. E. HERRMANN, M. J. WOO, K. E. TANSEY, N. B. DOAN und M. V. SOFRONIEW (2004):**  
Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury.  
J. Neurosci. 24, 2143-2155
- FAUQUET, C. M., M. A. MAYO, J. MANILOFF, U. DESSELBERGER und L.A. BALL (EDS.) (2004):**  
Family Paramyxoviridae.  
in: "Virus Taxonomy" Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Editiert von C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball.  
Elsevier/Academic Press, London
- FIELDING, A.K. (2005):**  
Measles as a potential oncolytic virus.  
Rev. Med. Virol. 15, 135-142
- FIORE, E., C. FUSCO, P. ROMERO und I. STAMENKOVIC (2002):**  
Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9 / gelatinase B) proteolytically cleaves ICAM-1 and participates in tumor cell resistance to natural killer cell-mediated cytotoxicity.  
Oncogene 21, 5213-5223
- FRISCH, S. M. und R. A. SCREATON (2001):**  
Anoikis mechanisms.  
Curr. Opin. Cell Biol. 13, 555-562
- FRISK, A. L., W. BAUMGÄRTNER und A. GRÖNE (1999a):**  
Dominating interleukin-10 mRNA expression induction in cerebrospinal fluid cells of dogs with natural canine distemper virus induced demyelination and non-demyelinating CNS lesions.  
J. Neuroimmunol. 97, 102-109
- FRISK, A. L., M. KÖNIG, A. MORITZ und W. BAUMGÄRTNER (1999b):**  
Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper.  
J. Clin. Microbiol. 37, 3634-3643

**FURUMOTO, K., S. ARII, A. MORI, H. FURUYAMA, M. J. GORRIN RIVAS, T. NAKAO, N. ISOBE, T. MURATA, C. TAKAHASHI, M. NODA und M. IMAMURA (2001):**

RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance.  
Hepatology 33, 189-195

**GABISON, E. E., T. HOANG-XUAN, A. MAUVIEL und S. MENASHI (2005):**

EMMPRIN/CD147, an MMP modulator in cancer, development and tissue repair.  
Biochimie 87, 361-368

**GAEDKE, K., A. ZURBRIGGEN und W. BAUMGÄRTNER (1997):**

In vivo and in vitro detection of canine distemper virus nucleoprotein genes with digoxigenin-labelled RNA, double-stranded DNA probes and oligonucleotides by in situ hybridization.  
Zentralbl. Veterinärmed. B 44, 329-340

**GAEDKE, K., A. ZURBRIGGEN und W. BAUMGÄRTNER (1999):**

Lack of correlation between virus nucleoprotein and mRNA expression and the inflammatory response in demyelinating distemper encephalitis indicates a biphasic disease process.  
Eur. J. Vet. Pathol. 5, 9-20

**GALBOIZ, Y., S. SHAPIRO, N. LAHAT, H. RAWASHDEH und A. MILLER (2001):**

Matrix Metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon- $\beta$  therapy in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis patients.  
Ann. Neurol. 50, 443-451

**GENTILINI, F., C. CALZOLARI, M. E. TURBA, C. AGNOLI, D. FAVA, M. FORNI und P. F. BERGAMINI (2005):**

Prognostic value of serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and 9 in lymphoma-affected dogs.  
Leuk. Res. 29, 1263-1269

**GILLES, C., M. POLETTE, C. CORAUX, J. M. TOURNIER, G. MENEGUZZI, C. MUNAUT, L. VOLDERS, P. ROUSSELLE, P. BIREMBAUT und J. M. FOIDART (2001):**

Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration.  
J. Cell Science 114, 2967-2976

**GOMEZ, D. E., D. F. ALONSO, H. YOSHIJI und U. P. THORGEIRSSON (1997):**

Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.

Eur. J. Cell Biol. 74, 111-122

**GRÖNE, A., M. T. WECKMANN, C. C. CAPEN und T. J. ROSOL (1996):**

Canine glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase complementary DNA: polymerase chain reaction amplification, cloning, partial sequence analysis, and use as a loading control in ribonuclease protection assays.

Am. J. Vet. Res. 57, 254-257

**GRÖNE, A., A. L. FRISK und W. BAUMGÄRTNER (1998):**

Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection.

Vet. Immunol. Immunopathol. 65, 11-27

**GRÖNE, A., S. FONFARA, S. MARKUS und W. BAUMGÄRTNER (1999):**

RT-PCR amplification of various canine cytokines and so-called house-keeping genes in a species-specific macrophage cell line (DH82) and canine peripheral blood leukocytes.

J. Vet. Med. B 46, 301-310

**GRÖNE, A., S. ALLDINGER und W. BAUMGÄRTNER (2000):**

Interleukin-1 beta, -6, -12 and tumor necrosis factor-alpha expression in brains of dogs with canine distemper virus infection.

J. Neuroimmunol. 110, 20-30

**GRÖNE, A., S. FONFARA und W. BAUMGÄRTNER (2002):**

Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection.

Viral Immunol. 15, 493-505

**GRÖTERS, S., S. ALLDINGER und W. BAUMGÄRTNER (2005):**

Up-regulation of mRNA for matrix-metalloproteinases-9 and -14 in advanced lesions of demyelinating distemper leukoencephalitis.

Acta Neuropathol. 110, 369-382

**GROSS, J. und C. M. LAPIERE (1962):**

Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1014-1022

**GROTE, D., S. J. RUSSELL, J. I. CORNU, R. CATTANEO, R. VILE, G. A. POLAND und A. FIELDING (2001):**

Live attenuated measles virus induces regression of human lymphoma xenografts in immunodeficient mice.

Blood 97, 3746-3754

**GUEDEZ, L., A. MANSOOR, B. BIRKEDAL-HANSEN, M. S. LIM, P. FUKUSHIMA, D. VENZON, W. G. STETLER-STEVENSON und M. STETLER-STEVENSON (2001):**

Tissue inhibitor of metalloproteinases 1 regulation of interleukin-10 in B-cell differentiation and lymphomagenesis.

Blood 97, 1796-1802

**GUPTA, S. und E. J. STANBRIDGE (2001):**

Paired human fibrosarcoma cell lines that possess or lack endogenous mutant N-ras alleles as experimental model for Ras signaling pathways.

Methods Enzymol. 333, 290-306

**HAAS, L., H. HOFER, M. EAST, P. WOHLSEIN, B. LIESS und T. BARRETT (1996):**

Canine distemper virus infection in Serengeti spotted hyenas.

Vet. Microbiol. 49, 147-152

**HAN, Y. P., S. DOWNEY und W. L. GARNER (2006):**

Interleukin-1alpha-induced proteolytic activation of metalloproteinase-9 by human skin.

Surgery 138, 932-939

**HAO, L., M. DU, A. LOPEZ-CAMPISTROUS und C. FERNANDEZ-PATRON (2004):**

Agonist-induced activation of matrix metalloproteinase-7 promotes vasoconstriction through the epidermal growth factor-receptor pathway.

Circ. Res. 94, 68-76

**HARTLEY, W. J. (1974):**

A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs.

Vet. Pathol. 11, 301-312

**HAUPT, L. M., E. W. THOMPSON, A. E. TREZISE, R. E. IRVING, M. G. IRVING und L. R. GRIFFITHS (2006):**

*In vitro* and *in vivo* MMP gene expression localisation by in-situ-RT-PCR in cell culture and paraffin embedded human breast cancer cell line xenografts.

BMC Cancer 24, 18

**HAYAKAWA, T., K. YAMASHITA, E. OHUCHI und A. SHINAGAWA (1994):**

Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2).

J. Cell Science 107, 2373-2379

- HAZAR, B., G. POLAT, E. SEYREK, O. BAGDATOGLU, A. KANIK und N. TIFKIK (2004):**  
Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphoma.  
Int. J. Clin. Pract. 58, 139-143
- HEINZERLING, L., V. KÜNZI, P. A. OBERHOLZER, T. KÜNDIG, H. NAIM und R. DUMMER (2005):**  
Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune response in vivo and targets interferon-resistant tumor cells.  
Blood 106, 2287-2294
- HIGGINS, R. J., S. G. KRAKOWKA, A. E. METZLER und A. KOESTNER (1982):**  
Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings.  
Acta Neuropathol. 58, 1-8
- HIRAMA, K., Y. GOTO, M. UEMA, Y. ENDO, R. MIURA und C. KAI (2004):**  
Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene of canine distemper viruses isolated from wild masked palm civets (*Paguma larvata*).  
J. Vet. Med. Sci. 66, 1575-1578
- HIRAYAMA, K., H. YOKOTA, R. ONAI, T. KOBAYASHI, T. KUMATA, K. KIHARA, M. OKAMOTO, T. SAKO, T. NAKADE, Y. IZUMISAWA und H. TANIYAMA (2002):**  
Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography.  
J. Comp. Pathol. 127, 249-256
- HOFMANN, U. B., R. HOUBEN, E. B. BRÖCKER und J. C. BECKER (2005):**  
Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion.  
Biochimie 94, 1466-1475
- HORSTMANN, S., P. KALB, J. KOZIOL, H. GARDNER und S. WAGNER (2003):**  
Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies.  
Stroke 34, 2165-2170
- HSU, S. M., L. RAINE und H. FANGER (1981):**  
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques.  
J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580
- HSU, M. C., H. C. CHANG und W. C. HUNG (2006):**  
HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion.  
J. Biol. Chem. 281, 4718-4725



**HUEBNER, R. J., W. P. ROWE, W. E. SCHATTEN, R. R. SMITH und L. B. THOMAS (1956):**

Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix.  
Cancer 9, 1211-1218

**ICTVdb (2002):**

The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses

<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk>

**IMAGAWA, D. T., E. B. HOWARD, L. F. VAN PELT, C. P. RYAN, H. D. BUI und P. SHAPSHAK (1980):**

Isolation of canine distemper virus from dogs with chronic neurological diseases.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 164, 355-362

**ITO, M., T. MURATA, T. SUZUKI, M. SHINDOH, K. NAKAJIMA, K. IMAI und K. YOSHIDA (2006):**

Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells.

