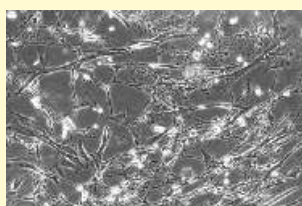
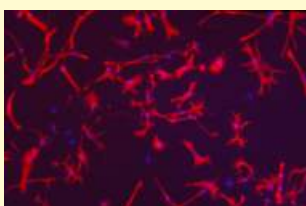
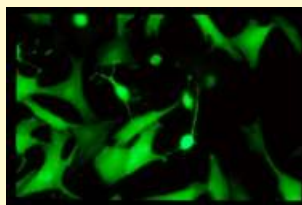


Aus dem Institut für Pathologie  
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

---

## **Einfluss einer Staupevirusinfektion auf die *in vitro* Expression von Matrix-Metalloproteinasen in Gehirnzellpopulationen adulter Hunde**



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

Vorgelegt von  
**Christiane Krudewig**  
aus Siegburg

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 3-938026-84-7

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

Aus dem Institut für Pathologie  
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

---

**Einfluss einer Staupevirusinfektion auf die *in vitro*  
Expression von Matrix-Metalloproteinasen in  
Gehirnzellpopulationen adulter Hunde**

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

Vorgelegt von  
**Christiane Krudewig**  
aus Siegburg

Hannover 2006

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

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

2. Gutachter: Prof'in Andrea Tipold

Tag der mündlichen Prüfung: 24.5.2006

***Meiner Familie***





## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1	Das Staupevirus in kaninen Gehirnzellkulturen .....	3
2.2	Matrix-Metalloproteinasen .....	9
2.2.1	Regulierung der MMPs .....	12
2.2.2	Expression von MMPs und TIMPs in Astrozytenkulturen .....	13
2.2.3	MMPs und TIMPs in Mikroglia kulturen .....	18
2.2.4	Expression von MMPs und TIMPs in Oligodendrozytenkulturen .....	20
2.2.5	Expression von MMPs und TIMPs in neuronalen Kulturen .....	21
2.2.6	Expression von MMPs in zerebralen Endothelzellkulturen .....	22
2.2.7	MMPs im Liquor .....	22
2.2.8	Bedeutung der <i>in vitro</i> Studien .....	25
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1	Allgemeiner Versuchsaufbau .....	27
3.2	Hunde .....	28
3.3	Isolierung der kaninen Gehirnzellen .....	29
3.3.1	Protokoll zur Isolierung von Hundegehirnzellen .....	29
3.3.2	Reinigung der Mikroglia/Makrophagen (Gruppe B) .....	32
3.4	Kulturen zur Bestimmung der MMPs und TIMPs, P1 .....	33
3.4.1	Mischkulturen (Gruppe A <sub>ohne</sub> ) .....	33
3.4.2	Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen im Transwellsystem (Gruppe A <sub>Kokultur</sub> ) .....	33
3.4.3	Gereinigte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen ohne Einfluß von Faktoren (Gruppe B <sub>ohne</sub> ) .....	34
3.4.4	Gereinigte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen mit präkonditioniertem Medium (Gruppe B <sub>Kond</sub> ) .....	34
3.4.5	Gereinigte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen im Transwellsystem (Gruppe B <sub>Kokultur</sub> ) .....	34
3.5	Serumfreie Mischkulturen .....	34
3.6	Virusstamm .....	35
3.6.1	Herstellung eines Viruspools .....	35
3.6.2	Virustitration .....	36
3.6.3	Infektion der Gehirnzellkulturen .....	36
3.7	Charakterisierung der Zellen .....	37
3.7.1	Fluoreszenzfärbung .....	37
3.7.2	Nachweis der Phagozytose .....	45
3.8	RT-qPCR .....	45
3.8.1	RNA-Isolierung .....	45
3.8.2	DNase-Behandlung .....	46
3.8.3	Reverse Transkription .....	47
3.8.4	Quantitative PCR .....	48
3.8.5	Sensitivität der qPCR .....	51
3.9	Zymographie .....	52
3.9.1	Proben für die Zymographie .....	53
3.9.2	Protokoll zur Durchführung der Zymographie .....	53
3.9.3	Kontrollen .....	54
3.10	Western-Blot .....	55
3.10.1	Protokoll Western-Blot .....	55
3.11	Auswertung .....	57

3.11.1	Immunfluoreszenz .....	57
3.11.2	RT-qPCR .....	57
3.11.3	Densitometrie der Gelatine-Zymographie .....	57
3.11.4	Statistik .....	58
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
4.1	Isolierung und Kultivierung der Gehirnzellen.....	61
4.1.1	Zellausbeute und Morphologie der primären Mischkulturen, P0.....	61
4.1.2	Primäre Mischkulturen, P1 (Gruppe A <sub>ohne</sub> ).....	65
4.1.3	Etablierung der gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen, P1 .....	68
4.1.4	Primäre Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (P1, Gruppe B) .....	69
4.1.5	Serumfreie Kulturen .....	70
4.2	MMP- und TIMP-Expression der nicht infizierten Kulturen, P1.....	72
4.2.1	MMP- und TIMP-Expression auf mRNA-Ebene.....	72
4.2.2	Nachweis der proteolytischen Aktivität .....	88
4.2.3	Nachweis der Proteine mittels Western-Blot.....	91
4.3	Virusinfektion der Zellkulturen .....	92
4.3.1	Virusvermehrung und Virustitration in Verozellen .....	92
4.3.2	Vorversuche.....	93
4.3.3	Infizierte Mischkulturen (Gruppe A <sub>Virus</sub> ) .....	93
4.3.4	Infizierte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B <sub>Virus</sub> ) .....	94
4.3.5	Infizierte p75 <sup>NGFR</sup> -positive Zellen.....	96
4.3.6	Expression der MMPs und TIMPs in den infizierten Gruppen A <sub>Virus</sub> und B <sub>Virus</sub> .....	97
4.4	Fotographische Abbildungen.....	109
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>123</b>
5.1	Zellausbeute adulter Gehirnzellkulturen.....	124
5.2	Charakterisierung der Mischkulturen, P1.....	125
5.2.1	Stark Dil-ac-LDL und Iba1 positive Zellpopulation.....	126
5.2.2	A2B5-positive Zellpopulation .....	126
5.2.3	Schwach Dil-ac-LDL und GFAP-positive Zellpopulation.....	128
5.3	Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen, P1 .....	131
5.4	MMP- und TIMP-Expression in kaninen Gehirnzellpopulationen .....	133
5.4.1	Vergleich der MMP- und TIMP-Expression der Mischkulturen (Gruppe A) und der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B) .....	134
5.4.2	Vergleich der MMP- und TIMP-Expression der Mikroglia/Makrophagen (Gruppe B) unter verschiedenen Kulturbedingungen .....	136
5.5	Zelltropismus des Staupevirus und zytopathogener Effekt der Infektion.....	138
5.6	Staupevirus-induzierte Aufregulierung der MMP-2, MMP-9 und MMP-13- Expression in den Mischkulturen .....	141
5.7	Nach Infektion in Mischkulturen konstitutiv exprimierte MMPs und TIMPs ..	145
5.8	Einfluß der Staupevirusinfektion auf die MMP-Expression der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B).....	146
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>149</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>153</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>157</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>177</b>
9.1	Tabellen .....	177
9.1.1	Hunde .....	177
9.1.2	p-Werte .....	178
9.2	Medien und Puffer in der Zellkultur.....	184
9.2.1	Sato's Medium .....	184

9.2.2	Präkonditioniertes Medium .....	184
9.2.3	Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) .....	185
9.2.4	<i>Dulbecco's modified Earle Medium</i> (DMEM) .....	185
9.2.5	Poly-L-Lysin 10 mg/Liter (PLL) .....	186
9.3	Fluoreszenzfärbung .....	186
9.4	qPCR .....	187
9.5	Zymographie, Lösungen und Puffer .....	187
9.6	Western-Blot, Lösungen und Puffer .....	189
9.7	Bezugsquellen für Chemikalien und Antikörper .....	194
9.8	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel .....	198
9.9	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	201



## 1. Einleitung

Das Staupevirus gehört zum Genus Morbillivirus der Familie Paramyxoviridae. Das Wirtsspektrum umfasst den Haushund und zahlreiche andere Karnivoren. Die Staupevirusinfektion manifestiert sich häufig im zentralen Nervensystem (ZNS) unter dem pathologischen Bild einer demyelinisierenden Leukoenzephalitis (DLE). Diese avancierte, aufgrund ähnlicher neuropathologischer Veränderungen, zu einem relevanten Modell für humane demyelinisierende Erkrankungen wie die Multiple Sklerose (MS).

Untersuchungen der Virusprotein-Expression und die Charakterisierung der Entzündungszellinfiltrate zeigen, dass bei der DLE zwei Phasen unterschieden werden können. In akuten und subakuten Herden mit Demyelinisierung und ohne Entzündung ist eine prominente Virusprotein-Expression feststellbar. In chronischen Herden dagegen, ist eine ausgeprägte Entzündung vorhanden, und virale mRNA und Virusprotein sind nur vermindert nachweisbar. Daher wird vermutet, dass die Läsionen in der Frühphase der DLE primär virusinduziert sind, während in der Spätphase immune Pathomechanismen vorliegen. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gehören zu einer großen Familie von kalziumabhängigen, Zink-enthaltenden Proteasen, die in der Lage sind, Komponenten der extrazellulären Matrix zu degradieren. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass MMPs eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Erkrankungen spielen. So wurde gezeigt, dass MMPs kritische Mediatoren bei der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine sind. Desweiteren wurde *in vitro* der Abbau von Myelinbestandteilen nachgewiesen.

Auch in die Pathogenese der DLE scheinen MMPs involviert zu sein. So wurde in immunhistologischen Untersuchungen gezeigt, dass in den Läsionen der DLE eine phasenabhängige Aufregulierung zahlreicher MMPs vorhanden ist. Während in der frühen Phase insbesondere MMP-2 und MMP-9 aufreguliert wurden, dominierten in der späten Phase MMP-11, MMP-12 und MMP-13.

Ziel der vorgelegten Arbeit war es daher, den Einfluß der Staupevirusinfektion auf die MMP- und TIMP-Expression mit Hilfe eines rekombinanten, mittels *green*

*fluorescent protein* markierten Virusstammes in Gehirnzellpopulationen des adulten Hundes quantitativ zu untersuchen. Anhand dieser Studien sollten Einblicke in die zelluläre Quelle der MMP-Expression in Kontrollkulturen adulter Hundegehirnzellen gewonnen und der Einfluß einer Staupevirusinfektion und deren Expression untersucht werden.

## 2. Literaturübersicht

In der Literaturübersicht werden zunächst *in vitro* Studien der Staupevirusinfektion von Gehirnzellkulturen des Hundes behandelt. Hier wird auf den Zelltropismus des Staupevirus und dessen zytopathogenen Effekt (CPE) eingegangen. Weiterhin werden die Unterschiede des *in vitro* Verhaltens zwischen virulenten und zellkulturadaptierten Staupevirusstämmen kurz erläutert. Den zweiten Schwerpunkt der Literaturübersicht bilden die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Zunächst werden Bedeutung und Regulationsmechanismen der MMPs beschrieben, bevor das Expressionsmuster dieser Proteasen in Gliazellkulturen von Mensch, Maus und Ratte dargestellt wird.

### 2.1 Das Staupevirus in kaninen Gehirnzellkulturen

Die Staupevirusinfektion führt *in vivo* häufig zu einer Gehirn- Manifestation. Die Ausbildung einer Polio- oder Leukoenzephalomyelitis ist abhängig vom Staupevirusstamm.

Durch *in vitro* Untersuchungen erlangte man Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung und den Zelltropismus des Virus. Hierbei interessierte insbesondere die Ursache der Demyelinisierung im Rahmen der Leukoenzephalitis. In der akuten Phase der Infektion herrscht *in vivo* zunächst ein Myelinscheidenödem (SUMMERS und APPEL, 1987) vor. Die darauffolgende Demyelinisierung in der subakuten Phase geht mit einer milden Gliose einher, während in der späten Phase neben einer Entmarkung eine Infiltration von Entzündungszellen dominiert (BAUMGÄRTNER und ALLDINGER, 2005; GÄDKE et al., 1997 und 1999). Es wird daher vermutet, dass die initialen pathologischen Prozesse direkt virusinduziert sind, während die Demyelinisierung bei der chronischen DLE als Folge des Entzündungsgeschehens im Rahmen immunpathologischer Mechanismen diskutiert wird.

STORTS et al. (1968) beschrieben erstmalig den CPE nach Infektion kaniner zerebellärer Explantatkulturen mit einem virulenten Staupevirusstamm (Lederle-Stamm).

Sie wiesen eine Synzytienbildung von Astrozyten und mesenchymalen, nicht weiter charakterisierten Zellen 10 Tage nach der Virusinokulation nach und beschrieben intranukleäre und intrazytoplasmatische Einschlüsse in diesen Zellen 12-15 Tage post infectionem (p.i.). Weiterhin konnte eine fehlende Myelinisierung gegenüber nicht-infizierten Kontrollkulturen beobachtet werden.

Die ersten Studien über eine CDV-Infektion an gemischten glialen Gehirnzellkulturen neonataler Hunde und Mäuse führten ZURBRIGGEN et al. (1983) durch. Sie verwendeten zur Infektion einen Zellkultur-adaptierten Impfstamm (CDV-Ond) und beobachteten 24 Stunden (Std) p.i. einen CPE; 72 Std p.i. waren 50% der Kultur betroffen. Sie isolierten neben Astrozyten und Makrophagen zahlreiche *myelin basic protein* (MBP)-positive multipolare Oligodendrozyten in den murinen und kaninen Gliakulturen. Der CPE der Astrozyten des Hundes und der Maus stimmte weitgehend überein, beide zeigten Synzytienbildung und Lyse der Zellen.

Speziesspezifische Unterschiede wurden jedoch bei den Oligodendrozyten festgestellt. Die kaninen Oligodendrozyten zeigten im Gegensatz zu den murinen pathomorphologische Veränderungen. Sie wiesen irregulär erweiterte Perikarya und Fortsätze mit Defekten der Zellmembran auf; eine Fusion (Synzytienbildung) der Oligodendrozyten mit den Astrozyten wurde nicht nachgewiesen. Trotz dieser degenerativen Veränderungen der Oligodendrozyten konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung nur in Astrozyten und mesenchymalen Zellen eine Infektion nachgewiesen werden, während Oligodendrozyten kein Staupevirusantigen exprimierten (ZURBRIGGEN et al., 1983).

Vergleichende *in vitro* Studien mit verschiedenen Staupevirusstämmen bestätigten den Zelltropismus weitgehend (PEARCE-KELLING et al., 1990, 1991). Hierzu wurden zwei virulente Virusstämmen, der polioenzephalitische Stamm Snyder Hill (CDV-SH) und der leukoenzephalitische Stamm Cornell A75-17 (CDV-A75-17) sowie ein zellkulturadaptierter, ursprünglich leukoenzephalitischer Virusstamm Rockborn (CDV-RO) verwendet.

Die zerebralen und zerebellären glialen Mischkulturen von neonatalen Hunden wurden über einen Zeitraum von 35 Tagen p.i. untersucht. Hierbei wurde bei allen



drei Stämmen eine regelmäßige Infektion von Astrozyten, Fibroblasten und Makrophagen festgestellt. Alle drei Stämme führten 7 Tage p.i. zur Bildung von Synzytien und zytoplasmatischen und intranukleären Einschlüssen vornehmlich in Astrozyten, aber auch in Mikroglia und Makrophagen.

Die beiden virulenten Stämme infizierten einen Großteil der Astrozyten 14 Tage (CDV-SH) bzw. 28 bis 35 Tage (CDV-A75-17) p.i.; der CPE bestand in einer Synzytienbildung der Astrozyten und es wurde keine Zytolyse induziert. Auch nach 63 Tagen p.i. war die Astrozytendichte der infizierten Kulturen vergleichbar mit der Dichte von Kontrollkulturen.

Nach Inokulation mit dem virulenten polioenzephalitischen Stamm CDV-SH exprimierten 14 Tage p.i. 75% der Astrozyten und 35 Tage p.i. 100% der Zellen virales Antigen.

Im Gegensatz dazu zeigten 14 Tage nach Inokulation mit dem leukoenzephalitischen Stamm CDV-A75-17 lediglich 25% der Zellen eine positive Immunreaktion und erst nach 35 Tagen p.i. kam es zum raschen Anstieg der Antigenexpression. Nach 49 Tagen p.i. waren 100% der Zellen persistierend infiziert.

Die *in vitro* langsamere Anpassung des leukoenzephalitischen Stammes CDV-A75-17 an das Wachstum der Astrozyten korreliert mit seinem *in vivo* Verhalten. Während CDV-SH zu einer akuten Polioenzephalitis führt, induziert CDV-A75-17 einen chronischen leukoenzephalitischen Verlauf mit vorherrschender Demyelinisierung.

Der attenuierte Virusstamm CDV-RO induzierte neben einer Fusion eine Zytolyse der Astrozyten. 14 Tage nach Inokulation mit dem attenuierten Stamm (CDV-RO) exprimierten 100% der Astrozyten virales Antigen. Die ab dem 7. Tag p.i. beobachtete Lyse der Astrozyten führte 21 Tage p.i. zu einer deutlich verminderten Anzahl der Astrozyten in den infizierten Kulturen.

21 Tage nach Virusinokulation mit CDV-RO und CDV-A75-17 waren 100% der Makrophagen Antigen-positiv. Virale Einschlüsse wurden im Zellkern und im Zytoplasma der Zellen beobachtet. Die Kinetik infizierter Fibroblasten in der Kultur verhielt sich ähnlich zu der von Astrozyten.

Für die leukoenzephalitischen Stämme (CDV-RO, CDV-A75-17), nicht jedoch für den polioenzephalitischen Stamm CDV-SH konnten PEARCE-KELLING et al. (1991) in Mischkulturen eine Infektion sowohl in Astrozyten als auch in bipolaren Galactocerebroside (GC)- positiven Oligodendrozyten nachweisen. Diese bipolaren Zellen, die nur einen kleinen Teil der Population darstellten (<5%), wiesen nach der Infektion keinen CPE und die Kulturen keine Reduktion der Zahl der Oligodendrozyten gegenüber den Kontrollkulturen auf. Die Mehrheit dieser Zellen war sowohl bei CDV-RO, als auch CDV-A75-17 21 Tage p.i. infiziert. Die multipolaren *myelin associated antigen* (MAG)-positiven Oligodendrozyten ließen sich nicht infizieren, waren aber zu späteren Zeitpunkten in den Zellkulturen nicht mehr nachweisbar. Diese Beobachtungen bestätigten damit Untersuchungen von ZURBRIGGEN et al. (1987 b).

Eine weitere *in vitro* Studie zeigte eine restriktive Infektion der Oligodendrozyten (Zurbruggen et al., 1993). Durch Kombination von *in situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenz wurde nachgewiesen, dass eine von hundert CDV-RNS-exprimierenden Zellen positiv im Staupevirusprotein-Nachweis war.

Neue Einblicke in die Pathogenese der Demyelinisierung gaben *in vitro* Studien von ZURBRIGGEN et al. (1998). Sie beschrieben zunächst eine Herabregulierung der Myelinge der Oligodendrozyten und sekundär eine Degeneration der Oligodendrozyten. Dies veranlasste zu der Hypothese, dass ein metabolisches Ungleichgewicht die Degeneration der Oligodendrozyten bedingt .

Unterstützt wurde diese Theorie durch Untersuchungen von SCHOBESBERGER et al. (2000). Sie wiesen weder apoptotische Merkmale noch eine der Zytolyse vergleichbare Nekrose von Oligodendrozyten nach. Interessanterweise konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass die Oligodendrozyten langsam, an den distalen Fortsätzen beginnend, degenerierten.

Für die Pathogenese der chronischen Leukoenzephalomyelitis werden jedoch auch andere Mechanismen der Demyelinisierung diskutiert. Während Staupevirus-Antigen nur sehr vereinzelt nachgewiesen wird, dominieren neben der Demyelinisierung mononukleäre Entzündungsinfiltrate. Zusätzlich ist eine

Aufregulierung Antigen-präsentierender Zellen zu beobachten (ALLDINGER et al., 1996). Die Beobachtungen weisen möglicherweise auf eine immunpathologische Demyelinisierung in der chronischen Phase hin. Andere Untersuchungen ergaben Hinweise auf das Vorliegen einer sogenannten *bystander demyelination* angesehen (BOTTERON et al., 1992; STEIN et al., 2004 b).

CAMMER et al. (1978) schufen diesen Begriff, nachdem sie *in vitro* eine Schädigung von Myelin durch neutrale Proteasen aktivierter Makrophagen beobachteten. Heute wird er für eine Demyelinisierung angewendet, die auf einer sekundären Schädigung der Oligodendrozyten durch andere Gliazellen und infiltrierende Makrophagen beruht.

Ausgehend von der Annahme, dass infizierte gliale Zellpopulationen möglicherweise zytotoxische Substanzen ins Medium sezernierten, untersuchten ZURBRIGGEN et al. (1987 a) den Einfluss von konditioniertem Medium auf nicht-infizierte Kulturen. Sie inkubierten nicht infizierte Gliazellkulturen mit präkonditioniertem, von infizierten Kulturen gewonnenem Medium. Dies induzierte jedoch keine Schädigung der Oligodendrozyten.

BÜRGE et al. (1989) gingen ebenfalls dieser Theorie nach. Sie wiesen in infizierten Kulturen durch eine Stimulierung mit Staupevirusantikörpern aus Serum infizierter Tiere eine erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) im Vergleich zu den nicht-infizierten Kulturen nach. ROS spielen möglicherweise eine Rolle in der *bystander demyelination* (GRIOT et al., 1989, 1990). KONAT und WIGGINS (1985) beschrieben eine erhöhte Sensitivität der Oligodendrozyten gegenüber der zytotoxischen Wirkung der ROS. Neuere Untersuchungen an *ex vivo* isolierter Mikroglia sprechen ebenfalls für eine Beteiligung von ROS an der Pathogenese der Demyelinisierung. Mikroglia erkrankter Tiere wies nach Stimulierung eine signifikant höhere ROS-Bildung auf als Mikroglia gesunder Kontrolltiere (STEIN et al. 2004 b).

Die *in vitro* Persistenz von virulenten Stämme wurde ebenfalls untersucht (ZURBRIGGEN et al., 1995). Eine selektive Ausbreitung über zelluläre Fortsätze konnte für das virulente Virus nicht jedoch für den attenuierten, zytolytischen

Staupevirusstamm nachgewiesen werden und war mit einer verminderten Virusfreisetzung in den extrazellulären Raum assoziiert.

Sie stellt möglicherweise *in vivo* einen Mechanismus des Virus dar, dem Immunsystem zu entgehen und im ZNS in den Astrozyten zu persistieren. Unterschiede in der viralen Transkription, eine weitere denkbare Erklärung für Viruspersistenz, schienen nicht vorzuliegen (ZURBRIGGEN et al., 1995).

Die Studien von GRÖNE et al. (2002) et al zeigten eine Aufregulierung von pro-inflammatorischen Zytokinen in kaninen Explantatkulturen und permanenten Zelllinien nach Staupevirusinfektion mittels RT-PCR. Bei den Gehirnzellkulturen führte eine CDV-Infektion mit CDV-Ond zu einer signifikanten Aufregulierung von Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), insbesondere an Tag 3 und 6 p.i. Auf Proteinebene war ebenfalls eine signifikante Aufregulierung von TNF- $\alpha$  und IL-6 zu beobachten. Der transformierende Wachstumsfaktor-beta (TGF- $\beta$ ) und IL-8 wurden ebenfalls untersucht, zeigten aber keine Unterschiede zwischen CDV-infizierten Kulturen und Kontrollkulturen.

Die zitierten *in vitro* Studien kaniner Glia beschränken sich bis auf eine Ausnahme auf Kulturen neonataler Tiere. Das Staupevirus zeigt in Gehirnzellkulturen einen Tropismus für Astrozyten, Makrophagen/Mikroglia und mesenchymale Zellen. Im Gegensatz dazu wird in Oligodendrozyten lediglich eine restriktive Infektion nachgewiesen. Der CPE äußert sich sowohl bei virulenten als auch bei zellkulturadaptierten polio- und leukoenzephalitischen Stämmen in einer Synzytienbildung der Astrozyten. Die zellkulturadaptierten Stämme führen zusätzlich zu einer Zytolyse der infizierten Zellen, die hingegen bei virulenten Stämmen kaum beobachtet wird. Die Persistenz der virulenten Stämme in Astrozyten wird mit dem Verbreitungsmodus des Virus entlang der Ausläufer erklärt. *In vitro* führt die Infektion mit leukoenzephalitischen Stämmen zu einem Schwund der Oligodendrozyten. Neuere Arbeiten geben Hinweise darauf, dass diese virusinduzierte Degeneration der Oligodendrozyten ein langsamer Prozess ist, der auf einer metabolischen Imbalance beruht und mit einer Herabregulierung der Myelogene einhergeht. Andere *in vitro* Studien sprechen für

immunpathologische Prozesse im Rahmen der chronischen DLE. Hier wird neben pro-inflammatorischen Zytokinen den *reactive oxygen species* auf Grund ihrer zytotoxischen Wirkung eine wichtige Rolle zugewiesen.

## 2.2 Matrix-Metalloproteinasen

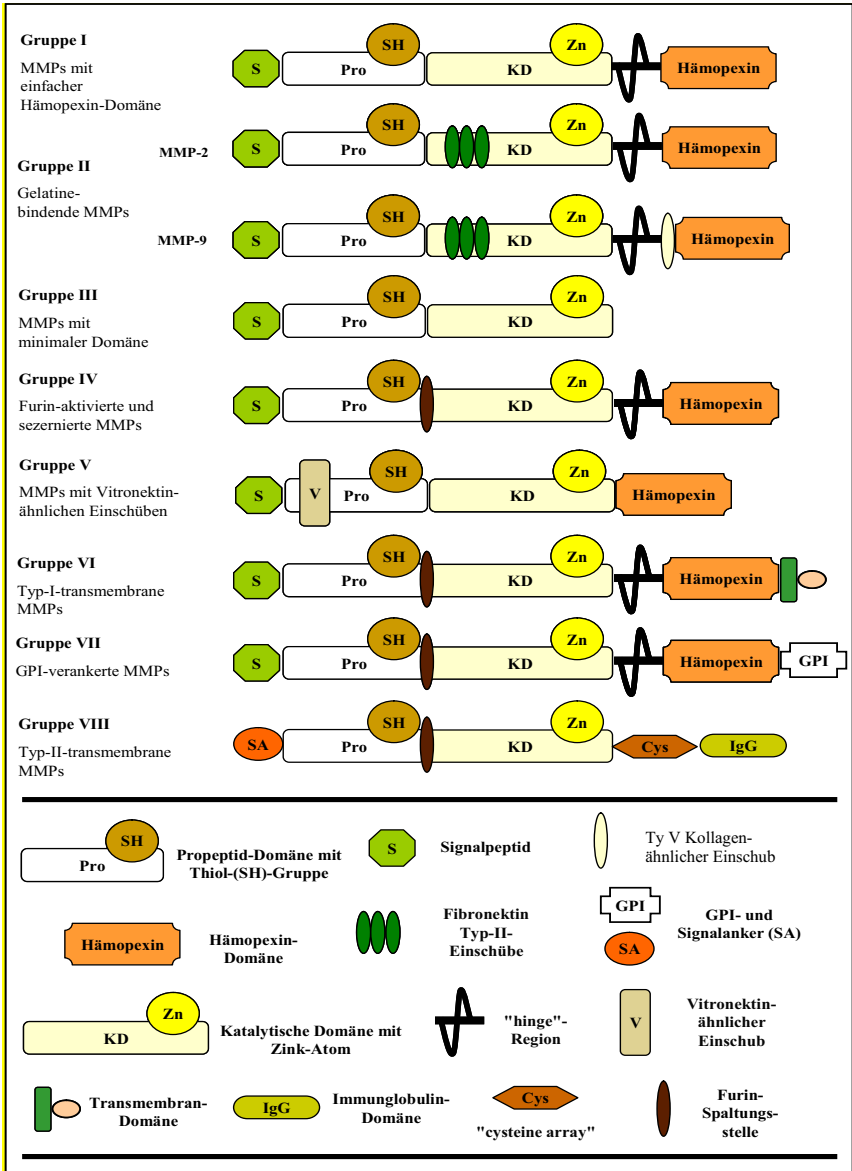
Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) stellen eine große Gruppe von Kalzium-abhängigen, Zink-enhaltenden Enzymen dar, welche die Fähigkeit besitzen, Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) zu degradieren (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). Sie gehören zu einer großen Gruppe von Endopeptidasen, die (ausgenommen der membrangebundenen MMPs) als Proenzyme sezerniert werden und der Aktivierung bedürfen. Die endogenen Inhibitoren der aktiven Formen sind die *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMPs).