Oncogene 25, 1195-1204

**IWATSUKI, K., M. OKITA, F. OCHIKUBO, T. GEMMA, Y. S. SHIN, N. MIYASHITA, T. MIKAMI und C. KAI (1995):**

Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus.

J. Comp. Path. 113, 185-190

**JI, F., Y. L. CHEN, E. Y. JIN, W. L. WANG, Z. L. YANG und Y. M. LI (2005):**

Relationship between matrix metalloproteinase-2 mRNA expression and clinicopathological and urokinase-type plasminogen activator system parameters and prognosis in human gastric cancer.

World J. Gastroenterol. 11, 3222-3326

**JIANG, A., K. LEHTI, X. WANG, S. J. WEISS, J. KESKI-OJA und D. PEI (2001):**

Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 13693-13698

**JOHANSSON, N., K. AIROLA, R. GRENNAN, A. L. KARINIEMI, U. SAARIALHO-KERE und V. M. KAHARI (1997):**

Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck.

Am. J. Pathol. 151, 499-509

- JOHANSSON, N., M. VAALAMO, S. GRENMAN, S. HIETANEN, P. KLEMI, U. SAARIALHO-KERE und V. M. KAHARI (1999):**  
Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by tumor cells in invasive vulvar squamous cell carcinomas.  
Am. J. Pathol. 154, 469-480
- KACZMAREK, L., J. LAPINSKA-DZWONEK und S. SZYMCZAK (2002):**  
Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections?  
EMBO J. 21, 6643-6648
- KAJITA, M., Y. ITOH, T. CHIBA, H. MORI, A. OKADA, H. KINOH und M. SEIKI (2001):**  
Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration.  
J. Cell Biol. 153, 893-904
- KENNEDY, S. (1998):**  
Morbillivirus infections in aquatic mammals.  
J. Comp. Pathol. 119, 201-225
- KHERADMAND, F., E. WERNER, P. TREMBLE, M. SYMONS und Z. WERB (1998):**  
Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change.  
Science 280, 898-902
- KHOKHA, R. (1994):**  
Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1.  
J. Natl. Cancer Inst. 86, 299-304
- KHUTH, S. T., H. AKAOKA, A. PAGENSTECHE, O. VERLAETEN, M. F. BELIN, P. GIRAUDON und A. BERNARD (2001):**  
Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression.  
J. Virol. 75, 8268-8282
- KIESEIER, B. C., R. KIEFER, J. M. CLEMENTS, K. MILLER, G. M. WELLS, T. SCHWEITZER, A. J. GEARING und H. P. HARTUNG (1998)**  
Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis.  
Brain 121, 159-166

**KIESEIER, B. C., R. PAUL, U. KOEDEL, T. SEIFERT, J. M. CLEMENTS, A. J. GEARING, H. W. PFISTER und H. P. HARTUNG (1999):**

Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis. *Brain* 122, 1579-1587

**KIM, J.R. und C. H. KIM (2004):**

Association of a high activity of matrix metalloproteinase-9 to low levels of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -3 in human hepatitis B-viral hepatoma cells.

*Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2293-2306

**KIRKLAND, P. D., P. W. DANIELS, M. N. NOR, R. J. LOVE, A. W. PHILBEY und A. D. ROSS (2002):**

Menangle and Nipah virus infections of pigs.

*Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 18, 557-571

**KLEINER, D. E. und W. G. STETLER-STEVENSON (1999):**

Matrix metalloproteinases and metastasis.

*Cancer Chemother. Pharmacol.* 43 (Suppl.), S42-S51

**KNÄUPER, V., H. WILL, C. LOPEZ-OTIN, B. SMITH, S. J. ATKINSON, H. STANTON, R. M. HEMBRY und G. MURPHY (1996):**

Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation.

Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme.

*J. Biol. Chem.* 271, 17124-17131

**KORDES, C., S. BROOKMANN, D. HAUSSINGER und H. KLONOWSKI-STUMPE (2005):**

Differential and synergistic effects of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta1 on activated pancreatic stellate cells.

*Pancreas* 31, 156-167

**KOSSAKOWSKA, A. E., S. J. URBANSKI und A. JANOWSKA-WIECZOREK (2000):**

Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors – expression, role and regulation in human malignant non-Hodgkin's lymphomas.

*Leuk. Lymphoma* 39, 485-493

**KOUWENHOVEN, M., V. ÖZENCI, A. GOMES, D. YARILIN, V. GIEDRAITIS, R. PRESS und H. LINK (2001):**

Multiple sclerosis: elevated expression of matrix metalloproteinases in blood monocytes.

*J. Autoimmun.* 16, 463-470

**KRAKOWKA, S. und A. KOESTNER (1976):**

Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs.

J. Infect. Dis. 134, 629-632

**KRAKOWKA, S. und A. KOESTNER (1977):**

Comparison of canine distemper virus strains in gnotobiotic dogs: effects on lymphoid tissues.

Am. J. Vet. Res. 38, 1919-1922

**KRAKOWKA, S., R. J. HIGGINS und A. E. METZLER (1980a):**

Plasma phase viremia in canine distemper virus infection.

Am. J. Vet. Res. 41, 144-146

**KRAKOWKA, S., R. J. HIGGINS und A. KOESTNER (1980b):**

Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues.

Am. J. Vet. Res. 41, 284-292

**KRAKOWKA, S., M. K. AXTHELM und G. C. JOHNSON (1985):**

Canine distemper virus.

in : Olsen, R. G., S. Krakowka und J. R. Blakeslee jr. (eds). Comparative Pathobiology of Viral Diseases, Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, pp 137-164

**KURAHARA, S., M. SHINOHARA, T. IKEBE, S. NAKAMURA, M. BEPPU, A. HIRAKI, H. TAKEUCHI und K. SHIRASUNA (1999):**

Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis.

Head Neck. 21, 627-638

**KURATH, G., W. N. BATTS, W. AHNE und J. R. WINTON (2004):**

Complete genome sequence of Fer-de-Lance virus reveals a novel gene in reptilian paramyxoviruses.

J. Virol. 78, 2045-2056

**LAACK, E., A. SCHEFFLER, I. BURKHOLDER, I. BOETERS, B. ANDRITZKY, G. SCHUCH, M. GÖRN, G. VOHWINKEL, L. EDLER, W. FIEDLER und D. K. HOSSFELD (2005):**

Pretreatment vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) serum levels in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC).

Lung Cancer 50, 51-58

**LANA, S. E., G. K. OGILVIE, R. A. HANSEN, B. E. POWERS, W. S. DERNELL und S. J. WITHROW (2000):**

Identification of matrix metalloproteinases in canine neoplastic tissue.

Am. J. Vet. Res. 61, 111-114

- LARSEN, P. H., A. G. DASILVA, K. CONANT und V. W. YONG (2006):**  
Myelin formation during development of the CNS is delayed in matrix metalloproteinase-9 and -12 null mice.  
J. Neurosci. 26, 2207-2214
- LEBLOND, C. P. und S. INOUE (1989):**  
Structure, composition, and assembly of basement membrane.  
Am. J. Anat. 185, 367-390
- LEE, M. A., J. PALACE, G. STABLER, J. FORD, A. GEARING und K. MILLER (1999):**  
Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis – a longitudinal clinical and MRI study.  
Brain 122, 191-197
- LEEMAN, M. F., J. A. MCKAY und G. I. MURRAY (2002):**  
Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer.  
J. Clin. Pathol. 55, 758-762
- LEIBMAN, N. F., S. E. LANA, R. A. HANSEN, B. E. POWERS, M. J. FETTMAN, S. J. WITHROW und G. K. OGILVIE (2000):**  
Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors.  
J. Vet. Intern. Med. 14, 583-586
- LEONTOVICH, A. A., J. ZHANG, K. SHIMOKAWA, H. NAGASE und M. P. SARRAS JR. (2000):**  
A novel hydra matrix metalloproteinase (HMMP) functions in extracellular matrix degradation, morphogenesis and the maintenance of differentiated cells in the foot process.  
Development. 127, 907-920
- LEPPERT, D., J. FORD, G. STABLER, C. GRYGAR, C. LIENERT, S. HUBER, K. M. MILLER, S. L. HAUSER und L. KAPPOS (1998):**  
Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis.  
Brain 121, 2327-2334
- LEPPERT, D., R. L. LINDBERG, L. KAPPOS und S. L. LEIB (2001):**  
Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis.  
Brain Res. Brain Res. Rev. 36, 249-257
- LEVIČAR, N., R. K. NUTALL und T. T. LAB (2003):**  
Proteases in brain tumour progression.  
Acta Neurochir. 145, 825-838

- LEVINE, J. M., C. G. RUAUX, R. L. BERGMAN, J. R. COATES, J. M. STEINER und D. A. WILLIAMS (2006):**  
Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease.  
Am J. Vet. Res. 67, 283-287
- LICHTINGHAGEN, R., T. SEIFERT, A. KRACKE, S. MARCKMANN, U. WURSTER und F. HEIDENREICH (1999):**  
Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis.  
J. Neuroimmunol. 99, 19-26
- LIM, G. P., M. J. RUSSELL, M. J. CULLEN und Z. A. TOKES (1997):**  
Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics.  
J. Neurochem. 68, 1606-1611
- LINCOLN, S. D., J. R. GORHAM, W. C. DAVIS und R. L. OTT (1973):**  
Studies of old dog encephalitis. II. Electron microscopic and immunohistologic findings.  
Vet. Pathol. 10, 124-129
- LINDBERG, R. L. P., C. J. A. DE GROOT, L. MONTAGNE, P. FREITAG, P. VAN DER VALK, L. KAPPOS und D. LEPPERT (2001):**  
The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis.  
Brain 124, 1743-1753
- LINDBERG, R. L., T. SORSA, T. TERVAHARTIALA, F. HOFFMANN, L. MELLANEN, L. KAPPOS, U. B. SCHAAD, S. L. LEIB und D. LEPPERT (2006):**  
Gelatinase B [matrix metalloproteinase (MMP)-9] and collagenases (MMP-8/-13) are upregulated in cerebrospinal fluid during aseptic and bacterial meningitis in children.  
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 32, 304-317
- LIU, L. T., H. C. CHANG, L. C. CHIANG und W. C. HUNG (2002):**  
Induction of RECK by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in lung cancer cells.  
Oncogene 21, 8347-8350
- LIU, L. T., J. P. PENG, H. C. CHANG und W. C. HUNG (2003):**  
RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1.  
Oncogene 22, 8263-8270