1962 beschrieben GROSS und LAPIERE in einer *in vitro* Studie mit Teilen von Kaulquappenschwänzen im Rahmen von Seminalstudien ein „kollagenolytisches Enzym“, welches in der Lage war, Kollagenfibrillen anzugreifen. Dieser ersten Veröffentlichung folgten Berichte über die Entdeckung von Kollagenasen in humanen Geweben (MMP-1, GROSS und NAGAI, 1965) und in neutrophilen Granulozyten (MMP-8; LAZARUS et al., 1968). Heute ist bekannt, dass MMPs und TIMPs bei einer großen Anzahl physiologischer Prozesse wie beispielsweise der Wundheilung (AGREN, 1994), Ovulation (TSAFRIRI, 1995), Angiogenese und der Entwicklung zahlreicher Organe (VU et al., 1998, ULRICH et al., 2005) eine Rolle spielen.

Im Rahmen pathologischer Prozesse wird ihnen im zentralen Nervensystem (ZNS) als Mediatoren neuroinflammatorischer und degenerativer Prozesse eine große Bedeutung zugesprochen (YONG et al., 2001; ROSENBERG, 2002). Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass die Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9) insbesondere bei der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle spielen. MMPs sind in der Lage, einen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, die Basallamina, zu degradieren, wodurch der Einstrom von Entzündungszellen und Proteinen ermöglicht wird (MUN-BRYCE und ROSENBERG, 1998).

Die verschiedenen MMPs besitzen eine unterschiedliche z.T. überlappende Substratspezifität. Die mindestens 25 bekannten MMPs unterteilt man entsprechend ihrer Substratspezifität zunächst in verschiedene Familien. So werden Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und Membran-gebundene MMPs (*membrane type*-MMPs, MT-MMPs) unterschieden. Die neuere Klassifizierung erfolgte anhand ihrer Struktur und ihres Domänenaufbaus (MCCAWLEY und MATRISIAN, 2001; EGEBLAD und WERB, 2002; STAMENKOVIC, 2003). Nach dieser existieren acht verschiedene MMP-Strukturklassen. Fünf bestehen aus in den Extrazellulärraum sezernierten MMPs (Gruppe I-V, Abb.1), während die anderen drei Strukturklassen membrangebundene MMPs enthalten (Gruppen VI-VIII, Abb.1). In der Strukturklasse der sezernierten MMPs unterscheidet man MMPs mit einfacher Hämopexin-Domäne (wie z.B. MMP-1, -3, -10, -13), Gelatine-bindende MMPs (MMP-2 und -9), MMPs mit minimaler Domäne (MMP-7, -26), Furin-aktivierte, sezernierte MMPs (MMP-11 und -28) und MMPs mit Vitronektin-ähnlichen Einschüben (MMP-21; EGEBLAD und WERB, 2002). Die an der Zellmembran verankerten MMPs lassen sich in Typ I-transmembrane MMPs (MMP-14 bis -16, MMP-24), Typ II-transmembrane MMPs (MMP-23) und GPI-(Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol)-verankerte MMPs (MMP-17, MMP-25) unterteilen (SOMERVILLE, 2003).

Abb. 1. Schematischer Aufbau der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)



(nach STERNLICHT und WERB, 2001; SOMERVILLE, 2003)

### 2.2.1 Regulierung der MMPs

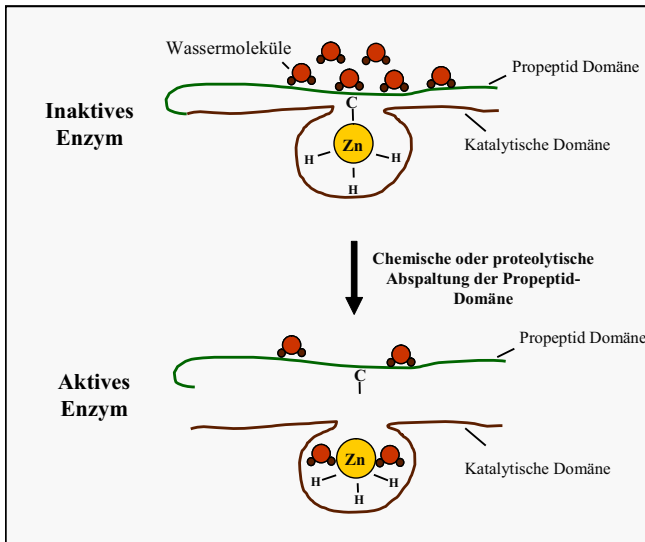
Die Aktivität der MMPs unterliegt einer Reihe von Regulationsmechanismen. Auf der Ebene der Transkription erfolgt die Regulierung über Zytokine und zahlreiche Wachstumsfaktoren (SPIEGEL et al., 1996; FINI et al., 1998).

Die posttranskriptionelle Regulation erfolgt zum einen über die Stabilisierung der mRNA verschiedener MMPs und zum anderen durch die gezielte Freisetzung von intrazellulär gespeicherten MMPs (STERNLICHT und WERB, 2001). Ein weiterer posttranskriptioneller Regulator von MMP-9 ist der membranständige RECK-Rezeptor (*reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*). Der genaue Regulationsmechanismus ist noch nicht bekannt, eine Überexpression von RECK führt jedoch zu einer Herabregulierung von MMP-9-Protein (OH et al., 2001; BAKER et al., 2002).

Die Aktivierung der in den Extrazellularraum sezernierten Proenzyme erfolgt durch den sogenannten *cysteine switch*, bei dem es zur Abspaltung der Propeptide und zur Freisetzung des katalytischen Zentrums mittels Proteasen kommt (Abb.2). Als solche Proteasen können auch andere MMPs fungieren. So ist bekannt, dass pro-MMP-9 durch MMP-13 und pro-MMP-2 durch MMP-14 aktiviert wird (KIESEIER et al., 1999; ROSENBERG, 2002). Die proteolytische Aktivität der aktivierten MMPs wird zusätzlich über TIMPs reguliert. Diese blockieren das katalytische Zentrum der MMPs durch eine nicht-kovalente Bindung im Verhältnis 1:1.



Abb. 2. Mechanismus der Aktivierung der MMPs



C = Cysteine, H = Histidin, Zn = Zink

(nach SOMERVILLE et al., 2003)

Die Abbildung stellt stark vereinfacht die Aktivierung der Proenzyme dar. Cystein stabilisiert das Proenzym durch Bindung des  $Zn^{2+}$ -Ions. Durch hydrolytische Abspaltung (*cysteine switch*) der Propeptiddomäne wird die katalytische Domäne mit dem  $Zn^{2+}$ -Ion im Zentrum aktiviert („intermediäre Form“) und das Enzym erhält proteolytische Aktivität. Die Abspaltung der Propeptidregion erfolgt durch autolytische Spaltung oder andere Proteasen (z.B. MMPs), dabei reduziert sich die Masse der aktiven Form um 8-10 kDa.

### 2.2.2 Expression von MMPs und TIMPs in Astrozytenkulturen

Zur Untersuchung der zellulären Herkunft der MMPs stellen *in vitro* Studien eine wichtige Grundlage dar. Anhand dieser können Herkunft, Aktivierung, Hemmung sowie sub- und interzelluläre Einflüsse untersucht werden. Zahlreiche Studien über die MMP-Expression sind mit fetalen neonatalen Gliazellen durchgeführt worden. Dies erschwert die Übertragung der Ergebnisse auf den adulten Organismus. So ist es z.B. bekannt, dass MMPs in verschiedenen Entwicklungsphasen des Nervensystems auf und/oder abreguliert werden (CANETE-SOLER et al., 1995; VAILLANT et al., 2003, ULRICH et al., 2005). Untersuchungen über die Expression

der MMPs in adulten, kaninen, glialen Gehirnzellkulturen sind nach derzeitigem Stand nicht beschrieben worden.

Astrozyten spielen im ZNS eine wichtige Rolle im Rahmen vieler neurodegenerativer und –inflammatorischer Prozesse. Vor diesem Hintergrund behandeln zahlreiche Arbeiten die MMP-Expression dieser Zellen. Die *in vitro* Studien zur MMP-Expression in Astrozytenkulturen sind größtenteils mit fetalen humanen oder neonatalen Ratten- oder Mäusezellen durchgeführt worden.

Dabei wurde der Nachweis der Expression von MMP-1, -2, -3, -9, -10, -12, -13 und -14 sowie von TIMP-1, -2 und -3 zum Teil auf RNA-Ebene (quantitative PCR, Northern-Blot) und zum Teil auf Proteinebene (Western-Blot, Zymographie) erbracht (LIUZZI et al., 2004a, WAGNER et al., 2003).

In zymographischen Untersuchungen neonataler Ratten- und fetaler humaner Astrozytenkulturen wurde gezeigt, dass vor allem pro-MMP-2 sowie geringe Mengen MMP-2 und pro-MMP-9 eine konstitutive gelatinolytische Aktivität aufwiesen (APODACA et al., 1990; GOTTSCHALL und YU, 1995; GOTTSCHALL und DEB, 1996; MUIR et al., 2002).

Diese Studien zeigten weiterhin, dass die gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 durch proinflammatorische Zytokine in Astrozytenkulturen induzierbar war (GOTTSCHALL und YU, 1995; LIUZZI et al., 1999). Eine Aufregulierung der MMP-9-Expression ist nach Stimulierung mit IL-1, TNF- $\alpha$  und Lipopolysacchariden (LPS) beschrieben worden (GOTTSCHALL und DEB, 1996; LIUZZI et al., 2004b).

Obwohl zahlreiche Arbeiten von einer konstitutiven MMP-2-Expression berichten, wiesen einige Autoren nach Stimulierung eine Aufregulierung von MMP-2 auf Proteinebene nach (GOTTSCHALL und YU, 1995). Die Arbeit von LIUZZI et al. (2004) zeigte, dass es nach Behandlung von neonatalen Astrozytenkulturen der Ratte mit LPS zu einer Aufregulierung der gelatinolytischen Aktivität von pro-MMP-2, aktivem MMP-2 und von pro-MMP-9 kam. MUIR et al. (2002) wiesen MMP-3 im Western-Blot in konzentrierten Zellkulturüberständen von primären neonatalen Astrozytenkulturen der Ratte nach.

Stimulierung mit IL-1 und Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) führte zu einer Aufregulierung der MMP-2-Proteinexpression (Western-Blot), während gelatinolytisch aktives

MMP-2 nicht vermehrt nachgewiesen werden konnte. Ebenso wurde eine gesteigerte Expression von MMP-3-Protein in murinen neonatalen Astrozytenkulturen beschrieben (ZAWADA und KOI, 2003).

In den Zelllysaten der Astrozytenkulturen wiesen ZAWADA und KOI (2003) die Inhibitoren TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 mittels Western-Blot nach. Stimulierung mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führte zu einer Aufregulierung der MMP-9-Proteinexpression und einer verminderten Expression von TIMP-3.

SURYADEVARA et al. (2003) untersuchten humane fetale Astrozytenkulturen auf ihre TIMP-1-Expression nach Stimulierung. In dieser Arbeit wurde auf RNA- und Proteinebene in stimulierten Kulturen nach 24 Std, 48 Std und 6 Tagen eine signifikant höhere TIMP-1-Expression als in Kontrollkulturen beobachtet. Der Langzeiteinsatz von IL-1 zeigte jedoch nach 21 Tagen einen signifikanten Abfall der TIMP-1-Produktion gegenüber den Kontrollkulturen. Diese Ergebnisse weisen in humanen fetalen Astrozytenkulturen auf einen biphasischen Verlauf der TIMP-1 Produktion nach Stimulierung hin.

In der Studie von MUIR et al. (2002) wurden auch zwei Astrozytenzelllinien auf ihre MMP-Aktivität untersucht. Die Zelllinien unterschiedlicher Herkunft (A7: optischer Nerv fetaler Ratten; Neu7: Cortex cerebri neonataler Ratten) wiesen eine relativ hohe (A7) bzw. niedrige (Neu7) Permissivität in Bezug auf das Neuritenwachstum auf. Während die Zelllinie A7 im Vergleich zu den primären Astrozytenkulturen weniger MMP-2 exprimierte und MMP-9 nicht nachweisbar war, exprimierte die Zelllinie Neu7 vergleichbare Mengen an MMPs. Übereinstimmend mit den primären Astrozytenkulturen der Ratte war die Expression von MMP-3, TIMP-1 und TIMP-2, während TIMP-3-Protein in Zelllysaten nicht nachgewiesen werden konnte.

Neben proinflammatorischen Substanzen wurde der Einfluß von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden auf die MMP-Expression untersucht. So zeigten DEB und GOTTSCHALL (1995) in neonatalen Astrozytenkulturen und Astrozyten/Neuronen-Kokulturen nach Zugabe von  $\beta$ -Amyloid-Peptiden eine Aufregulierung von pro-MMP-2, pro-MMP-9 und einer nicht identifizierten Gelatinase mit einem Molekulargewicht von 52 bis 54 kDa, bei der es sich möglicherweise um ein Proenzym von MMP-3

handelt. Im Western-Blot war MMP-3 nachweisbar. Die Aufregulierung durch  $\beta$ -Amyloid-Peptide ist insofern interessant, als dass  $\beta$ -Amyloid-Peptide ein Hauptbestandteil der Plaques bei Alzheimer-Patienten darstellen. Eine veränderte Expression verschiedener MMPs wurde *in vivo* zum einen in Assoziation mit Plaques und neurofibrillären Bündeln und zum anderen im Liquor und Plasma von Alzheimer-Patientinnen und -Patienten beschrieben (PERESS et al., 1995; LEAKE et al., 2000).