- LIUZZI, G. M., C. M. MATROIANNI, M. P. SANTACROCE, M. FANELLI, C. D'AGOSTINO, V. VULLO und P. RICCIO (2000):**  
Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases.  
J. Neuroviol. 6, 156-163
- LORENCE, R. M., K. W. REICHARD, B. B. KATUBIG, H. M. REYES, A. PHUANGSAB, B. R. MITCHELL, C. J. CASCINO, R. J. WALTER und M. E. PEEPLES (1994a):**  
Complete regression of human neuroblastoma xenografts in athymic mice after local Newcastle disease virus therapy.  
J. Natl. Cancer Inst. 86, 1228-1233
- LORENCE, R. M., B. B. KATUBIG, K. W. REICHARD, H. M. REYES, A. PHUANGSAB, M. D. SASSETTI, R. J. WALTER und M. E. PEEPLES (1994b):**  
Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy.  
Cancer Res. 54, 6017-6021
- LOUKOPOULOS, P., B. A. MUNGALL, R. C. STRAW, J. R. THORNTON und W. F. ROBINSON (2003):**  
Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors.  
Vet Pathol. 40, 382-394
- LUO, J. (2005):**  
The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex.  
Cerebellum 4, 239-245
- LUPARELLO, C., G. AVANZATO, C. CARELLA und I. PUCCI-MINAFRA (1999):**  
Tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP)-1 and proliferative behaviour of clonal breast cancer cells.  
Breast Cancer Res. Treat. 54, 235-244
- MAEDA, H., K. OZAKI, Y. TAKAGI, K. SAWASHIMA und I. NARAMA (1994):**  
Distemper skin lesions in a dog.  
Zentralbl. Veterinärmed. A. 41, 247-250
- MAEDA, A. und R. A. SOBEL (1996):**  
Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55, 300-309

- MAIDMENT, J. M., D. MOORE, G. P. MURPHY, G. MURPHY und I. M. CLARK (1999):**  
Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity.  
J. Biol. Chem. 274, 34706-34710
- MALEMUD, C. J. (2006):**  
Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview.  
Front. Biosci. 11, 1696-1701
- MARKUS, S., K. FAILING und W. BAUMGÄRTNER (2002):**  
Increased expression of pro-inflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions.  
J. Neuroimmunol. 125, 30-41
- MARTEL-PELLETIER, J., D. J. WELSCH und J. P. PELLETIER (2001):**  
Metalloproteinases and inhibitors in arthritic diseases.  
Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol. 15, 805-829
- MARTINEZ-TORRES, F.J., S. WAGNES, J. HAAS, R. KEHM, J. SELLNER, W. HACKE und U. MEYDING-LAMADE (2004):**  
Increased presence of matrix metalloproteinases 2 and 9 in short- and long-term experimental herpes simplex virus encephalitis.  
Neurosci. Lett. 368, 274-278
- MASUI, T., R. DOI, T. KOSHIBA, K. FUJIMOTO, S. TSUJI, S. NAKAJIMA, M. KOIZUMI, E. TOYODA, S. TULACHAN, D. ITO, K. KAMI, T. MORI, M. WADA, M. NODA und M. IMAMURA (2003):**  
RECK expression in pancreatic cancer: its correlation with lower invasiveness and better prognosis.  
Clin. Cancer Res. 9, 1779-1784
- MCCAWLEY, L. J. und L. M. MATRISIAN (2001):**  
Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!  
Curr. Opin. Cell Biol. 13, 534-540
- MCQUAID, S. und S. L. COSBY (2002):**  
An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis.  
Lab. Invest. 82, 403-409
- MIAO, Q., W. BAUMGÄRTNER, K. FAILING und S. ALLDINGER (2003):**  
Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis.  
Acta Neuropathol. 106, 486-494



- MIMORI, K., M. MORI, T. SHIRAIISHI, T. FUJIE, K. BABA, M. HARAGUCHI, R. ABE, H. UEO und T. AKIYOSHI (1997):**  
Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma.  
Br. J. Cancer 76, 531-536
- MORITZ, A., A. L. FRISK und W. BAUMGÄRTNER (1998):**  
Beurteilung diagnostischer Möglichkeiten bei der Staupevirusinfektion des Hundes.  
Kleintierpraxis 43, 153-172
- MOS, L., P. S. ROSS, D. MCINTOSH und S. RAVERTY (2003):**  
Canine Distemper Virus in river otters in British Columbia as an emergent risk for coastal pinnipeds.  
Vet. Rec. 152, 237-239
- MOTA, H. C. (1973):**  
Infantile Hodgkin's disease: remission after measles.  
Br. Med. J. 2, 421
- MUN-BRYCE, S. und G. A. ROSENBERG (1998):**  
Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation.  
Am. J. Physiol. 274, R1203-R1211
- NAGASE, H. (1997):**  
Activation mechanisms of matrix metalloproteinases.  
Biol. Chem. 378, 151-160
- NAGASE, H. und J. F. WOESSNER, JR. (1999):**  
Matrix metalloproteinases.  
J. Biol. Chem. 274, 21491-21494
- NAGASE, H., R. VISSE und G. MURPHY (2006):**  
Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.  
Cardiovasc. Res. 69, 562-573
- NAGATA, T., F. OCHIKUBO, Y. YOSHIKAWA und K. YAMANOUCHI (1990):**  
Encephalitis induced by a canine distemper virus in squirrel monkeys.  
J. Med. Primatol. 19, 137-149
- NAKOPOULOU, L., S. KATSAROU, I. GIANNOPOULOU, P. ALEXANDROU, I. TSIRMPA, E. PANAYOTOPOULOU, J. MAVROMMATIS und A. KERAMOPOULOS (2002):**  
Correlation of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 with proliferative activity and patients' survival in breast cancer.  
Mod. Pathol. 15, 26-34

- NASH, G. F., L. F. TURNER, M. F. SCULLY und A. K. KAKKAR (2002):**  
Platelets and cancer.  
Lancet Oncol. 3, 425-430
- NESSELER, A., W. BAUMGÄRTNER, K. GAEDKE und A. ZURBRIGGEN (1997):**  
Abundant expression of viral nucleoprotein mRNA and restricted translation of the corresponding viral protein in inclusion body poliomyelitis of canine distemper.  
J. Comp. Pathol. 116, 291-301
- NESSELER, A., W. BAUMGÄRTNER, A. ZURBRIGGEN und C. ÖRVELL (1999):**  
Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body poliomyelitis.  
Vet. Microbiol. 69, 23-28
- NJENGA, M. K., H. M. LWAMBA und B. S. SEAL (2003):**  
Metapneumoviruses in birds and humans.  
Virus Res. 91, 163-169
- NODA, M., J. OH, R. TAKAHASHI, S. KONDO, H. KITAYAMA und C. TAKAHASHI (2003):**  
RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling.  
Cancer Metastasis Rev. 22, 167-175
- NOON, T. H., J. R. HEFFLINGER, R. J. OLDING, S. L. WESCHE und C. REGGIARDO (2003):**  
Serologic survey for antibodies to canine distemper virus in collard peccary (*Tayassu tajacu*) populations in Arizona.  
J. Wildl. Dis. 39, 221-223
- NY, T., P. WAHLBERG und I. J. BRÄNDSTRÖM (2002):**  
Matrix remodeling in the ovary: regulation and functional role of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems.  
Mol. Cell. Endocrinol. 187, 29-38
- ÖZENCI, V., L. RINALDI, N. TELESHOVA, D. MATUSEVICIUS, P. KIVISÄKK, M. KOUWENHOVEN und H. LINK (1999):**  
Metalloproteinases and their tissue inhibitors in multiple sclerosis.  
J. Autoimmun. 12, 297-303

- OH, J., R. TAKAHASHI, S. KONDO, A. MIZOGUCHI, E. ADACHI, R. M. SASAHARA, S. NISHIMURA, Y. IMAMURA, H. KITAYAMA, D. B. ALEXANDER, C. IDE, T. P. HORAN, T. ARAKAWA, H. YOSHIDA, S. NISHIKAWA, Y. ITOH, M. SEIKI, S. ITOHARA, C. TAKAHASHI und M. NODA (2001):**  
The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis.  
Cell 107, 789-800
- OH, J., D. W. SEO, T. DIAZ, B. WEI, Y. WARD, J. M. RAY, Y. MORIOKA, S. SHI, H. KITAYAMA, C. TAKAHASHI, M. NODA und W. G. STETLER-STEVENSON (2004):**  
Tissue inhibitors of matrix-metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK.  
Cancer Res. 64, 9062-9069
- OKUNO, Y., T. ASADA, K. YAMANISHI, T. OTSUKA, M. TAKAHASHI, T. TANIOKA, H. AOYAMA, O. FUKUI, K. MATSUMOTO, F. UEMURA und A. WADA (1978):**  
Studies on the use of mumps virus for treatment of human cancer.  
Biken J. 21, 37-49
- PAGENSTECHER, A., A. K. STALDER, C. L. KINCAID, S. D. SHAPIRO und I. L. CAMPBELL (1998):**  
Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states.  
Am. J. Pathol. 152, 729-741
- PALTIAN, V. (2006):**  
Immunhistologische Untersuchungen zur Expression von CD44, Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren in Mammatumoren von Hunden.  
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- PAPPARELLA, S., B. RESTUCCI, O. PACIELLO und P. MAIOLINO (2002):**  
Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas.  
J. Comp. Pathol. 126, 271-276
- PAUL, R., S. LORENZL, U. KOEDEL, B. SPORER, U. VOGEL, M. FROSCHE und H. W. PFISTER (1998):**  
Matrix metalloproteinases contribute to the blood-brain barrier disruption during bacterial meningitis.  
Ann. Neurol. 44, 592-600