Die Expression der MMPs unter verschiedenen Kulturbedingungen und der Einfluss tropher Faktoren auf ihre Expression wurde in glialen Zellkulturen nur wenig untersucht. MASSENGALE et al. (2002) stellten im Rahmen von Diabetesstudien fest, dass die Expression von MMP-9 in neonatalen Mäuseastrozyten nach Stimulierung mit TNF- $\alpha$  von der Kohlenhydratquelle im Medium beeinflusst wurde. Glukose führte im Vergleich zu Sorbitol zu einer gesteigerten MMP-9 Expression nach Stimulierung.

Bedeutsam sind diese Untersuchungen im Hinblick auf den Einfluß einer Hyperglykämie auf die neurologische Symptomatik. So zeigen *in vivo* Studien von CHERIAN et al. (1994) im Tiermodell, dass der Ersatz von Glukose durch Sorbitol die Regeneration nach spinaler Ischämie deutlich besserte. Auch beim Menschen verhindert eine Hyperglykämie durch vasogene Ödeme und Entzündung eine Verbesserung der neurologischen Symptomatik (GISSELSON et al., 1999).

Zusammenhänge zwischen der MMP-2-Expression und der GFAP-Expression untersuchten COSTA et al. (2002) in Kokulturen von Mäuseastrozyten mit Neuronen. Die gereinigten Astrozytenkulturen und die Astrozyten/Neuronen Kokulturen wiesen eine ähnliche gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 und MMP-2 auf. Weiterhin wurde mittels Northern-Blot in den Astrozytenkulturen MMP-2-, MMP-14- und TIMP-2-RNA nachgewiesen.

Nach Transfektion der Kulturen mit *antisense* GFAP-mRNA wiesen beide Kulturarten eine signifikant niedrigere pro-MMP-2-Expression als die Kontrollkulturen auf. Diese verminderte pro-MMP-2-Expression schien in direktem Zusammenhang mit der verminderten GFAP-Expression der Astrozyten zu stehen und wurde bei transfizierten Kulturen mit und ohne Läsionen gefunden.

Weiterhin wurde in der oben genannten Studie der Einfluß von Zellläsionen auf die gelatinolytische Aktivität der aktiven MMP-2-Form untersucht. Ein signifikanter Abfall von aktivem MMP-2 wurde nur in transfizierten Kulturen mit Läsionen gesehen. Die Autoren folgerten daraus, dass die gegenüber den Kontrollkulturen verminderte Expression der aktiven Form von MMP-2 sowohl von der glialen Narbenbildung als auch von der verminderten GFAP-Expression der Zellen abzuhängig ist.

Studien über die zellulären Regulationsmechanismen von MMP-9 (LEE et al., 2003; ARAI et al., 2003) wiesen nach, dass eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  sowohl die Proteinkinase C (PKC), die MAP-Kinaseaktivität als auch die MMP-9-Expression erhöhte, eine Inhibition der PKC und der ERK-Kinase jedoch eine Aufregulierung nach Stimulierung verhindern konnte. Die Aufregulierung nach TNF- $\alpha$ -Zugabe ließ sich sowohl über die Inhibition des p38 MAP-Kinase-Weges, als auch des JNK-Kinase-Weges aufheben (ARAI et al., 2003).

Diese Studien zeigen in Übereinstimmung, dass humane, murine und Rattenastrozyten *in vitro* sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene die Gelatinase A (MMP-2) konstitutiv exprimieren. In aktivierten Kulturen lässt sich eine gelatinolytische Aktivität des Zymogens und der aktiven Form von MMP-2 nachweisen. In den Arbeiten wurden widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Stimulierbarkeit der MMP-2-Expression beschrieben. Einige zeigten eine nicht stimulierbare gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 (ZAWDA und KOI), weitere Arbeiten zeigten jedoch nach Stimulierung eine Aufregulierung zumindest der Proteinexpression bzw. gelatinolytischen Aktivität von MMP-2 (GOTTSCHALL und YU, 1995, MUIR et al. 2002).

In den Astrozytenkulturen wurde auf RNA-Ebene eine Expression von MMP-9 nachgewiesen, die nach Stimulierung mit proinflammatorischen Substanzen und  $\beta$ -Amyloid aufreguliert wurde (CROSS und WOODROOFE, 1999; MUIR et al., 2003). Die gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 wurde von Astrozyten in detektierbaren Mengen vor allem nach Stimulierung mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, TNF- $\alpha$ ) beschrieben. Der überwiegende Teil der Arbeiten quantifizierte *in vitro* auch nach Stimulierung lediglich die Zymogen-

Expression (ARAI et al., 2003). Dieses beschriebene Expressionsmuster der MMPs wurde *in vitro* bei fetalen, neonatalen und adulten Zellen gefunden. In Kokultur mit neuronalen Zellen lagen keine Veränderungen im Expressionsmuster vor. Zahlreiche weitere MMPs sind in unterschiedlichen Studien auf RNA- oder Proteinebene beschrieben worden (Tab. 1).

### 2.2.3 MMPs und TIMPs in Mikrogliaulturen

Mikroglia sind residente Immunzellen des ZNS. Sie besitzen bei physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Funktion für die Antigenpräsentation und Phagozytose (STREIT et al., 2002). Zahlreiche Studien weisen auf die Bedeutung der MMP-Expression der Mikroglia bei neuroinflammatorischen und -degenerativen Krankheiten hin (GOTTSCHALL und DEB, 1996; CROSS und WOODROOFE, 2004). Mikrogliaulturen neonataler und adulter Nager sowie adulter Menschen zeigten *in vitro* im nicht aktivierten Zustand eine mRNA-Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, -MMP-8, MMP-11, MMP-12, MMP-13 und MMP-14 sowie der Inhibitoren TIMP-1, -2 und -3 und eine gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 und pro-MMP-9 (GOTTSCHALL et al., 1995; LIUZZI et al., 2004a).

Proinflammatorische Zytokine und LPS induzierten eine Aufregulierung von MMP-9, nicht jedoch von MMP-2 in neonatalen Mikrogliaulturen der Ratte sowohl auf mRNA-Ebene, als auch des Proteins und der gelatinolytischen Aktivität des Zymogens bzw. der aktiven Form (GOTTSCHALL et al., 1995; MAYER et al., 2001; LIUZZI et al., 2004a,b).

LIUZZI et al. (2004) wiesen *in vitro* außerdem inhibitorische Effekte von IFN- $\beta$  auf die gelatinolytische Aktivität von MMP-9 nach. Während zahlreiche Arbeiten sich auf den Nachweis der Proteine beschränken, untersuchten LIUZZI et al. (2004b) die mRNA-Expression und die gelatinolytische Aktivität nach Stimulierung mit LPS und verglichen sie miteinander. Die Aufregulierung von MMP-9 korrelierte auf beiden Ebenen miteinander, so dass eine Regulation auf Transkriptionsebene zumindest teilweise auch für die verstärkte MMP-9-Proteinexpression nach Stimulierung verantwortlich ist (LIUZZI et al., 2004b).

Kulturen adulter Mikroglia aus der Ratte und eine humane fetale Mikrogliazelllinie zeigten nach Zugabe verschiedener Chemokine wie *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1), *macrophage inflammatory protein 1 $\beta$*  (MIP1 $\beta$ ), RANTES, IL-8 und Fractalkine (CX3CL1), eine gesteigerte Sekretion von MMP-9 und MMP-2 (CROSS und WOODROOFE, 1999). Weiterhin konnte in dieser Arbeit in einer humanen fetalen Mikrogliazelllinie im ELISA nach Stimulierung eine signifikante Aufregulierung der Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 beobachtet werden. Beide TIMPs wurden jedoch auch unter Kontrollbedingungen 24 Std in der Kultur konstitutiv exprimiert. Die primären Mikrogliazellen der Ratte wurden aus technischen Gründen nicht im ELISA untersucht. Humane adulte Mikrogliaulturen, post mortem aus dem zerebralen Kortex gewonnen, zeigten im Mikroarray-Assay eine Genexpression von MMP-1, MMP-3, MMP-9 und MMP-10 und eine Aufregulierung der Genexpression nach Stimulierung mit  $\beta$ -Amyloid (WALKER et al., 2005). Die Genexpression von MMP-2 wurde nicht untersucht.

In einer anderen Arbeit wurde die Transkription von MMP-2, MMP-3, MMP-11, MMP-12 und MMP-13 in neonatalen murinen Mikrogliaulturen nachgewiesen (LARSEN und YONG, 2004).

Mit den Anti-HIV-Medikamenten Zidovudine<sup>®</sup> und Indinavir<sup>®</sup> wurde in Mikrogliaulturen auf RNA- und Proteinebene nach vorheriger Aufregulierung von MMP-9 durch LPS-Zusatz eine Herunterregulierung der MMP-9-Expression erreicht. Diese Untersuchungen zeigten ebenso wie die von LIUZZI et al. (1999) eine konstitutive RNA-Expression von MMP-2 in Mikroglia.

Untersuchungen mit verschiedenen Pflanzenlektinen zeigten, dass es in aus Ratten gewonnenen Mikrogliaulturen zu einer vermehrten Zellproliferation und zu einer signifikanten Aufregulierung von MMP-9 kam, während die Expression von MMP-2 mit der in Kontrollkulturen vergleichbar blieb. Andere Pflanzenlektine mit zytotoxischem Effekt führten zu einer signifikant niedrigeren MMP-9-Expression im Vergleich zu den Kontrollkulturen (LIUZZI et al., 1999). Aus diesen Arbeiten geht jedoch nicht hervor, inwieweit die höhere bzw. niedrigere Expression von MMP-9 möglicherweise auf eine durch Proliferation/Zelltod bedingte höhere/niedrigere Zellzahl zurückzuführen ist.

GHORPADE et al. (2001) verglichen *in vitro* die MMP-Expression auf RNA- und Proteinebene bei humanen fetalen Mikrogliazellen und bei isolierten Makrophagen adulter Menschen. Sie wiesen im ELISA MMP-1, MMP-2, MMP-3 und MMP-9 in beiden Kulturen nach und fanden heraus, dass die Expression aller MMPs signifikant höher in den fetalen mikroglialen Kulturen war. Die Stimulierung mit CD40L führte zu einer signifikanten Aufregulierung von MMP-2 und MMP-1 in den Mikroglia-kulturen, nicht jedoch in den Makrophagenkulturen. Bei diesem Vergleich muß jedoch, wie anfangs erwähnt, berücksichtigt werden, dass die MMP-Expression entwicklungsabhängig erfolgt (CANETE-SOLER et al., 1995; VAILLANT et al., 2003).

Die angeführten Arbeiten lassen den Schluß zu, dass Mikroglia *in vitro* ebenso wie Astrozyten ein breites Spektrum an MMPs exprimieren und die Induktion einiger MMPs durch verschiedene Substanzen erfolgen kann. Im Gegensatz zu Astrozyten weisen Mikroglia jedoch eine hohe, konstitutive (pro)-MMP-9-Expression auf (Tab.1).

#### **2.2.4 Expression von MMPs und TIMPs in Oligodendrozytenkulturen**

Die *in vitro* Expression in Oligodendrozyten ist bisher nur wenig untersucht worden. In Oligodendrozytenkulturen aus dem Gehirn neonataler Mäuse wurde neben der Transkription von MMP-9 und MMP-12 auch in geringeren Mengen MMP-2, MMP-3, MMP-13 und MMP-14 nachgewiesen (OH et al., 1999; LARSEN und YONG, 2004).

UHM et al. (1998) zeigten in verschiedenen Arbeiten eine Verbindung zwischen der Länge und Verzweigung der Zellfortsätze und der MMP-9-Expression. Nach Stimulierung der PKC war in humanen Oligodendrozytenkulturen ein gesteigertes Wachstum der Zellfortsätze und eine signifikante Aufregulierung von MMP-9 zu beobachten. Die Inhibition der PKC bewirkte eine verminderte MMP-9 Produktion und ein vermindertes Wachstum der Fortsätze. Eine Hemmung mit TIMP-1, einem MMP-9-Inhibitor hatte den gleichen Effekt auf die Oligodendrozytenfortsätze. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von MMP-9 lieferten Oligodendrozytenkulturen MMP-9-defizienter Mäuse. Die Zellen wiesen ein signifikant reduziertes Wachstum der Fortsätze auf (OH et al., 1999).



In einer dritten Arbeit dieser Forschungsgruppe wurde gezeigt, dass kultivierte Oligodendrozytenvorläufer MMP-12-mRNA auf einem wesentlich höheren Level exprimieren als die RNA aller anderen MMPs. Die Reifung und morphologische Differenzierung der Oligodendrozyten war in Kulturen MMP-12 defizienter Mäuse stark reduziert.

Untersuchungen von adulten humanen Oligodendrozytenkulturen aus Gehirnbioptaten von Epilepsiepatienten zeigten nach Zugabe eines MMP-12-Antikörpers, der gegen die N-terminale katalytische Domäne gerichtet war, eine signifikante Reduktion des Fortsatzwachstums, so dass neben MMP-9 auch MMP-12 einen wesentlichen Einfluß auf die Reifung und Ausläuferausbreitung von neonatalen und adulten Vorläuferzellen der Oligodendrozyten besitzt (LARSEN und YONG, 2004).

Die zitierten Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe erbrachten den Nachweis, dass MMP-9 und MMP-12 die Zellreifung und morphologische Differenzierung der Oligodendrozyten unterstützen.

### **2.2.5 Expression von MMPs und TIMPs in neuronalen Kulturen**

Die MMP-Expression neuronaler Zellen *in vitro* wurde bisher ebenfalls wenig untersucht. In der Literatur sind die Expression von MMP-2 und MMP-9 näher beschrieben worden. (VECIL et al., 2000)

Untersuchungen von humanen fetalen neuronalen Kulturen nach Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen führten VECIL et al. (2000) durch. Im Vergleich zu Astrozytenkulturen exprimierten die neuronalen Kulturen konstitutiv mehr pro-MMP-9. Von den untersuchten Zytokinen führte lediglich IL-1 $\beta$  zu einer dosisabhängigen, erhöhten gelatinolytischen Aktivität von pro-MMP-9 nicht jedoch von pro-MMP-2 in Zellkulturüberständen neuronaler Kulturen. TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), ziliärer neurotropher Faktor (CNTF) und *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) führten bei Neuronen nicht zu einer gesteigerten gelatinolytischen Aktivität der MMP-9-Expression. Zugabe von TGF- $\beta$  induzierte eine signifikante Herabregulierung der gelatinolytischen Aktivität von MMP-9. Die Neuronen zeigten somit *in vitro* gegensätzliche Reaktionen zu den in anderen Arbeiten untersuchten Astrozytenkulturen, die eine TNF- $\alpha$  abhängige

Aufregulierung aufwiesen (GOTTSCHELL and YU, 1995). *In vivo* Untersuchungen bestätigten die Bedeutung von IL-1 $\beta$  bei der neuronalen Aufregulierung von MMP-9. Die MMP-9-Expression ließ sich posttraumatisch im Tiermodell durch einen IL-1 $\beta$ -Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) inhibieren (VECIL et al. 2000). Diese Untersuchungen weisen auf eine IL-1 $\beta$  abhängige und TNF- $\alpha$  unabhängige Aufregulierung in Neuronen hin. WANG et al. (2002) zeigten in neuronalen Kulturen der Ratte, dass eine Regulierung der MMP-9-Expression über den MAP-Kinase-Weg erfolgte.

Die Ergebnisse zusammenfassend, weisen neuronale Kulturen eine im Vergleich zu Astrozytenkulturen höhere MMP-9-Expression auf. Diese ist durch IL-1 $\beta$ , aber nicht durch TNF- $\alpha$  regulierbar.

### **2.2.6 Expression von MMPs in zerebralen Endothelzellkulturen**

Humane zerebrale Endothelzellen weisen *in vitro* eine gelatinolytische Aktivität von MMP-2 und MMP-3 auf, eine Stimulierung der MMP-3-Aktivität erfolgte nach TNF- $\alpha$ -Zusatz (HUMMEL et al., 2001). Im ELISA wurden zusätzlich TIMP-1 und TIMP-2, nicht jedoch MMP-9 nachgewiesen. Ein Vergleich mit humanen umbilicalen Endothelzellen zeigte, dass nach Inhibition des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) -Rezeptors nur in den zerebralen Endothelzellen eine signifikante Abnahme der gelatinolytischen Aktivität von MMP-2 und MMP-3 zu beobachten war. Gleichzeitig wurde im Kokulturmodell mit einer Gliomzelllinie nachgewiesen, dass dem VEGF-Rezeptor eine wesentliche Bedeutung bei der Tumorzellinvasion beigemessen werden kann (WAGNER et al., 2003).

### **2.2.7 MMPs im Liquor**

Pathologische Prozesse im ZNS stehen häufig in Verbindung mit einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Liquoruntersuchungen sind daher hinweisend auf infiltrierende Entzündungszellen. Im Hinblick auf die DLE sind vornehmlich Makrophagen und T-Lymphozyten von Bedeutung.

Bei neuroinflammatorischen Prozessen verschiedenster Art wurde im Liquor erkrankter Menschen und Nager eine erhöhte MMP-9-Expression nachgewiesen (LEPPERT et al., 1998). Als Quelle für die MMP-9-Expression im Liquor wurden

vor allem Makrophagen und neutrophile Granulozyten und weniger Lymphozyten ausgemacht (YUSHCHENKO et al., 2000). MMP-9 wird eine Bedeutung bei der Migration der Entzündungszellen durch die Gefäße bei entzündlichen Prozessen zugesprochen (MUN-BRYCE und ROSENBERG, 1998).

Unter physiologischen Bedingungen fanden sich im Liquor gesunder Hunde pro-MMP-2 und in geringen Mengen aktives MMP-2 (BERGMANN et al., 2002). Im Liquor alter Hunde mit plaqueartigen A $\beta$ -Proteinablagerungen konnte eine erhöhte Expression von pro-MMP-9 nachgewiesen werden (LIM et al., 1997).

**Tabelle 1: Übersicht der MMP- und TIMP-Expression in verschiedenen Gehirnzellpopulationen**

Zelltyp	mRNA-Nachweis	Proteolytische Aktivität	Induzierbar (Aktivität)	Literaturangaben
<b>Astrozyten</b>	<b>MMP-2</b> MMP-3 MMP-9, MMP-10, MMP-13 MMP-14 TIMP-1 <b>TIMP-2</b> TIMP-3	<b>(pro)MMP-2</b> MMP-3 (pro)MMP-9  TIMP-1 <b>TIMP-2</b> TIMP-3	pro-MMP-2 MMP-2 MMP-3 <b>(pro)MMP-9</b> TIMP-1 TIMP-3	APODACA et al. (1990) GOTTSCHELL und YU (1995) LIUZZI et al. (1999) CROSS und WOODROOFE (1999) MUIR et al. (2002)
<b>Mikroglia</b>	MMP-1 MMP-2 MMP-3 <b>MMP-9</b> MMP-11 <b>MMP-12</b> MMP-13 MMP-14 TIMP-1 <b>TIMP-2</b> TIMP-3	MMP-2 <b>MMP-9</b> MMP-12	MMP-1 MMP-2 MMP-3 <b>(pro)MMP-9</b>	GOTTSCHELL et al., (1995) CROSS und WOODROOFE (1999) LARSEN und YONG (2004) LIUZZI et al. (2004a,b)
<b>Oligodendrozyten</b>	<b>MMP-2</b> MMP-3 <b>MMP-9</b> <b>MMP-12</b> MMP-14	MMP-9 MMP-12	MMP-9	UHM et al. (1998) OH et al. (1999) LARSEN und YONG (2002)
<b>Neuronen</b>	MMP-2 <b>MMP-9</b>	MMP-2 <b>MMP-9</b>	MMP-2 <b>MMP-9</b>	VECIL et al. (2000)
<b>Endothelzellen</b>	MMP-2 MMP-3 MMP-9 MMP-12 MMP-13	MMP-2 MMP-3	MMP-2 MMP-3 MMP-9 MMP-12	HUMMEL et al. (2001) WAGNER et al. (2003)
<b>Makrophagen (Liquor)</b>	<b>MMP-2</b> MMP-9	<b>MMP-2</b> MMP-9 (nicht beim Hund)	<b>MMP-9</b>	GIJBELS et al. (1992) LEPPERT et al. (1998) YUSCHCHENKO et al. (2000) BERGMANN et al. (2002)

**Fettdruck** kennzeichnet die vorherrschende Expression, (pro)=Proenzymform  
MMP-Matrix-Metalloproteinase; mRNA= messenger ribonucleic acid

### 2.2.8 Bedeutung der *in vitro* Studien

Die beschriebenen Untersuchungen der *in vitro* Expression von MMPs geben Einblicke in die zelluläre Herkunft der MMPs. Die Regulationsmechanismen der Transkription lassen sich gut durch *in vitro* Versuche darstellen (ARAI et al., 2003; LEE et al., 2003).

Der stark vereinfachte Charakter des Zellkultursystems indes birgt den Nachteil interzelluläre Regulationsmechanismen und Zymogenaktivierung der *in vivo* Situation nur simplifiziert widerspiegeln zu können.

Trotz dieser Einschränkungen konnte jedoch in mehreren Untersuchungen eine Korrelation zwischen *in vivo* und *in vitro* Studien bezüglich des Expressionsmuster der MMPs nachgewiesen werden (VECIL et al., 2000; SURYADEVARA et al., 2003). Bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen *in vivo* aufregulierte proinflammatorische Substanzen induzieren *in vitro* ebenfalls eine erhöhte MMP-Expression (LIUZZI et al., 1999, GOTTSCHALL und YU, 1995).

Die *in vitro*-Untersuchungen von Gehirnzellkulturen zeigen, dass

- humane, murine und Rattenzellkulturen aus fetalem, neonatalem und adultem Gewebe gewonnen *in vitro* ein weitgehend übereinstimmendes Expressionsspektrum an MMPs besitzen. Es stellten sich jedoch *in vitro* Unterschiede hinsichtlich der quantitativen Expression der MMPs dar (MUIR et al., 2002).
- nach Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen eine Aufregulierung *in vitro* vor allem auf Ebene der Transkription erfolgt.
- die Reaktion auf stimulierende Einflüsse zelltypabhängig ist. So zeigten Neuronen eine Aufregulierung nur nach IL-1 $\beta$ -Zugabe und nicht nach Zugabe anderer proinflammatorischer Substanzen im Gegensatz zu Astrozytenkulturen.
- die Expression der MMPs von den Kulturbedingungen und trophen Faktoren abhängt.
- der MAP-Kinase-Transduktionsweg für MMP-3, MMP-9 und MMP-12 eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Transkription einnimmt.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Allgemeiner Versuchsaufbau

Zunächst erfolgte eine Etablierung von Dissoziationskulturen aus adulten Hundegehirnen modifiziert nach GIULIAN und BAKER (1986). Neben der Etablierung primärer Mischkulturen wurden Protokolle zur Reinigung der Mikroglia/Makrophagen-Population erarbeitet (3.3). Die Charakterisierung der Gehirnzellen erfolgte mit Hilfe von bereits bei anderen Spezies (Maus, Ratte und Mensch) etablierten Antikörpern (3.7).

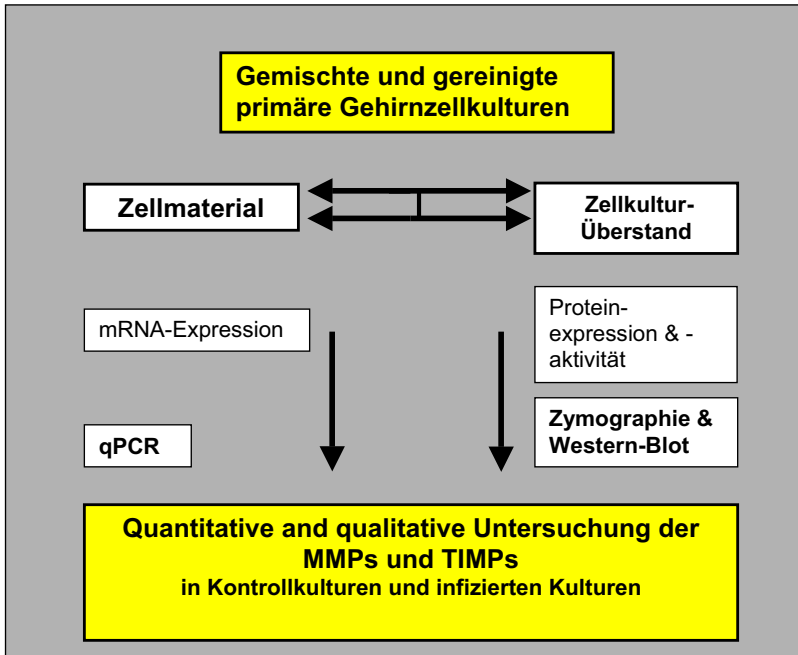
Die Bestimmung der MMP-2-, MMP-9, MMP-12, -MMP-13 und MMP-14 sowie der TIMP-1 und TIMP-2-Expression erfolgte in nicht infizierten und infizierten Mischkulturen und gereinigten Mikroglia/Makrophagenkulturen (3.4).

Zur Infektion diente ein attenuierter, rekombinanter, *green fluorescent protein* markierter Staupevirusstamm (3.6) (freundlicherweise von Dr. V. von Messling, Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand Frappier, Université du Québec, Laval, QC, Canada zur Verfügung gestellt). Die Untersuchung der MMPs und TIMPs auf molekularer Ebene erfolgte mittels quantitativer PCR (qPCR) und auf Proteinebene mittels Zymographie und Western-Blot (3.9-3.10; Abb.3). Vorversuche ergaben Unterschiede in der MMP-Expression zwischen nicht-infizierten und infizierten primären Gehirnzellkulturen 24 Std p.i. Daher wurden als Zeitpunkte für die Probenentnahme 0, 24 und 72 Std p.i. gewählt. Die Zellzahl stellte bei der Versuchsplanung den limitierenden Faktor dar.

Neben diesen Infektionsversuchen wurden zur Beurteilung des zytopathogenen Effektes (CPE) einige Kulturen bis 6 Tage p.i. lichtmikroskopisch kontrolliert.

Weiterhin wurden in einem Nebenversuch vier Kulturen in serumfreiem Medium kultiviert (3.5). Aus diesen Kulturen gelang es, zwei Populationen von Zellen anzureichern. Diese Methode wird unter „Serumfreie Mischkulturen“ beschrieben.

Abb. 3. Aufbau der Infektionsversuche



mRNA- Boten-Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*), qPCR- quantitative Real-Time-PCR, MMPs- Matrix-Metalloproteinasen, TIMPs- Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen

### 3.2 Hunde

Die Etablierung der Mischkulturen und der aufgereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen sowie deren Charakterisierung wurde mit Hundegehirnen der Tiernummern (Tiernr.) 1-4 im Alter von 8 Wochen bis 10 Jahren durchgeführt. Die Hunde stammten aus dem Sektionsgut des Institutes für Pathologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Die Tiere waren aufgrund schlechter/infester Prognose euthanasiert worden. Für die Infektions- und Kontrollversuche sowie die serumfreien Kulturen wurden Gehirnzellen von 8 Hunden isoliert. Bei diesen handelte es sich 17- 20 Monate alte Kontrolltiere aus einer pharmakologischen Studie. Hunde- und Sektionstagebuchnummer, Alter, Geschlecht, Rasse und



Erkrankungs- bzw. Todesursache der Tiere sind in Tabelle 9.1.1 im Anhang aufgelistet. Bei allen Hunden wurden eine vollständige Sektion und eine pathologisch-histologische Untersuchung der Gehirne durchgeführt, um ein erkrankungsbedingt verändertes Verhalten der Gehirnzellen in den Kulturen auszuschließen.