- PECORA, A. L., N. RIZVI, G. I. COHEN, N. J. MEROPOL, D. STERMAN, J. L. MARSHALL, S. GOLDBERG, P. GROSS, J. D. O'NEILL, W. S. GROENE, M. S. ROBERTS, H. RABIN, M. K. BAMAT und R. M. LORENCE (2002):**  
Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers.  
J. Clin. Oncol. 20, 2251-2266
- PENG, K. W., G. J. AHMANN, L. PHAM, P. R. GREIPP, R. CATTANEO und S. J. RUSSELL (2001):**  
Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus.  
Blood 98, 2002-2007
- PENG, K. W., C. J. TENYCK, E. GALANIS, K. R. KALLI, L. C. HARTMANN und S. J. RUSSELL (2002):**  
Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus.  
Cancer Res. 62, 4656-4662
- POLETTE, M., B. NAWROCKI-RABY, C. GILLES, C. CLAVEL und P. BIREMBAUT (2004):**  
Tumour invasion and matrix metalloproteinases.  
Crit. Rev. Oncol. Hematol. 49, 179-186
- POST, D. E., G. FULCI, E. A. CHIOCCA und E. G. VAN MEIR (2004):**  
Replicative oncolytic herpes simplex viruses in combination cancer therapies.  
Curr. Gene Ther. 4, 41-51
- RAIVICH, G. und R. BANATI (2004):**  
Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease.  
Brain Res. Brain Res. Rev. 46, 261-281
- RAVANTI, L. und V. M. KAHARI (2000):**  
Matrix metalloproteinases in wound repair (review).  
Int. J. Mol. Med. 6, 391-407
- RAYMOND, L., S. ECK, J. MOLLMARK, E. HAYS, I. TOMEK, S. KANTOR, S. ELLIOTT und M. VINCENTI (2006):**  
Interleukin-1 beta induction of matrix metalloproteinase-1 transcription in chondrocytes requires ERK-dependent activation of CCAAT enhancer-binding protein-beta.  
J. Cell Physiol. 207, 683-688
- REICHARD, K. W., R. M. LORENCE, C. J. CASCINO, M. E. PEEPLES, R. J. WALTER, M. B. FERNANDO, H. M. REYES und J. A. GREAGER (1992):**  
Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells.  
J. Surg. Res. 52, 448-453

- RELPH, K. L., K. J. HARRINGTON und H. PANDHA (2005):**  
Adenoviral strategies for the gene therapy of cancer.  
Semin. Oncol. 32, 573-582
- RHEE, J. S. und L. M. COUSSENS (2002):**  
RECKing MMP function: implications for cancer development.  
Trends Cell. Biol. 12, 209-211
- RIMA, B. K. und W. P. DUPREX (2006):**  
Morbilliviruses and human disease.  
J. Pathol. 208, 199-214
- ROBINSON, J. J. (1997):**  
Characterization of a metalloproteinase: a late stage specific gelatinase activity  
in the sea urchin embryo.  
J. Cell Biochem. 66, 337-345
- ROCA, F., L. V. MAURO, A. MORANDI, F. BONADEO, C. VACCARO, G. O.  
QUINTANA, S. SPECTERMAN, E. B. DE KIER JOFFE, M. G. PALLOTTA, L.  
I. PURICELLI und J. LASTIRI (2006):**  
Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1  
and 2) in patients with colorectal carcinoma.  
J. Surg. Oncol. 93, 151-160
- ROMEIS, B. (1989):**  
Mikroskopische Technik. 17. Auflage.  
Verlag Urban & Schwarzenberg, München
- ROSCOE, D. E. (1993):**  
Epizootiology of canine distemper in New Jersey Raccoons.  
J. Wildl. Dis. 29, 309-395
- ROSELL, A., A. ORTEGA-AZNAR, J. ALVAREZ-SABIN, I. FERNANDEZ-  
CADENAS, M. RIBO, C. A. MOLINA, E. H. LO und J. MONTANER (2006):**  
Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and  
hemorrhagic human stroke.  
Stroke 37, 1399-1406
- ROSENBERG, G. A., L. A. CUNNINGHAM, J. WALLACE, S. ALEXANDER, E. Y.  
ESTRADA, M. GROSSETETE, A. RAZHAGI, K. MILLER und A. GEARING  
(2001):**  
Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat  
brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures.  
Brain Res. 893, 104-112

**ROSENBERG, G. A. (2002):**

Matrix metalloproteinases in neuroinflammation.  
*Glia* 39, 279-291

**ROZEN, S. und H. SKALETSKY (2000):**

Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.  
In: Krawetz, S., Misener, S. (eds). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press Totowa, NJ, pp. 365-386

**RUNDHAUG, J. E. (2005):**

Matrix metalloproteinases and angiogenesis.  
*J. Cell Mol. Med.* 9, 267-285

**SAKATA, K., M. SATOH, M. SOMEYA, H. ASANUMA, H. NAGAKURA, A. OOUCHI, K. NAKATA, K. KOGAWA, K. KOITO, M. HAREYAMA und T. HIMI (2004):**

Expression of matrix metalloproteinase 9 is a prognostic factor in patients with non-Hodgkin lymphoma.  
*Cancer* 100, 356-365

**SASAHARA, R. M., C. TAKAHASHI, M. C. SOGAYAR und M. NODA (1999a):**

Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene.  
*Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 891-895

**SASAHARA, R. M., C. TAKAHASHI und M. NODA (1999b):**

Involvement of the Sp1 site in *ras*-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 668-675

**SASAHARA, R. M., S. M. BROCHADO, C. TAKAHASHI, J. OH, S. S. MARIA-ENGLER, J. M. GRANJEIRO, M. NODA und M. C. SOGAYAR (2002):**

Transcriptional control of the RECK metastasis / angiogenesis suppressor gene.  
*Cancer Detect. Prev.* 26, 435-443

**SCHOBESBERGER, M., A. ZURBRIGGEN, M. G. DOHERR, H. WEISSENBÖCK, M. VANDELDE, H. LASSMANN und C. GRIOT (2002):**

Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis.  
*Acta Neuropathol.* 103, 11-19

**SCHOBESBERGER, M., A. SUMMERFIELD, M. G. DOHERR, A. ZURBRIGGEN und C. GRIOT (2005):**

Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 33-44

**SEEHUSEN, F. A. (2006):**

Untersuchungen über Axonopathien und die Rolle des Neurotrophins BDNF bei der kaninen Staupeenzephalitis.  
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

**SEKI, F., N. ONO, R. YAMAGUCHI und Y. YANAGI (2003):**

Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells.  
J. Virol. 77, 9943-9950

**SHIPLEY, J. M., R. L. WESSELSCHMIDT, D. K. KOBAYASHI, T. J. LEY und S. D. SHAPIRO (1996):**

Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 3942-3946

**SIDORENKO, S. P. und E. A. CLARK (2003):**

The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction.  
Nat. Immunol. 4, 19-24

**SIMIZU, S., S. TAKAGI, Y. TAMURA und H. OSADA (2005):**

RECK-mediated suppression of tumor cell invasion is regulated by glycosylation in human tumor cell lines.  
Cancer Res. 65, 7455-7461

**SOMERVILLE, R. P., S. A. OBLANDER und S. S. APTE (2003):**

Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.  
Genome Biol. 4, 216

**SONG, S. Y., H. J. SON, E. NAM, J. C. RHEE und C. PARK (2006):**

Expression of reversion-inducing-cysteine-rich-protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer.  
Eur. J. Cancer 42, 101-108

**SPAN, P. N., C. G. SWEEP, P. MANDERS, L. V. BEEEX, D. LEPPERT und R. L. LINDBERG (2003):**

Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma.  
Cancer 97, 2710-2715

**SPRINGMAN, E. B., E. L. ANGLETON, H. BIRKEDAL-HANSEN und H. E. VAN WART (1990):**

Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 364-368

**STAHLE-BACKDAHL, M. und W. C. PARKS (1993):**

92-kd gelatinase is actively expressed by eosinophils and stored by neutrophils in squamous cell carcinoma.

Am. J. Pathol. 142, 995-1000

**STAMENKOVIC, I. (2003):**

Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases.

J. Pathol. 200, 448-464

**STEIN, V. M., M. CZUB, N. SCHREINER, P. F. MOORE, M. VANDEVELDE, A. ZURBRIGGEN und A. TIPOLD (2004):**

Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions.

J. Neuroimmunol. 153, 122-131

**STERNLICHT, M. D. und Z. WERB (2001):**

How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17, 463-516

**STETLER-STEVENSON, M., A. MANSOOR, M. LIM, P. FUKUSHIMA, J. KEHRL, G. MARTI, K. PTASZYNSKI, J. WANG und W. G. STETLER-STEVENSON (1997):**

Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells.

Blood 89, 1708-1715

**STOJDL, D. F., B. LICHTY, S. KNOWLES, R. MARIUS, H. ATKINS, N. SONENBERG und J. C. BELL (2000):**

Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus.

Nature Med. 6, 821-825

**SUENGA, N., H. MORI, Y. ITOH und M. SEIKI (2005):**

CD44 binding through the hemopexin-like domain is critical for its shedding by membrane-type 1 matrix metalloproteinase.

Oncogene 24, 859-868

**SUMMERS, B. A., H. A. GREISEN und M. J. APPEL (1979):**

Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis.