### **3.3 Isolierung der kaninen Gehirnzellen**

Die Isolierung der Gehirnzellen erfolgte 0,5 bis 4 Std nach dem Tod der Hunde. Angelehnt an die Präparationen von GIULIAN und BAKER (1986) wurden zunächst mechanisch, danach enzymatisch Einzelzellsuspensionen hergestellt.

#### **3.3.1 Protokoll zur Isolierung von Hundegehirnzellen**

1. In der Sektionshalle: Absetzen des Schädels im Atlanto-Okzipitalgelenk, Entfernen der Haut und Desinfektion der Schädelkalotte mit 70%igem Alkohol, Aufsägen der Schädelkalotte unter Schonung der Dura mater.
2. Im Laborbereich: Durchtrennung der Dura mater, Entnahme des Gehirns und Verbringung in eine Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS, Anhang 9.2.3) enthaltende Petrischale (Nunc<sup>TM</sup>, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden), Verbringung der Schale unter die Werkbank.  
Die weiteren Präparationsschritte erfolgen sofern nicht anders erwähnt auf Eis.
3. Entnahme von Proben aus Kleinhirn, Ammonshorn und Hirnstamm für die histologische Untersuchung.
4. Sorgfältiges Entfernen der Meningen unter Verwendung feiner Pinzetten zur Minimierung einer Kontamination mit Fibroblasten.
5. Waschen der mit der Skalpellklinge zerkleinerten, ca. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm großen Gewebestücke mit PBS in 50 ml Plastik-Röhrchen (Greiner Bio-one, Frickenhausen). Füllen der Gefäße bis zu 25% mit Gehirnmateriale und schwenken. Abnahme des Überstandes nach 15 bis 20 Sekunden mit einer weitlumigen Pipette. Wiederholung des Vorganges (2x).
6. Filtrieren der Suspension durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 280 µm (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen).

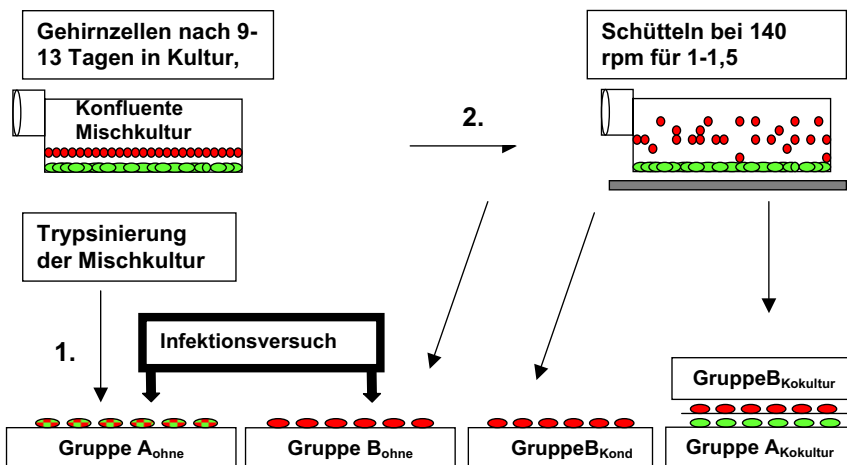
7. Inkubation der Zellsuspension mit 20 ml PBS/10 g Ausgangsgewebe mit 0,25%igem Trypsin-EDTA und 0,05 mg DNAse/ml, 20 Minuten (Min) im Brutschrank bei 37°C auf einem Magnetrührer in sterilen 100 ml Glasflaschen (Biochrom, Berlin).
8. Durch Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) auf eine Endkonzentration von 10% die Dissoziation des Gewebes stoppen und die Zellsuspension zur weiteren Dissoziation durch Pasteurpipetten unterschiedlicher Öffnungsweiten passieren.
9. Zentrifugation bei 450 x g für 10 Min (Heraeus Minifuge RF, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold) und Abheben des Überstandes mit einer 10 ml Pipette.
10. Dichtezentrifugation in *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) mit 30%iger Saccharose und 20%igem FKS bei 750 x g für 15 Min und Entfernen des myelinhaltigen Überstandes nach der Zentrifugation.
11. Resuspendieren der verbliebenen Zellen in DMEM mit 10%igem FKS und Zentrifugation bei 450 x g für 10 Min.
12. Resuspendieren des Zellpellets in Sato's Medium (Anhang, 9.2.1) mit 10%igem FKS und Zentrifugation bei 400 x g für 10 Min.
13. Mischen von 200 µl Zellsuspension mit 400µl 0,36%igem Trypanblau und Zellzählung mit einer Neubauer Zählkammer.
14. Aussaat der Zellen in Poly-L-Lysin (PLL, Anhang 9.2.5) beschichteten 25 cm<sup>2</sup> großen Flaschen in Sato's Medium mit 10%igem FKS (4-6 25 cm<sup>2</sup> große Flaschen/Gehirn).
15. Mediumwechsel (75%) nach 24 Std

Ein weiterer Mediumwechsel erfolgte jeweils am 3. und 8. Tag nach der Aussaat. Die Zellen wurden täglich unter dem Auflichtmikroskop beurteilt und die Beobachtungen dokumentiert. Den weiteren Versuchsablauf für die Kulturen zur Bestimmung der MMPs und TIMPs (3.4) beschreiben die Abbildungen 3 und 4. Bei vier Kulturen wurde jedoch nach zwei Wochen ein Mediumwechsel zu serumfreiem Medium durchgeführt (serumfreie Mischkulturen siehe 3.5).

### 3.3.1.1 Änderung des Dissoziationsablaufes

Weiterhin wurden in Anlehnung an ein Protokoll von YONG et al. (1992) bei der Isolierung dreier Hundegehirne die Schritte 5 und 6 vertauscht und die enzymatische Dissoziation im Brutschrank der Filtration durch das Netz vorangestellt. In diesem Fall betrug die Inkubationsdauer im Brutschrank (enzymatische Dissoziation) 30 Min.

**Abb. 4. Schematische Darstellung der Kultivierung von Gehirnzellen für die MMP-Versuche**



#### Aussaat der Primärkulturen, P1, in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen)

Nach Isolierung der Zellen aus den Hundegehirnen wurden die Primärkulturen im Brutschrank inkubiert und täglich kontrolliert. Die konfluente Mischkulturen wurden trypsinisiert (1., links in der Abbildung, Gruppe A<sub>ohne</sub>) und in Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) ausgesät. Das Schütteln (2.) zur Isolierung der Mikroglia/Makrophagen erfolgte auf einem Plattformschüttler für 1-1,5 Std, bis die locker anhaftenden Zellen (Mikroglia/Makrophagen) sich abgelöst hatten. Diese Zellen wurden in unbeschichtete Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) ausgesät (Gruppe B<sub>ohne</sub>, Gruppe B<sub>Kond</sub>). Die adhären Zellen wurden trypsinisiert und im Transwell-System mit Mikroglia/Makrophagen kultiviert (Gruppe A<sub>Kokultur</sub> und B<sub>Kokultur</sub>). P0: Passage null, Primärkulturen direkt nach der Dissoziation; P1: 1. Passage der Primärkulturen.

### 3.3.2 Reinigung der Mikroglia/Makrophagen (Gruppe B)

Das Prinzip der Isolierung der Mikroglia/Makrophagen beruht darauf, dass sich die Mikroglia/Makrophagen in PLL-beschichteten Flaschen in einer Mischkultur locker adhärent auf einem Monolayer anderer Gehirnzellen befinden. Zudem wurde die selektive Plastikadhärenz dieser Zellen genutzt (BASZLER et al., 1994). Die Mischkulturen wiesen in den Flaschen 9-13 Tage nach der Isolierung einen konfluenten Zellrasen mit darauf locker anhaftenden Zellen auf. Um einen hohen Reinheitsgehalt der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen zu erreichen, musste darauf geachtet werden, dass der adhärente Zellrasen nicht hyperkonfluent wurde. Hierzu wurden die Zellen zwischen dem 7. und 13. Tag mindestens 2 x täglich zur Bestimmung des optimalen Schüttelzeitpunktes unter dem Auflichtmikroskop kontrolliert.

#### 3.3.2.1 Protokoll zur Reinigung der Mikroglia/Makrophagen (Gruppe B)

1. Mediumwechsel, anschließend Inkubation der Flaschen für mindestens (mind.) 30 Min im Brutschrank bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C.
2. Umwickeln der Verschlusskappen der Flaschen mit Parafilm<sup>®</sup>M (mindestens 3 x, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen). Einschweißen der Flaschen in Autoklavierbeuteln.
3. Schütteln der Flaschen auf einem Plattformschüttler (New Brunswick, Nürtingen) bei 37°C und 140 rpm für mind. 1 Std, Kontrolle unter dem Mikroskop, ob die Zellen der oberen Schicht sich in Suspension befinden.
4. Abnehmen des Überstandes (ca. 5ml/Flasche), diesen in 15 ml Röhrchen geben.
5. Zugabe von Sato's Medium ohne FKS und Schwenken der Flasche zur Erhöhung der Zellausbeute.
6. Kontrolle unter dem Mikroskop, ob ein Großteil der auf dem Monolayer haftenden Zellen abgelöst ist.
7. Abnahme des Mediums, Zugabe von neuem Sato's Medium zur Flasche.
8. Zentrifugation des Überstandes mit den darin enthaltenden Zellen bei 200 x g für 10 Min bei 4°C.

9. I) Aussaat der abgelösten Zellen (Gruppe B siehe 3.4.3-3.4.5) in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen, CORNING Life Sciences, München). II) Abnahme des Überstandes nach 20 Min und Zugabe von neuem Sato's Medium (600  $\mu$ l). 9 II wurde bei Tiernr. 4-9 durchgeführt.
10. Passage der adhärenenten Zellen und Aussaat (Gruppe A<sub>Kokultur</sub>).

### **3.4 Kulturen zur Bestimmung der MMPs und TIMPs, P1**

#### **3.4.1 Mischkulturen (Gruppe A<sub>ohne</sub>)**

Die Flaschen wurden täglich unter dem Auflichtmikroskop beurteilt. Nach 9-13 Tagen wurden die konfluenten Mischkulturen passagiert (Abb.4). Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS erfolgte die Zugabe von 0,025%igem Trypsin-EDTA. Die Zellen wurden anschließend in mit 10  $\mu$ g/ml PLL beschichtete Zellkulturplatten (24 Vertiefungen, CORNING Life Sciences) in 600  $\mu$ l Sato's Medium mit 10%igem FKS mit einer Dichte von 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **3.4.2 Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen im Transwellsystem (Gruppe A<sub>Kokultur</sub>)**

Nach der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Isolierung der Mikroglia/Makrophagen blieben die restlichen Gehirnzellen adhärenent auf dem Flaschenboden zurück. Diese wurden zum einen im Transwell-System mit den Mikroglia/Makrophagen kultiviert (Gruppe A<sub>Kokultur</sub>) und zum anderen zur Herstellung von präkonditioniertem Medium (Anhang 9.2.2) verwendet. Zur Kultivierung im Transwellsystem wurden die Zellen in die PLL beschichteten Platten (10  $\mu$ g/ml) mit einer Dichte von 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät.

### **3.4.3      Gereinigte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen ohne Einfluß von Faktoren (Gruppe B<sub>ohne</sub>)**

Die Kulturen wurden in der beschriebenen Weise isoliert (3.3.2) und auf unbeschichtete Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) mit einer Dichte von 50.000 Zellen/ cm<sup>2</sup> ausgesät. Der Überstand wurde, wie im Protokoll beschrieben, nach 20 Min abgenommen und durch frisches Sato's Medium ohne FKS ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 24, 48, und 96 Std bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, danach erfolgte die RNA-Isolierung gemäß Protokoll.

### **3.4.4      Gereinigte            Mikroglia/Makrophagen-Kulturen            mit präkonditioniertem Medium (Gruppe B<sub>Kond</sub>)**

Die isolierten, angereicherten Zellen wurden wie unter 3.3.1 beschrieben ausgesät. Nach 20 Min wurde präkonditioniertes Medium (Anhang, 9.2.2) dazugegeben und die Zellen wurden anschließend für 24 Std inkubiert. Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß Protokoll.

### **3.4.5      Gereinigte            Mikroglia/Makrophagen-Kulturen            im Transwellsystem (Gruppe B<sub>Kokultur</sub>)**

Ein weiterer Teil der aufgereinigten Mikroglia/Makrophagen wurde in einem Filtereinsatz (0,4 µm Polykarbonatmembran, Nunc) mit einer Dichte von 50.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät (Abb. 4).

## **3.5      Serumfreie Mischkulturen**

In einem Nebenversuch wurden einige der nach Methode 3.3.1 isolierten Kulturen von vier Tieren (7,9,11 und 12) zwei Wochen nach der Isolierung unter serumfreien Bedingungen kultiviert (Sato's Medium ohne FKS). Die Aussaat nach der ersten Passage erfolgte mit einer Zellzahl von mind. 20.000/cm<sup>2</sup> anhängig von der Gesamtzahl entweder in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) oder Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>). Die Gehirnzellen wurden über 4-6 Wochen ohne Einfluß von FKS kultiviert. Diese Kulturen, die nicht für die MMP-Versuche

verwendet wurden, brachten zwei Zellpopulationen hervor: die A2B5 und für den niedrig affinen Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (p75<sup>NGFR</sup>)-positiven Zellpopulationen und die GFAP-positiven Astrozytenkulturen (Tabelle 2).

In den zuletzt genannten Kulturen wurden nach der ersten Passage Wachstumsfaktoren (Ziliärer neutrotropher Wachstumsfaktor, CNTF und Fibroblastenwachstumsfaktor, FGF-2) in einer Konzentration von 40 ng/ml eingesetzt.

### 3.6 Virusstamm

Zur Infektion der verschiedenen Zellkulturen wurde ein attenuierter und rekombinanter Staupevirusstamm, der mit einem *green fluorescent protein* markiert war (Ond-GFP, SUTER et al. 2005) verwandt. Dieses fluoreszierende Konstrukt ermöglichte die mikroskopische Inspektion hinsichtlich Art und Anzahl infizierter Zellen.

#### 3.6.1 Herstellung eines Viruspools

Das Virus wurde zunächst auf Nierenzellen der Grünen Meerkatze (African green monkey kidney cells, Verozellen) vermehrt. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium (*Eagle's Minimal Essential Medium mit Earlescher Salzlösung*, L-Glutamin ohne Natriumbicarbonat, MEME) in Zellkultur-Flaschen (Nunc, 75 cm<sup>2</sup>) im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem Medium wurden 1%iges Penicillin-Streptomycin (10.000 µg/ml) und 10%iges FKS zugesetzt (BAUMGÄRTNER et al., 1981). Ein subkonfluenter Zellrasen wurde mit Ond-GFP 14.1. mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,1 infiziert. Bei einem zytopathogenen Effekt (CPE) von ca. 100%, kurz vor dem Ablösen der Zellen, wurde das Virus durch Einfrieren, Auftauen und mechanische Zerstörung der Zellen geerntet.

Nach Zentrifugation bei 700 x g für 10 Min bei 4°C wurde der Überstand abgenommen und aliquotiert. Die Lagerung der verschiedenen Fraktionen erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C (Beschriftung: Ond-GFP, Datum der Ernte, Virusmenge).

### 3.6.2 Virustitration

Zum quantitativen Nachweis infektiöser Viruseinheiten wurden  $\log_{10}$  Verdünnungsstufen auf Verozellen beimpft. Der Virusgehalt wurde anhand des CPE nach Standardmethoden bestimmt (MAYR et al., 1977; BAUMGÄRTNER et al., 1981).

In eine Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen; Falcon, Omnilab Laborzentrum GmbH & Co KG, Gehrden) wurden pro Vertiefung  $15 \times 10^3$  Verozellen in MEME (100  $\mu$ l) mit 10%igem FKS-Zusatz ausgesät. Anschließend wurden die  $\log_{10}$  – Virus-Verdünnungsreihen in 4fachem Ansatz in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 5tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der CPE unter dem Auflichtmikroskop IX 70 (Olympus GmbH, Hamburg) beurteilt und die Zellkultur infektiöse Dosis<sub>50</sub> (TCID<sub>50</sub>) nach der REED und MUENCH-Methode (MAYR et al., 1977) berechnet.

### 3.6.3 Infektion der Gehirnzellkulturen

#### 3.6.3.1 Vorversuche

In einem Vorversuch wurde im doppelten Ansatz untersucht, ob sich die Gehirnzellen mit dem an Verozellen adaptierten Staupevirusstamm infizieren ließen und ob eine Veränderung der MMP-Expression auf RNA- und Proteinebene stattfand. Hierzu wurden die Zeitpunkte 24, 72 und 120 Std p.i. gewählt (Tiernr. 4+5).

#### 3.6.3.2 Infektion der Mischkulturen und der gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe A<sub>ohne</sub> und Gruppe B<sub>ohne</sub>)

Die erste Passage (P1) der Mischkulturen und der gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen wurde 24 Std nach Aussaat mit einer MOI von 0,1 infiziert. Dazu wurden die Kulturen in den Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) vorsichtig mit Sato's Medium ohne FKS gewaschen und für 2 Std mit der



benötigten Virusmenge bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 350 µl Sato's Medium ohne FKS pro Vertiefung inkubiert.

Das virushaltige Medium wurde mit der Pipette abgenommen, die Zellen vorsichtig einmal mit Sato's Medium ohne FKS gewaschen und neues Medium auf die Zellen gegeben. Die Färbung der Zellen, die RNA-Isolierung und das Sammeln der Überstände für die Zymographie erfolgte bei den nicht infizierten und infizierten Zellen 0, 24 und 72 Std p.i.

Die Zellen wurden jeweils 24 Std vor der Probennahme vorsichtig 2 x 5 Min mit Sato's Medium ohne FKS gewaschen und mit jeweils 600 µl Sato's Medium ohne FKS inkubiert. Dieser Schritt hatte sich als nötig erwiesen, da FKS-haltiges Medium in Vorversuchen zu Störbanden in der Zymographie führte.

### **3.6.3.3 Infektion der serumfreien Kulturen**

Ein Ziel der Studien bestand darin, den Zelltropismus des Staupevirus in den Dissoziationskulturen adulter Hunde zu untersuchen. Daher wurde die Population der A2B5/p75<sup>NGFR</sup>-positiven Zellen in der ersten Passage mit einer MOI von 0,1 infiziert. Die GFAP-positiven Kulturen wurden aufgrund der geringen Zellzahl nicht infiziert.

## **3.7 Charakterisierung der Zellen**

### **3.7.1 Fluoreszenzfärbung**

Eine Charakterisierung der Gehirnzellen erfolgte mit für die jeweiligen Zelltypen spezifischen Markern (Tabelle 2). Zur Darstellung der Markierungen wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundäntikörper verwendet (Abb.5). Die Kulturen wurden anschließend mit dem Auflichtmikroskop IX 70 (Olympus) untersucht.

#### **3.7.1.1 Fixierung und Färbezeitpunkte der Kulturen**

Die Färbung der Kulturen wurde in Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) durchgeführt. Für jede der verschiedenen Kulturen wurden die Zellen in jeweils 2 Vertiefungen auf die Expression der verschiedenen Marker untersucht. Die Oberflächenmarker wurden auf die lebenden Zellen in der Kultur gegeben,

während die Zellen zur Darstellung der intrazellulären Antigene vor der Permeabilisierung zunächst fixiert werden mussten. Die Fixierung erfolgte mit 4%igem Paraformaldehyd mit 4% Saccharose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Die Saccharose diente zur besseren Erhaltung der Zellstruktur nach Fixierung (LUDUENA, 1973). Die Primärkulturen der ersten Passage wurden zum Zeitpunkt der Infektion sowie 24 und 72 Std p.i. gefärbt und ausgezählt.

Zum Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen wurde entsprechend den nachfolgend aufgeführten Protokollen Ziegen- und Pferde-Normalserum (ZS/PS) verwendet.

### **3.7.1.2 Primärantikörper/Proteine**

Zur Identifizierung der Mikroglia/Makrophagen wurden azetyliertes Low-Density-Lipoprotein konjugiert mit 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate (DiI-ac-LDL, GIULIAN und BAKER, 1986) und ein gegen das ionisierte kalziumbindende Adaptermolekül 1(Iba1; IMAI et al., 1996) gerichteter Antikörper verwendet. Zur Identifizierung von Astrozyten diente ein monoklonar Antikörper aus der Maus gegen saures Gliafaserprotein (GFAP, Klon G-A-5). Dieser Antikörper war getestet für Ratte, Schwein und Mensch (DEBUS et al., 1983), weiterhin wurde eine Färbung mit Vimentin durchgeführt. A2B5, O4 und O1 wurden als Marker für Oligodendrozyten und ihre Vorläuferzellen verwendet. Weiterhin wurden serumfreie Langzeitkulturen auf die Expression des niedrig affinen Nervenwachstumsfaktor-Rezeptors ( $p75^{NGFR}$ ) untersucht. Die Verdünnung der Antikörper und Proteine sowie die Herkunft und die Literaturangaben sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Primär- und Sekundäntikörper zur Charakterisierung der Zellen

Antigen, Rezeptor, Protein	Antikörper/Marker	Lokalisiert (an/in der Zelle)	Antigen-exprimierende Zellart im ZNS	Literaturreferenz	Verdünnung	Bezugsquelle	Blockingserum	Sekundäntikörper
Saures Gliafaserprotein (GFAP)	<b>Anti-GFAP</b> Klon G-A-5 monoklonal a.d. Maus	intrazellulär Strukturprotein	v.a. Astrozyten, olfaktorische Hüllzellen	DEBUS et al., 1983	1:400	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland	ZS/PS	Ziege-anti-Maus FITC, Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt, DIANOVA
Vimentin	<b>Anti-Vimentin</b> Klon V9 monoklonal a.d. Maus	intrazellulär Strukturprotein	Astrozyten, Fibroblasten	OSBORN et al., 1984	1:100	DakoCytomation GmbH, Hamburg	ZS/PS	Ziege-anti-Maus FITC, Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt DIANOVA
Gangliosid	<b>A2B5</b> Klon 1520 HB-29 Hybridom, monoklonal a.d. Maus	Oberfläche	Progenitorzellen der Oligodendrozyten (Typ II-A- Astrozyten)	GENSERT und GOLDMANN, 2001	1:2	ATCC, USA	FKS	Ziege-Anti-Maus FITC, Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt, DIANOVA
Sulfatid, Serninlipid	<b>O4</b> SNT Hybridom, monoklonal a.d. Maus	Oberfläche	(prä)mature Oligodendrozyten	SCHACHNER et al., 1981	1:2	Jaqueline Trotter, Mainz	FKS	Ziege-anti-Maus FITC, Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt, DIANOVA
Galactocerebro sid Sulfatid Serninlipid Psychosin	<b>O1</b> SNT Hybridom, monoklonal a.d. Ratte	Oberfläche	mature Oligodendrozyten	SCHACHNER et al., 1981	1:2	Jaqueline Trotter, Mainz	FKS	Ziege-anti-Ratte Rhodamin X gekoppelt DIANOVA

Tabelle 2-Fortsetzung: Liste der verwendeten Primär- und Sekundäntikörper zur Charakterisierung der Zellen

Antigen, Rezeptor, Protein	Antikörper/Marker	Lokalisation an/in der Zelle	Antigen-exprimierende Zellart im ZNS	Literatur referenz	Verdünnung	Bezugs Quelle	Blocking-serum	Sekundäntikörper
Scavenger-Rezeptor (SR)-A und -B	<b>Dil-ac-LDL</b>	Oberfläche	Makrophagen/ Mikroglia, Astrozyten	GIULIAN und BAKER, 1986	10 µg/ml	PAESEL & LOREI, Hanau	entf.	entf.
Ionisiertes, Kalzium-bindendes Adapter Molekül 1 (Iba1)	<b>Anti-Iba1</b> polyklonal a.d.Kanin.	intrazellulär	Makrophagen/ Mikroglia	IMAI et. al., 1996	1:400	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Deutschland	ZS/PS	Ziege-anti-Kanin. FITC, Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt, DIANOVA
Niedrig affiner Nervenwachstums-Faktor- Rezeptor (NGFR)	<b>Anti-p75<sup>NGFR</sup></b> SNT Hybridom, monoklonal a.d. Maus	Oberfläche	OECS, p75 <sup>NGFR</sup> positive Glia	ROSS et al., 1984	1:5	ATCC, USA	FKS	Ziege-anti-Maus FITC, Cy <sup>TM</sup> 3 gekoppelt, DIANOVA
Adenin-Thymin reiche DNA-Regionen	<b>Bisbenzimidazole H 33258</b>	Nukleus	kernhaltige Zellen	LATT et al., 1976	1:100	SIGMA	entf.	E ntf.

a.d. - aus der; entf. - entfällt; Kanin. - Kaninchen, ZS - Ziegenserum; PS - Pferdeserum; FKS - fetales Kälberserum; OEC – olfaktorische Hülze  
Dil-ac-LDL - azetyliertes Low-Density-Lipoprotein konjugiert mit 1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate

### 3.7.1.3 Darstellung der Oberflächenantigene (mittels Dil-ac-LDL, O1, O4, A2B5, Anti-p75<sup>NGFR</sup>)

Die Färbung der Oberflächenantigene erfolgte an den vitalen Zellen. Dil-ac-LDL wurde nach einmaligem Waschen der Zellen mit Sato's Medium ohne FKS auf die Zellen gegeben, und für 8 Std in Sato's Medium ohne FKS im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen zweimal mit PBS gewaschen und es erfolgte eine Inkubation mit einem weiteren Oberflächenmarker nach folgendem Protokoll:

1. Auftauen des Primärantikörpers bei 37°C im Wasserbad.
2. Inkubation des 1. Antikörpers (O4, O1, A2B5 und p75) in der entsprechenden Verdünnung (Tabelle 2) in Sato's Medium mit FKS (20 Min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>).
3. Waschen mit Sato's Medium (einmal 5 Min).
4. Inkubation des 2. Antikörpers (gegen die Spezies der ersten Antikörper gerichteter, fluoreszenzmarkierter Antikörper) für 20 Min bei Raumtemperatur (Raumtemp).
5. Waschen mit PBS (5 Min).
6. Fixierung in 4%igem Paraformaldehyd in PBS mit 4% Saccharose (15- 30 Min, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Rezept, Anhang 9.3).
7. Waschen mit PBS (5 Min).
8. Lagerung in PBS bei 4 °C unter Lichtausschluß bis zur Auswertung.

### 3.7.1.4 Färbung der Antigene Vimentin, GFAP und Iba1

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 4%igem Paraformaldehyd in PBS mit 4%iger Saccharose. Anschließend wurden die Zellen mit TritonX-100 (Merck KG, Darmstadt) permeabilisiert. Das folgende Protokoll wurde zur Darstellung der Antigene Vimentin, GFAP und Iba1 angewandt.

1. Waschen der Zellen mit PBS (5 Min).
2. Fixierung mit 4 %igem PFA (15- 30 Min., Raumtemp).
3. Waschen mit 0,25% igem PBS-TritonX-100 (5 Min, Raumtemp).

4. Blocken mit 5%igem Ziegen- und Pferdeserum (ZS/PS) in PBS-TritonX-100 (15 Min, Raumtemp).
5. Inkubation des 1. Antikörpers in 3 %igem ZS/PS in PBS-TritonX-100 (über Nacht, 4°C).
6. Waschen mit 0,25% igem PBS-TritonX-100 (5 Min, Raumtemp).
7. Inkubation des 2. Antikörpers in 3 %igem ZS/PS in PBS-TritonX-100 (1 Std, Raumtemp).
8. Waschen mit PBS (5 Min, Raumtemp).
9. Waschen mit Aqua dest. (1 Min, Raumtemp).