Acta Neuropathol. 46, 1-10



**SUMMERS, B. A., H. A. GREISEN und M. J. G. APPEL (1984):**

Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain.  
J. Comp. Pathol. 94, 65-75

**SUMMERS, B. A. und M. J. APPEL (1987):**

Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis.  
J. Neurocytol. 16, 871-881

**SUMMERS, B. A. und M. J. APPEL (1994):**

Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis.  
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 20, 525-534

**SUTER, S. E., M. B. CHEIN, V. VON MESSLING, B. YIP, R. CATTANEO, W. VERNAU, B. R. MADEWELL und C. A. LONDON (2005):**

*In vitro* canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma.  
Clin. Cancer Res. 11, 1579-1587

**TAKAGI, S., T. KITAMURA, Y. HOSAKA, T. OHSAKI, D. BOSNAKOVSKI, T. KADOSAWA, M. OKUMURA und T. FUJINAGA (2005a):**

Molecular cloning of canine membrane-anchored inhibitor of matrix metalloproteinases, RECK.  
J. Vet. Med. Sci. 67, 385-391

**TAKAGI, S., Y. KATA, K. ASANO, T. OHSAKI, D. BOSNAKOVSKI, Y. HOSHINO, M. OKUMURA, T. KADOSAWA und T. FUJINAGA (2005b):**

Matrix metalloproteinase inhibitor RECK expression in canine tumors.  
J. Vet. Med. Sci. 67, 761-767

**TAKAHASHI, C., Z. SHENG, T. P. HORAN, H. KITAYAMA, M. MAKI, K. HITOMI, Y. KITAURA, S. TAKAI, R. M. SASAHARA, A. HORIMOTO, Y. IKAWA, B. J. RATZKIN, T. ARAKAWA und M. NODA (1998):**

Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 13221-13226

**TAKENAKA, K., S. ISHIKAWA, Y. KAWANO, K. YANAGIHARA, R. MIYAHARA, Y. OTAKE, Y. MORIOKA, C. TAKAHASHI, M. NODA, H. WADA und F. TANAKA (2004):**

Expression of a novel matrix-metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small-cell lung cancer.  
Eur. J. Cancer 40, 1617-1623

- TAKENAKA, K., S. ISHIKAWA, K. YANAGIHARA, R. MIYAHARA, S. HASEGAWA, Y. OTAKE, Y. MORIOKA, Y. TAKAHASHI, M. NODA, H. ITO, H. WADA und F. TANAKA (2005):**  
Prognostic significance of reversion-inducing-cysteine-rich-protein with Kazal motifs expression in resected pathologic stage IIIA N2 non-small-cell lung cancer.  
Ann. Surg. Onc. 12, 817-824
- TAKEUCHI, T., M. HISANAGA, M. NAGAO, N. IKEDA, H. JUJII, F. KOYAMA, T. MUKOGAWA, H. MATSUMOTO, S. KONDO, C. TAKAHASHI, M. NODA und Y. NAKAJIMA (2004):**  
The membrane-anchored matrix-metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer.  
Clin. Cancer Res. 10, 5572-5579
- TAQI, A. M., M. B. ABDURRAHMAN, A. M. YAKUBU und A. F. FLEMING (1981):**  
Regression of Hodgkin's disease after measles.  
Lancet 1, 1112
- TATSUO, H., N. ONO, K. TANAKA und Y. YANAGI (2000):**  
SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus.  
Nature 406, 893-897
- TATSUO, H., N. ONO und Y. YANAGI (2001):**  
Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors.  
J. Virol. 75, 5842-5850
- TATSUO, H. und Y. YANAGI (2002):**  
The Morbillivirus Receptor SLAM (CD150).  
Microbiol. Immunol. 46, 135-142
- TEESALU, T., A. E. HINKKANEN und A. VAHERI (2001):**  
Coordinated induction of extracellular proteolysis systems during experimental autoimmune encephalomyelitis in mice.  
Am. J. Pathol. 159, 2227-2237
- THORNS, C., H. W. BERND, D. HATTON, H. MERZ, A. C. FELLER und K. LANGE (2003):**  
Matrix-metalloproteinases in Hodgkin lymphoma.  
Anticancer Res. 23, 1555-1558
- TIAN, M. und S. KAMOUN (2005):**  
A two disulfide bridge Kazal domain from *Phytophthora* exhibits stable inhibitory activity against serine proteases of the subtilisin family.  
BMC Biochem. 23, 6-15

- TIDONA, C. A., H. W. KURZ, H. R. GELDERBLOM und G. DARAI (1999):**  
Isolation and molecular characterization of a novel cytopathogenic paramyxovirus from tree shrews.  
*Virology* 258, 425-434
- TIKASINGH, E. S., A. H. JONKERS, L. SPENCE und T. H. AITKEN (1966):**  
*Nariva virus*, a hitherto undescribed agent isolated from the Trinidadian rat, *Zygodontomys b. brevicauda*.  
*Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 235-238
- TIPOLD, A., P. MOORE, A. ZURBRIGGEN, I. BURGNER, G. BARBEN und M. VANDEVELDE (1999):**  
Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection.  
*Acta Neuropathol.* 97, 45-56
- TIPOLD, A., M. VANDEVELDE, R. WITTEK, P. MOORE, A. SUMMERFIELD und A. ZURBRIGGEN (2001):**  
Partial protection and intrathecal invasion of CD8(+) T cells in acute canine distemper virus infection.  
*Vet. Microbiol.* 83, 189-203
- TOFT-HANSEN, H., R. K. NUTTALL, D. R. EDWARDS und T. OWENS (2004):**  
Key metalloproteinases are expressed by specific cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis.  
*J. Immunol.* 173, 5209-5218
- ULRICH, R., I. GERHAUSER, F. SEELIGER, W. BAUMGÄRTNER und S. ALLDINGER (2005):**  
Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study.  
*Dev. Neurosci.* 27, 408-418
- ULRICH, R. G. (2006a):**  
Untersuchungen über die Rolle von Matrix-Metalloproteinasen und deren Inhibitoren bei der demyelinisierenden murinen Theilervirus-Enzephalomyelitis mittels RT-qPCR.  
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.
- ULRICH, R., W. BAUMGÄRTNER, I. GERHAUSER, F. SEELIGER, V. HAIST, U. DESCHL und S. ALLDINGER (2006b):**  
MMP-12, MMP-3 and TIMP-1 are markedly up-regulated in chronic demyelinating Theiler's murine encephalomyelitis.  
*J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 783-793

- VANDEVELDE, M., B. KRISTENSEN, K. G. BRAUND, C. E. GREENE, L. J. SWAGO und B. F. HOERLEIN (1980):**  
Chronic canine distemper virus encephalitis in mature dogs.  
Vet. Pathol. 17, 17-28
- VANDEVELDE, M., R. FANKHAUSER, F. KRISTENSEN und B. KRISTENSEN (1981):**  
Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study.  
Acta Neuropathol. 54, 31-41
- VANDEVELDE, M., P. BICHSEL, S. CERRUTI-SOLA, A. STECK, F. KRISTENSEN und R. J. HIGGINS (1983):**  
Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. A sequential immunocytochemical study.  
Acta Neuropathol. 59, 269-276
- VANDEVELDE, M., A. ZURBRIGGEN, R. J. HIGGINS und D. PALMER (1985):**  
Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper.  
Acta Neuropathol. 67, 211-218
- VANDEVELDE, M. und A. ZURBRIGGEN (2005):**  
Demyelination in canine distemper virus infection: a review.  
Acta Neuropathol. 109, 56-68
- VAN LENT, P. L., P. N. SPAN, A. W. SLOETJES, T. R. RADSTAKE, A. W. VAN LIESHOUT, J. J. HEUVEL, C. G. SWEEP und W. B. VAN DEN BERG (2005):**  
Expression and localisation of the new metalloproteinase inhibitor RECK (reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs) in inflamed synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis.  
Ann. Rheum. Dis. 64, 368-374
- VAN MOLL, P., S. ALLDINGER, W. BAUMGÄRTNER und M. ADAMI (1995):**  
Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study.  
Vet. Microbiol. 44, 193-199
- VAN WART, H. E. und H. BIRKEDAL-HANSEN (1990):**  
The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 5578-5582
- VISSE, R. und H. NAGASE (2003):**  
Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.  
Circ. Res. 92, 827-839

**VON SMOLINSKI, D., I. LEVERKOEHNE, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA und A. D. GRUBER (2005):**

Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes.  
Histochem. Cell Biol. 124, 177-188

**VOS, C. M. P., E. S. VAN HAASSTERT, C. J. A. DE GROOT, P. VAN DER VALK und H. E. DE VRIES (2003):**

Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytotic macrophages in active multiple sclerosis lesions.  
J. Neuroimmunol. 138, 106-114

**WANG, L. F., M. YU, E. HANSSON, L. I. PRITCHARD, B. SHIELL, W. P. MICHALSKI und B. T. EATON (2000):**

The exceptionally large genome of hendra virus: Support for creation of a new genus within the family *Paramyxoviridae*.  
J. Virol. 74, 9972-9979

**WANG, Z., R. JUTTERMANN und P. D. SOLOWAY (2000):**

TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*.  
J. Biol. Chem. 275, 26411-26415

**WANG, N., M. MORRA, C. WU, C. GULLO, D. HOWIE, T. COYLE, P. ENGEL und C. TERHORST (2001):**

CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells.  
Immunogenetics 53, 382-394

**WANG, F. Q., J. SO, S. REIERSTAD und D. A. FISHMAN (2006):**

Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases.  
Int. J. Cancer 118, 879-888

**WELLMAN, M. L., S. KRAKOWKA, R. M. JACOBS und G. J. KOCIBA (1988):**

A macrophage-monocytic cell line from a dog with malignant histiocytosis.  
In vitro Cell. Dev. Biol. 24, 223-229

**WELM, B., J. MOTT und Z. WERB (2002):**

Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK.  
Curr. Biol. 12, R209-R211

**WHEELOCK, E. F. und J. H. DINGLE (1964):**

Observations on the repeated administration of viruses to a patient with acute leukemia. A preliminary report.  
N. Engl. J. Med. 271, 645-651

**WOESSNER, J. F. JR. (2002):**

MMPs and TIMPs – an historical perspective.  
Mol. Biotechnol. 22, 33-49

**WOOLF, A., C. GREMILLION-SMITH und R. H. EVANS (1986):**

Evidence of canine distemper virus infection in skunks negative for antibody against rabies virus.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 189, 1086-1088

**WORLEY, J. R., P. B. THOMPSON, M. H. LEE, M. HUTTON, P. SOLOWAY, D. R. EDWARDS, G. MURPHY und V. KNAUPER (2003):**

Sequence motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) determining progelatinase A (proMMP-2) binding and activation by membrane-type metalloproteinase 1 (MT1-MMP).  
Biochem. J. 372, 799-809

**WÜNSCHMANN, A., S. ALLDINGER, E. KREMMER und W. BAUMGÄRTNER (1999):**

Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 67, 101-116

**WÜNSCHMANN, A., E. KREMMER und W. BAUMGÄRTNER (2000):**

Phenotypical characterization of T and B cell areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper.  
Vet. Immun. Immunopathol. 73, 83-98

**WÜRTZ, S. Ø., A. S. SCHROHL, N. MØLLER SØRENSEN, U. LADEMANN, I. J. CHRISTENSEN, H. MOURIDSEN und N. BRÜNNER (2005):**

Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer.  
Endocr. Relat. Cancer 12, 215-227

**YAO, J. S., W. ZHAI, W. L. YOUNG und G. Y. YANG (2006):**

Interleukin-6 triggers human cerebral endothelial cells proliferation and migration: The role for KDR and MMP-9.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. Epub ahead of print

**YONG, V. W., C. A. KREKOSKI, P. A. FORSYTH, R. BELL und D. R. EDWARDS (1998):**

Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS.  
Trends Neurosci. 21, 75-80

**YOSHIKAWA, Y., F. OCHIKUBO, Y. MATSUBARA, H. TSURUOKA, M. ISHII, K. SHIROTA, Y. NOMURA, M. SUGIYAMA und K. YAMANOUCHI (1989):**

Natural infection with canine distemper virus in Japanese monkey (*Macaca fuscata*).

Vet. Microbiol. 20, 193-205

**ZHENG, Z. S., A. M. COHEN, Z. F. ZHANG, W. STETLER-STEVENSON und J. G. GUILLEM (1995):**

Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastasis.

Clin. Cancer Res. 1, 899-906

**ZURBRIGGEN, A., M. YAMAWAKI und M. VANDEVELDE (1993):**

Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes.

Lab. Invest. 68, 277-284

**ZURBRIGGEN, A., I. SCHMID, H. U. GRABER und M. VANDEVELDE (1998):**

Oligodendroglial pathology in canine distemper.

Acta Neuropathol. 95, 71-77

**ZYGIERT, Z. (1971):**

Hodgkin's disease: remissions after measles.

Lancet 1, 593

## 9 Anhang

### 9.1 Bezugsquelle für Reagenzien, Chemikalien und Antikörper

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

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

„6x gel loading buffer“ AB-0594

#### **Biologo, Dr. Hartmut Schultheiß e.K., Immunbiologische Produkte, Kronshagen**

Aszitesflüssigkeit von nicht-immunisierten Balb/cJ Mäusen, CL8100

#### **Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf**

SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose, 840004

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

Kresylechtviolett, 1A 396

Luxolechtblau MBS, 1B 389

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

Anti-humaner CD3-Antikörper aus dem Kaninchen, N1580

Anti-humaner Gliafaserprotein (GFAP)-Antikörper aus dem Kaninchen, Z0334

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

RNAse Out<sup>®</sup>, 10777-019

TRIzol, 15596-026

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

„NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II Kit“, 740609.50

#### **Merck KGaA, Darmstadt**

Tris (hydroxymethyl) -aminomethan (MW 121,14), 108386



**MWG-Biotech, Ebersberg**

Primersynthese für die PCR

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

„GeneAmp RNA PCR Core Kit“, N8080143

**Promega GmbH, Mannheim**

„Random Primers“ 500µg/ml, C1181

**Qiagen GmbH, Hilden**

Omniscript® RT Kit, 205113

RNase-free DNase-Set , 79254

„RNeasy Lipid Tissue Mini Kit“, 74804

RNeasy Mini Kit, 74104

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

Chloroform Rotipuran®, 3313.1

Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (di-Natrium-EDTA-dihydrat; MW 372,24), 8043.2

Essigsäure-n-butylester (EBE), 4600.7

Ethanol Rotipuran®, 9065.2

Ethanol, vergällt, K928.2

Hämalaunlösung sauer nach Mayer, T865.2

Natriumhypochlorit-Lösung, 9062.1

2-Propanol Rotipuran® (Isopropanol), 6752.2

Roti®-Histol (Xylol-Ersatz), 6640.2

Roti®-Histokitt II, T160.1

**Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande**

Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, 4583

**SeqLab, Göttingen**

Sequenzierung von PCR-Produkten

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen**

Azeton, 24201

Borsäure (MW 61,83), B6768

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

Diethylpyrocarbonat (DEPC), 32490

Ethidiumbromid-Lösung 10mg/ml, E1510

Kaninchenserum, R4505

Lektin aus Bandeiraea simplicifolia BS-1 (biotiniliert), L3759

Lithiumcarbonat, 13010

2-Mercaptoethanol, M3148

**Stratagene<sup>®</sup> Europe, Amsterdam, Niederlande**

„Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Core Reagent Kit“, 600546

**Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA, über Biologo, Kronshagen**

Biotiniliertes Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin, BA 1000

Biotiniliertes Ziege-anti-Maus-Immunglobulin, BA 9200

Vectastain Elite ABC-Kit, PK-6100

Vectastain Standard ABC-Kit, PK-4000

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

CD21 (like)-Antikörper, monoklonal Maus-anti-Hund, CA.1D6

**VWR TM International GmbH, Darmstadt (ehemals Merck KGaA, Darmstadt)**

Formaldehydlösung, mind. 37%., 1.03999.2500

Wasserstoffperoxid 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Perhydrol<sup>®</sup>) p.a., 1.07209.0250

## 9.2 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel

### **Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg**

Spektralphotometer GeneQuant™ pro

### **Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen**

BioDocAnalyze video

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

Multicycler® PTC 200

Pipettenspitzen SafeSeal-Tips Premium 10µl, 693010

Pipettenspitzen SafeSeal-Tips Premium 20µl, 692151

Pipettenspitzen SafeSeal-Tips Premium 100µl, 692066

Pipettenspitzen SafeSeal-Tips Premium 200µl, 692069

Pipettenspitzen SafeSeal-Tips Premium 1000µl, 690079

### **Brand GmbH & Co. KG, Wertheim**

PCR-Gefäß 0,5ml, 781310

### **Consort N.V., Turnhout, Belgien**

Mikrocomputer "Elektrophoresis Power Supply", E 425

### **Eppendorf AG, Hamburg**

Eppendorf Zentrifuge 5417 R

Pipette Reference® 10 µl

Pipette Research® 20 µl

Pipette Reference® 100 µl

Pipette Research® 200 µl

Pipette Reference® 1000 µl

**Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig**

SuperFrost®Plus Objektträger, J1800AMNZ

**G. Kisker GbR, Steinfurt**

PAP-Pen®, MKP-1

**Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold**

Heraeus Wärmeschrank UT 6

Heraeus Biofuge 13

**Keutz Laborgeräte, Reiskirchen**

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

Gießvorrichtung, 0030191-03

**Knittel W. Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig**

Deckgläser (24 x 50 mm)

**Konica Minolta Photo Imaging Europe GmbH, Unterföhring**

MINOLTA DiIMAGE Scan Multi Pro

**Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch**

Färbegerät Leica ST 4040

**Medite Medizintechnik, Burgdorf**

Objektträger-Eindeckautomat Promounter RCM 2000

**Merck Eurolab, Darmstadt**

Test Tube Shaker, MELB 1719

**Mettler-Toledo GmbH, Gießen**

Laborwaage PC180

Präzisionswaage LabStyle 204

**Microm, Heidelberg**

Microm HM500

**Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden**

Nunc EasYFlasks™ Nunclon™ Δ, 156367

**Olympus Deutschland GmbH, Hamburg**

Netzmikrometerplatte U-OCMSQ 10/10, 034077

**Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster**

analySIS® 3.1.

**Omnilab-Laborzentrum GmbH & Co. KG, Bremen**

Mikrozentrifuge MC210

**PREMIER Biosoft International, Palo Alto, USA**

Beacon Designer Version 2.1

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

Rotiprotect®-Nitrilhandschuhe, P777.1

**Sarstedt AG & Co, Nümbrecht**

Reaktionsgefäß 1,5 ml, 72.690

Reaktionsgefäß 2,0 ml, 72.695

Zellschaber, 83.1830

**Stratagene® Europe, Amsterdam, Niederlande**

Mx3005P™ QPCR System

Optical cap 8x Strip, 401425

Strip tube 8x 0,2 ml Format, 401428

**Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting**

PCR Tissue Homogenizing Kit; Omni TH220 Homogenisator

Wechselspitzen; Omni Tip® Standard

**Systemec GmbH, Wetttenberg**

Autoklav 3850 ELC

**Thermo Electron GmbH, Dreieich**

Shandon Coverplates™, 72110013

Shandon Sequenza® Slide Racks, 7331017

**Zeiss, Oberkochen**

Zeiss Axiophot Mikroskop

**Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen**

Eismaschine ZBE 70-35

## 9.3 Lösungen und Puffer

### 9.3.1 Histologie

#### Luxol-Fast-Blue Kresylechtviolett-Färbung

Markscheidenfärbung nach Klüver und Barrera (Romeis, 1989):

Luxol-Fast-Blue-Lösung:

0,1 g Luxol Fast Blue / 100 ml abs. Ethanol und 0,5 ml 10 %ige Essigsäure

Kresylechtviolett-Lösung:

0,1 g Kresylechtviolett / 100 ml Aqua dest.

kurz vor Gebrauch 5 Tropfen 10 %ige Essigsäure auf 30 ml Farblösung

0,05 %ige Lithiumcarbonatlösung

Durchführung:

1. Gefrierschnitte 2 Minuten in Formalin nachfixieren
2. 30 Minuten lufttrocknen lassen
3. 15 Minuten in Isopropanol
4. 16 – 24 Stunden in Luxol-Fast-Blue-Lösung bei 57°C
5. Kurz in 96% Ethanol waschen
6. Spülen in Aqua dest.
7. 15 Sekunden in 0,05 %iger Lithiumcarbonatlösung differenzieren
8. 15 Sekunden in 70 %igem Ethanol differenzieren
9. Schritte 7. -8. bis zu 10x wiederholen, bis gewünschte Färbeintensität erreicht ist
10. Spülen in Aqua dest.
11. 6 Minuten in 0,1 %ige Kresylechtviolett-Lösung bei Raumtemperatur
12. Dehydrierung über 2 x 4 Minuten in 96 %igem Ethanol, 4 Minuten in Isopropanol, 4 Minuten in EBE
13. Eindecken mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt II

### 9.3.2 Immunhistologie

#### DAB-Lösung

100 mg DAB in 200 ml PBS, pH 7,1 lösen und mischen (Magnetrührer), anschließend filtrieren und 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) zugeben

#### Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

40 g NaCl und 8,97 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 5 Litern Aqua dest. auflösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,1 einstellen

### 9.3.3 Molekularbiologie

#### Aqua Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandelt

1 ml DEPC-Reinsubstanz mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und schütteln. 16- 24 Stunden bei Raumtemperatur unter einem Abzug stehen lassen (Magnetrührer), danach autoklavieren

#### 2 %iges, ethidiumbromidhaltiges Agarosegel (104,3 cm<sup>2</sup>)

1,82 g Agarose werden in einem Glaskolben in 91 ml TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Danach bis auf 64°C abkühlen lassen, 1,8µl Ethidiumbromidlösung hinzufügen, mischen, in Gießkammer blasenfrei ausgeben und erstarren lassen.

#### 0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub>, pH 8,0

18,6 g di-Natrium-EDTA-dihydrat (MW 372,24; entspricht 4,6 g EDTA) in 60 ml DEPC-Aqua bidest. lösen (Magnetrührer), mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen, mit DEPC-Aqua bidest auf 100 ml auffüllen und autoklavieren.

#### TBE-Elektrophoresepuffer

Für die Stammlösung werden 108,8 g Tris(hydroxymethol)-aminomethan (MW 121,14), 55,0 g Borsäure (MW 61,83) und 40,0 ml 0,5 M EDTA-Na<sub>2</sub> (pH 8,0) mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen (Magnetrührer). Die Stammlösung



autoklavieren und die Gebrauchslösung aus 100 ml Stammlösung und 900 ml Aqua dest. herstellen.

## 9.4 Tabellen

**Tab. 9:** MMP-mRNA-Expression der nicht infizierten und persistierend CDV-infizierten DH82-Zellen

Gruppe	Passage	MMP-2*	MMP-9*	MMP-13*	MMP-14*
DH82	P13 (1)	1,852	0,151	0,055	73,097
	P13 (2)	1,733	0,258	0,060	46,296
	P32 (1)	1,643	0,937	0,205	46,494
	P32 (2)	1,532	0,521	0,181	51,374
DH82Ond	P121 (1)	0,279	1,015	97,077	91,352
	P121 (2)	0,307	0,767	109,102	93,445
	P138 (1)	0,270	0,666	75,449	114,853
	P138 (2)	0,256	0,499	126,232	122,899

□ Minimalwert      □ Maximalwert

DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend CDV-infizierte DH82-Zellen; \* angegeben als Kopien / 100 Kopien GAPDH

**Tab. 10:** TIMP-, RECK- und CDV-mRNA-Expression der unterschiedlichen Hunde

Gruppe	Passage	TIMP-1*	TIMP-2*	RECK*	CDV*	GAPDH <sup>#</sup>
DH82	P13 (1)	1,009	7,442	0,020	n.n.	2,338x10 <sup>7</sup>
	P13 (2)	0,878	5,353	0,013	n.n.	3,456x10 <sup>7</sup>
	P32 (1)	1,000	5,373	0,023	n.n.	2,624x10 <sup>7</sup>
	P32 (2)	1,042	6,831	0,025	n.n.	2,474x10 <sup>7</sup>
DH82Ond	P121 (1)	0,427	2,538	0,055	340,276	2,463x10 <sup>7</sup>
	P121 (2)	0,542	2,660	0,068	243,591	2,395x10 <sup>7</sup>
	P138 (1)	0,621	2,204	0,051	451,277	2,114x10 <sup>7</sup>
	P138 (2)	0,840	2,386	0,048	413,768	2,070x10 <sup>7</sup>

□ Minimalwert      □ Maximalwert

n.n. = nicht nachweisbar; DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend CDV-infizierte DH82-Zellen; \* angegeben als Kopien / 100 Kopien GAPDH; <sup>#</sup> angegeben als Kopien / µl cDNA

**Tab. 11:** Übersicht über die p-Werte der MMPs im Gruppenvergleich der unterschiedlichen Läsionstypen, bzw. der Kontrolltiere mittels des Wilcoxon-Rangsummentests

Verglichene Gruppen		MMP-2	MMP-9	MMP-13	MMP-14	
DH82	DH82Ond	0,0304	0,3123	0,0304	0,0304	
Verglichene Gruppen		TIMP-1	TIMP-2	RECK	CDV	GAPDH
DH82	DH82Ond	0,0304	0,0304	0,0304	0,0211	0,1124

statistisch nicht signifikant

statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

DH82 = nicht infizierte DH82-Zellen; DH82Ond = persistierend CDV-infizierte DH82-Zellen

**Tab. 12:** MMP-mRNA-Expression der unterschiedlichen Hunde

Gruppe	Fall	MMP-2*	MMP-9*	MMP-12*	MMP-13*	MMP-14*
1 Kontrolle	V 239/05	4,646	7,400x10 <sup>-06</sup>	0,009	0,049	7,156
	V 255/05	1,646	2,098x10 <sup>-05</sup>	0,013	0,089	4,648
	V 256/05	4,788	7,045x10 <sup>-05</sup>	0,009	0,079	7,868
	V 258/05	2,424	1,119x10 <sup>-05</sup>	0,025	0,099	7,405
	V 259/05	1,480	n.n.	0,011	0,066	5,739
	V 272/05	1,195	4,810x10 <sup>-06</sup>	0,004	0,098	7,462
	V 304/05	2,039	5,272x10 <sup>-06</sup>	0,016	0,121	7,911
	V 365/05	2,064	8,386x10 <sup>-05</sup>	0,006	0,094	7,585
2 akute Läsionen	S 1175/90	0,493	n.n.	0,010	0,081	4,882
	S 2548/90	1,307	4,167x10 <sup>-04</sup>	0,027	0,139	8,660
	S 35/94	1,577	3,826x10 <sup>-05</sup>	0,021	0,091	6,609
	S 104/95	2,379	3,779x10 <sup>-05</sup>	0,074	0,115	7,485
	S 123/95	2,436	9,582x10 <sup>-04</sup>	0,103	0,056	12,253
	S 192/95	1,767	2,147x10 <sup>-04</sup>	0,252	0,106	18,366
	S 979/95	0,882	1,536x10 <sup>-04</sup>	0,251	0,076	4,783
	S 1708/95	1,076	1,574x10 <sup>-03</sup>	5,833	2,179	4,955
	S 997/03	1,221	2,605x10 <sup>-05</sup>	0,009	0,089	8,297
	S 1069/03	1,638	n.n.	0,111	0,334	7,766
	S 842/04	1,298	n.n.	0,053	0,166	6,077
	S 2658/04	1,111	5,497x10 <sup>-04</sup>	0,039	0,092	5,333
	S 33/05	0,677	8,528x10 <sup>-06</sup>	0,009	0,199	5,294
S 580/05	1,836	6,261x10 <sup>-05</sup>	0,054	0,072	7,736	
3 subakute Läsionen	S 1357/90	1,122	5,742x10 <sup>-04</sup>	0,030	0,112	7,703
	S 98/91	1,199	4,313x10 <sup>-05</sup>	0,031	0,175	7,190
	S 2015/91	4,782	2,973x10 <sup>-03</sup>	0,869	0,103	18,783
	S 103/95	1,357	3,733x10 <sup>-04</sup>	0,026	0,073	9,685
	S 58/05	1,060	n.n.	0,395	0,025	8,931
	S 954/05	1,984	4,575x10 <sup>-04</sup>	0,088	0,080	6,848
4 entzündliche Läsionen	S 1767/95	4,713	1,123x10 <sup>-04</sup>	1,501	0,097	32,332
	S 2115/95	0,757	1,457x10 <sup>-04</sup>	0,032	0,145	5,834
	S 786/98	4,905	8,103x10 <sup>-05</sup>	0,023	0,117	9,074
	S 2936/04	1,364	4,264x10 <sup>-05</sup>	0,012	0,060	9,906
	S 1510/90	2,842	1,130x10 <sup>-04</sup>	0,021	0,131	7,512
	S 2290/90	1,236	n.n.	0,016	0,122	6,008

Minimalwert    
 Maximalwert    
 Extremwert oder Ausreißerwert

\* angegeben als Kopien / 100 Kopien GAPDH; n.n. = nicht nachweisbar

**Tab. 13:** TIMP-, RECK- und CDV-mRNA-Expression der unterschiedlichen Hunde

Gruppe	Fall	TIMP-1*	TIMP-2*	RECK*	CDV*	GAPDH#
1 Kontrolle	V 239/05	0,115	20,399	0,095	n.n.	1,554x10 <sup>7</sup>
	V 255/05	0,104	12,527	0,087	n.n.	1,373x10 <sup>7</sup>
	V 256/05	0,126	14,812	0,121	n.n.	1,276x10 <sup>7</sup>
	V 258/05	0,155	12,821	0,106	n.n.	1,287x10 <sup>7</sup>
	V 259/05	0,106	10,253	0,070	n.n.	1,541x10 <sup>7</sup>
	V 272/05	0,146	15,414	0,085	n.n.	1,330x10 <sup>7</sup>
	V 304/05	0,153	14,625	0,086	n.n.	1,388x10 <sup>7</sup>
	V 365/05	0,112	15,823	0,097	n.n.	1,245x10 <sup>7</sup>
2 akute Läsionen	S 1175/90	0,678	7,195	0,090	31,246	1,148x10 <sup>7</sup>
	S 2548/90	0,518	12,265	0,156	76,340	1,492x10 <sup>7</sup>
	S 35/94	0,088	11,768	0,120	4,155	1,725x10 <sup>7</sup>
	S 104/95	0,342	14,126	0,087	35,260	1,614x10 <sup>7</sup>
	S 123/95	0,551	11,105	0,174	111,534	1,864x10 <sup>7</sup>
	S 192/95	0,685	9,637	0,162	140,293	1,432x10 <sup>7</sup>
	S 979/95	0,130	14,837	0,113	0,892	1,530x10 <sup>7</sup>
	S 1708/95	0,895	20,319	0,184	57,291	1,004x10 <sup>7</sup>
	S 997/03	0,219	13,908	0,075	38,202	1,474x10 <sup>7</sup>
	S 1069/03	0,362	3,606	0,057	158,213	2,149x10 <sup>6</sup>
	S 842/04	0,193	13,189	0,150	16,734	1,433x10 <sup>7</sup>
	S 2658/04	0,138	8,934	0,071	36,126	1,332x10 <sup>7</sup>
	S 33/05	0,092	6,747	0,073	0,029	1,196x10 <sup>7</sup>
S 580/05	0,147	12,906	0,138	78,761	1,356x10 <sup>7</sup>	
3 subakute Läsionen	S 1357/90	0,431	12,997	0,209	12,481	1,685x10 <sup>7</sup>
	S 98/91	0,562	10,580	0,127	64,495	1,484x10 <sup>7</sup>
	S 2015/91	1,278	12,012	0,277	686,271	1,282x10 <sup>7</sup>
	S 103/95	0,376	7,916	0,108	5,701	1,142x10 <sup>7</sup>
	S 58/05	0,703	12,971	0,133	102,454	1,141x10 <sup>7</sup>
	S 954/05	0,825	13,619	0,198	65,370	1,542x10 <sup>7</sup>
4 entzündliche Läsionen	S 1767/95	1,883	10,141	0,112	396,500	5,029x10 <sup>6</sup>
	S 2115/95	0,142	12,096	0,115	1,516	8,846x10 <sup>6</sup>
	S 786/98	0,204	9,281	0,134	294,542	4,159x10 <sup>6</sup>
	S 2936/04	0,655	8,874	0,117	8,348	1,386x10 <sup>7</sup>
	S 1510/90	1,684	21,983	0,178	68,104	7,142x10 <sup>6</sup>
	S 2290/90	0,230	10,291	0,083	10,395	1,545x10 <sup>7</sup>

■ Minimalwert

■ Maximalwert

□ Extremwert oder Ausreißerwert

\* angegeben als Kopien / 100 Kopien GAPDH; # angegeben als Kopien / µl cDNA

n.n. = nicht nachweisbar

**Tab. 14:** Übersicht über die p-Werte der MMPs im Gruppenvergleich der unterschiedlichen Läsionstypen, bzw. der Kontrolltiere mittels des Wilcoxon-Rangsummentests

Verglichene Gruppen		MMP-2	MMP-9	MMP-12	MMP-13	MMP-14
Kontrolle	akut	0,0316	0,0185	0,0037	0,2601	0,9185
Kontrolle	subakut	0,1376	0,0149	0,0024	0,7469	0,1752
Kontrolle	entzündlich	0,9485	0,0230	0,0239	0,1066	0,2725
akut	subakut	0,7105	0,2127	0,5919	0,3865	0,1489
akut	entzündlich	0,2011	0,7340	0,4333	0,8366	0,2655
subakut	entzündlich	0,4712	0,0947	0,1735	0,3785	0,9362

statistisch nicht signifikant       statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

**Tab. 15:** Übersicht über die p-Werte der TIMPs sowie von RECK, CDV und GAPDH im Gruppenvergleich der unterschiedlichen Läsionstypen, bzw. der Kontrolltiere mittels des Wilcoxon-Rangsummentests

Verglichene Gruppen		TIMP-1	TIMP-2	RECK	CDV	GAPDH
Kontrolle	akut	0,0316	0,0518	0,2601	0,0001	0,7074
Kontrolle	subakut	0,0024	0,1066	0,0037	0,0008	0,9495
Kontrolle	entzündlich	0,0081	0,0814	0,0814	0,0008	0,1615
akut	subakut	0,0288	0,9671	0,0762	0,5919	0,9015
akut	entzündlich	0,2655	0,7728	0,8366	0,8366	0,0909
subakut	entzündlich	0,6889	0,4712	0,1735	0,8102	0,1282

statistisch nicht signifikant       statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

## 9.5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
Acc.-Nr.	Accession-Nr.
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Antisense Primer
Asn	Asparagin
Bez.	Bezeichnung
biot.	biotiniliert
bp	Basenpaare
BS-1	Bandeiraea simplicifolia-1
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	„cluster of differentiation“
CDV	„canine distemper virus“
CeMV	Cetacean Morbillivirus
CNPase	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase
COPD	„chronic obstructive pulmonary disease“
COX	Zyklooxygenase
DAB	3'3'Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DNA	„deoxyribonucleic acid“
dNTP	Desoxyribonukleosidtrisulfat
DSH	Deutscher Schäferhund
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epidermal growth factor“
EMMPRIN	„extracellular matrix metalloproteinase inducer“
ERK	„extracellular signal-regulated kinase“

---

EZM	extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	„glial fibrillary acidic protein“
Gi	Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
H	Institut für Pathologie, Tierärztliche Hochschule Hannover
H <sub>2</sub> O	Wasser
HB-EGF	„heparin-binding endothelial growth factor“
HBV	Hepatitis B - Virus
HDAC	Histondeacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER-2/neu	„Growth Factor Receptor 2“
ICAM-1	„intercellular adhesion molecule-1“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF-BP	„insulin-like-growth factor binding protein“
IL	Interleukin
JRT	Jack-Russell-Terrier
Korr.-Koeff.	Korrelations-Koeffizient nach Spearman-Rho
LFB-KV	Luxol-fast-blue Kresylechtviolett
LMP1	„latent membrane protein 1“
m	männlich
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	basisches Myelinprotein
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MHC	„major histocompatibility complex“
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRF	myogener Regulationsfaktor
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
MS	Multiple Sklerose
MT-MMP	„membrane-type matrix metalloproteinase“

---

MV	„measles virus“
MyoD	„myoblast determination factor“
n	Anzahl
n.b.	nicht bekannt
NDV	„Newcastle disease virus“
NF-κB	„nuclear factor“-κB
n.n.	nicht nachweisbar
PBS	„phosphate-buffered saline“, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PDV	„phocine distemper virus“
p.i.	post infectionem
PPRV	Peste-des-petits-ruminants Virus
RECK	„reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs“
ROS	„reactive oxygen species“
RPV	Rinderpest-Virus
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Polymerase-Kettenreaktion
S	Sense Primer
Tab.	Tabelle
TGF	„tumor growth factor“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TIMP	„tissue inhibitor of matrix metalloproteinases“
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem



## Danksagung

Hiermit möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt....

- .... Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, Ph.D. für die Überlassung des interessanten Themas, seine intensive Betreuung, die freundliche Zusammenarbeit und die ständige Ansprechbarkeit.
- .... Frau Dr. S. Alldinger für die freundliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, die konstruktive Kritik, sowie die zügige, genaue Durchsicht des Manuskripts.
- .... Herrn Dr. K. Rohn aus dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Beratung bei statistischen Fragen.
- .... Petra Grünig für die Hilfe bei der Durchführung der Immunhistologie.
- .... Danuta Waschke für die stetige Unterstützung bei allen labortechnischen Fragestellungen und das Züchten der Zellen.
- .... Bettina Buck für die Beantwortung aller Fragen rund um Spezialfärbungen.
- .... Dorthe von Smolinski und Stefan Schmidbauer für die vielen Tipps und Hilfestellungen bei allen Fragen rund um die Molekularbiologie, sowie die Einführung in die Tücken der RT-qPCR.
- .... meinen Freunden und Kollegen Ilka, Katharina und Ingo für die lustigen Stunden im gemeinsamen Büro und außerhalb.
- .... allen anderen, nicht namentlich erwähnten, Freunden, Kollegen und Mitarbeitern aus dem Institut für Pathologie für die stets gewährte Unterstützung, Hilfsbereitschaft und die vielen, technischen und inhaltlichen Tipps und Tricks.
- .... meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit und in jeder Hinsicht unterstützt haben.



ISBN 3-939902-09-8

Verlag: DVG-Service GmbH

Frankfurter Straße 89 · 35392 Gießen

Telefon (06 41) 2 44 66 · Telefax (06 41) 2 53 75 · E-mail: [info@dvg.net](mailto:info@dvg.net) · <http://www.dvg.net>