#### **3.7.1.5 Färbung der Zellkerne**

Die Darstellung der Kerne erfolgte mit dem fluoreszierenden Farbstoff Bisbenzimid H 33258 (Bisbenzimid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH). Bisbenzimid penetriert die Zellmembran, bindet an Adenin- und Thymin-reiche DNA- Regionen und ermöglicht somit eine Darstellung der Zellkerne.

Zur Färbung wurden die Zellen im Anschluß an die jeweilige Antigenmarkierung bzw. Fixierung für eine Min mit Aqua dest. gewaschen und 10 Min mit dem verdünnten Farbstoff unter Lichtabschluß inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Min mit Aqua dest. gewaschen und in PBS bei 4°C dunkel aufbewahrt, unter dem Auflichtmikroskop (Olympus) gezählt und ausgewertet und mit der Fotoeinrichtung PM-30 (Olympus) dokumentiert.

#### **3.7.1.6 Mehrfachmarkierungen**

Zum Nachweis der Koexpression von Antigenen und um den Anteil positiver Zellen an der Gesamtzahl der Zellen zu bestimmen, wurden verschiedene Mehrfachmarkierungen durchgeführt. Sie sind in der nachfolgenden Abb.5 mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen aufgelistet.

Abb. 5. Schematische Darstellung der möglichen Mehrfachmarkierungen

Fluoreszenzfarbe Absorptions- Emissions- Peak, Wellenlänge (nm)	Grün 492(FITC) 520 (FITC)		Rot 550(Cy <sup>TM</sup> 3), 570(Rhod-X) 570 (Cy <sup>TM</sup> 3), 590(Rhod-X)	Blau
Filter	Blau		Grün	UV
Farbstoff	FITC <i>green fluorescent protein</i>		Dil Rhodamin Red <sup>TM</sup> -X Cy <sup>TM</sup> 3	Bisbenzi- mide
Virusstamm bzw. Antikörper/Protein	Ond- GFP	GFAP, Vimentin <hr/> Iba1	Iba1, A2B5, O4 <hr/> acLDL, GFAP	

UV- Ultraviolett, FITC- Fluoreszein, Rhod-X- Rhodamin Red<sup>TM</sup>-X; Cy<sup>TM</sup>3- Cyanofarbstoff; Ond-GFP- rekombinanter Onderstepoort- Staupevirusstamm markiert mit *green fluorescent protein*; GFAP- saures Gliafaserprotein; Dil -1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate; ac-LDL- azetyliertes *Low-Density-Lipoprotein*; Iba1- ionisiertes kalzium-bindendes Adaptermolekül 1.

### 3.7.1.7 Darstellung der infizierten Zellen

Ond-GFP infizierte, *green fluorescent protein*-synthetisierende Zellen fluoreszieren nach Anregung grün. Zur Identifizierung der infizierten Zellen wurden daher als Sekundäntikörper Rhodamin Red<sup>TM</sup>-X und Cy<sup>TM</sup>3, (sichtbare Emission im roten Bereich) verwendet (Abb. 5).

### 3.7.1.8 Negativkontrollen

Als Negativkontrolle zur Überprüfung der Spezifität der verschiedenen 2. Antikörper diente bei jeder Färbung eine Inkubation mit dem jeweiligen Blockingserum anstelle des 1. Antikörpers. Die Spezifität der 1. Antikörper wurde in den Mischkulturen durch die negativen Zellen bestätigt.

### 3.7.2 Nachweis der Phagozytose

In den Mikroglia/Makrophagen-Kulturen wurde zum Phagozytose-Nachweis eine Inkubation mit 4,8 µm großen magnetischen Partikeln (*dynabeads*, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) durchgeführt. Dazu wurden die Kulturen für 12 Stunden mit den Partikeln in einer Konzentration von  $10^2$  *dynabeads*/ml Sato's Medium inkubiert und anschließend zweimal gewaschen. Die Zellen wurden unter dem Auflichtmikroskop (Olympus) inspiziert und die Internalisierung der Partikel mit der Fotoeinrichtung PM-30 (Olympus) dokumentiert.

## 3.8 RT-qPCR

### 3.8.1 RNA-Isolierung

Parallel zu der Entnahme der Zellkulturüberstände wurde eine RNA-Isolierung aus den kultivierten Gehirnzellkulturen durchgeführt (siehe Abb. 3).

Das nachfolgende Protokoll wurde in Anlehnung an die Angaben des Herstellers verfasst und beruht auf der RNA-Isolierungsmethode nach CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987).

1. Abnahme des Medium mit der Pipette.
2. TRIzol<sup>®</sup> Reagenz (Invitrogen<sup>™</sup> GmbH, Karlsruhe) auf die Zellen geben (Zellkultur-Platte, 24 Vertiefungen: 150 µl/Vertiefung).
3. Abschaben der adhärennten Zellen mit der Pipettenspitze, mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Flüssigkeit bis eine schleimige Konsistenz erreicht ist.
4. Den Inhalt von drei Vertiefungen in ein 2 ml Eppendorfgefäß zusammengeben (450 µl), Inkubation für 3 Minuten (Raumtemp).
5. Zugabe von 140 µl Chloroform, sorgfältiges Verschließen des Gefäßes, kräftiges Schütteln (15 Sekunden, Sek).
6. Inkubation (2-3 Min, Raumtemp), und Zentrifugation bei 12.000 x g (15 Min, 4°C). Dadurch wird eine Auftrennung des Gemisches in eine obere wässrige Phase (enthält RNA), eine Intermediär-Phase (enthält DNA) und eine untere, organische Phase (enthält Proteine und DNA) erreicht.



7. Vorsichtige Entnahme der oberen wässrigen Phase und Überführung in ein RNase freies Eppendorfgefäß.
8. Zugabe von jeweils 420 µl (mindestens gleiche Menge wie wässrige Phase) 100%igem Isopropanol (Rotipuran<sup>®</sup>, Roth GmbH & Co. KG) und Auf- und Abpipettieren des Gemisches, bis zum Verschwinden der Schlieren.
9. Inkubation bei – 20°C über Nacht zum Ausfällen der RNA.
10. Zentrifugation bei 12.000 x g zur Erstellung eines RNA-Pellets (10 Min, 4 °C).
11. Vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes und Waschen des Pellets mit 75%igem Ethanol.
12. Verwerfen des Überstandes und Überschichten des RNA-Pellets mit 150 µl 75%igem Ethanol.
13. Lagerung des RNA-Pellets bei – 80 °C bis zur DNase-Behandlung.

### 3.8.2 DNase-Behandlung

Die RNA wurde schließlich mit dem RNeasy Minikit™ aufgereinigt.

Das nachfolgende Protokoll ist nach den Angaben des Herstellers durchgeführt worden.

1. Zentrifugation der Proben bei 14.000 x g (10 Min, 4 °C).
2. Abgießen des Alkohols und Trocknen der Eppendorfgefäße.
3. Herstellung des Puffergemisches mit 350 µl *RLT Buffer*, 3,5 µl β-Mercaptoethanol und 350 µl 70%igem Ethanol.
4. Auffüllen der Probengefäße mit 100 µl Diethylpyrokarbonat (DEPC)-Wasser und 600 µl Puffer, Resuspendieren der Proben.
5. 700 µl auf die RNeasy-Mini-Säule geben, Zentrifugation bei 12.000 x g (15 Sek), Verwerfen des Eppendorfgefäßes und des Durchflusses.
6. Säule auf neues 2 ml Eppendorfgefäß setzen und Zugabe von 350 µl *RW 1*; Zentrifugation bei 12.000 x g (15 Sek), Verwerfen des Durchflusses.
7. Zugabe von 10 µl *DNase -I-Stammlösung* zu 70 µl Puffer *RDD* (pro Probe). Inkubation (15 Min, Raumtemp).
8. 350 µl Buffer „RW 1“ auf die Säule pipettieren. Zentrifugation bei 12.000 x

- g, (15 Sek), Verwerfen des Durchflusses und des Eppendorfgefäßes.
9. Säule auf ein 2 ml- Eppendorfgefäß (im Kit) setzen und Zugabe von 500 µl Puffer *RPE*. Zentrifugation bei 12.000 x g (15 Sek), Verwerfen des Durchflusses.
  10. 500 µl Puffer *RPE* auf die Säule geben. Zentrifugation bei 12.000 x g (2 Min), Verwerfen des Durchflusses und Eppendorfgefäßes.
  11. Säule auf neues 2 ml Eppendorfgefäß geben. Zentrifugation bei 12.000 x g (1 Min).
  12. Säule auf 1,5 ml Eppendorfgefäß geben. Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser. Zentrifugation bei 12.000 x g (1 Min).
  13. Entnahme von 5 µl zur Konzentrationsbestimmung und Einfrieren des Restes in flüssigem Stickstoff.
  14. Lagerung der aufgereinigten Proben bei –80°C.

Die 5 µl zur Konzentrationsbestimmung wurden mit 70 µl DEPC-Wasser durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren gemischt und der RNA-Gehalt der Proben wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Spektralphotometer (Gene Quant II, Amersham Biosciences Europe GmbH) bestimmt. Mit Ausnahme des β-Mercaptoethanols und des Ethanolts waren alle verwendeten Lösungen im RNeasy Minikit™ enthalten.

### 3.8.3 Reverse Transkription

Im PCR Ansatz wurden 24 µl Probe (maximaler RNA Gehalt: 1 µg) mit 4,0 µl 10 x Puffer RT, 4,0 µl dNTP Mix (5 mM je dNTP), 2,0 µl *Random Hexamers*, 2,0 µl RNase Inhibitor (RNase OUT™, 10 U/µl) und 2,0 µl Omniscript Reverse Transkriptase™ gründlich gemischt und anschließend 60 Min bei 37 °C inkubiert. Die Transkription der aufgereinigten RNA in cDNA wurde mit dem Omniscript-Kit (Qiagen,) mit RNase Out (Invitrogen™GmbH) und Random Primers (Promega) durchgeführt. Dies erfolgte in einem Multicycler PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH).

Folgendes Temperaturprofil wurde gewählt:

1. 10 Min bei 25°C (Temperaturadaptation der Oligonucleotid-Hexamere).
2. 1 Stunde bei 37°C (Binden und Elongation der Hexamere).

3. 5 Min bei 93°C (Inaktivierung der reversen Transkriptase).
4. bei 4°C bis zur Entnahme der Proben.

Die cDNA wurde in zwei Aliquots mit jeweils 19 µl bis zur Durchführung der quantitativen PCR (qPCR) bei – 20 °C gelagert.

### 3.8.4 Quantitative PCR

Für die qPCR wurde zur Detektion der MMPs und TIMPs (MMP-2, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 und -2), sowie von CDV und Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR-Green™) eingesetzt, der an doppelsträngige DNA bindet. Die Spezifität wurde anhand einer Dissoziationskurve überprüft. Dabei wird das PCR-Produkt nach dem letzten Zyklus durch langsame Erhitzung denaturiert, wodurch anhand der so ermittelten Schmelzpunkte die Längen der im Reaktionsgemisch vorhandenen PCR-Produkte und damit die Spezifität der Reaktion bestimmt werden können. Für die Detektion von MMP-9 wurde eine Taqman®- Sonde verwendet (BUSTIN, 2000). Als *housekeeping gene* diente GAPDH, die sich durch eine extrem konstante Expressionsrate auszeichnet (GRÖNE et al. 1999).

In der qPCR-Reaktion wurden neben den Proben der Gehirnzellen stets Negativkontrollen und die Verdünnungsreihe eines entsprechenden DNA-Mengenstandards gemessen. Der Mengenstandard wurde aus mRNA von der kaninen Tumorzelllinie DH82 mittels RT-PCR gewonnen. Bei den Negativkontrollen handelte es sich um sogenannte *no template controls* (NTCs), bei denen die cDNA durch DEPC-behandeltes Wasser ersetzt wurde. Die Etablierung der qPCR wurde im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit aus dem Institut mit verschiedenen *Annealing*-Temperaturen, MgCl<sub>2</sub>- und Sondenkonzentrationen in einer Standardverdünnungsreihe getestet, bis die für das verwendete Sonden-Primer-Paar besten Bedingungen ermittelt waren. Die Auswahl der verwendeten Primer und Sonden erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms BeaconDesigner® 2.03 der Firma Premier Biosoft International (Palo Alto, USA, Tabelle 3). Die Primersynthese wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Die Herstellung der TaqMan-Sonde für MMP-9 wurde

bei der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) in Auftrag gegeben. Bei der Sonde für die Detektion von MMP-9 wurde TAMRA als Quencherfarbstoff verwendet, als Reporterfarbstoff diente FAM. Die Komponenten für einen Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25  $\mu$ l stammten bis auf das DEPC-behandelte Wasser aus *Brilliant Core Reagent Kits* der Firma Stratagene (LaJolla, USA). Die einzelnen Komponenten wurden entsprechend ihrer Anzahl an Reaktionen auf Eis zusammengegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach dem Aliquotieren erfolgte die Zugabe von 1  $\mu$ l gelöster cDNA, bzw. 1  $\mu$ l DEPC-behandeltem Wasser bei den Negativkontrollen. Das Zeit-Temperatur-Profil der qPCR mit 42 (CDV: 40) Zyklen wurde entsprechend der zuvor durchgeführten Etablierung gewählt.

**Tabelle 3: Primer für die qPCR inklusive Bezeichnung, Sequenz und Quelle**

Primer	Interne Bez.	Sequenz (5' - 3' Richtung)	Länge des Ampl.	Acc.-Nr., Position
MMP-2 S	P 278	GGAGATCTTCTTCTTCAAGG ACCG	89 bp	GI 7688730; 1367-1390
MMP-2 AS	P 279	AGAATGTGGCTACCAGCAG GG		GI 7688730; 1455-1435
MMP-9 S	P 207	CATGACATCTTCCAGTACCA AG	85 bp	GI 11034715; 1975-1996
MMP-9 AS	P 208	GGTTCACCTCATTCCGAGA A		GI 11034715; 2059-2040
MMP-9 Sonde	P 209	<i>FAM</i> - CTACTTCTGCCAGGACCGC TTCTACT- <i>TAMRA</i>		GI 11034715; 2004-2029
MMP-12 S	P 370	CCCTTTTGATGGCCGAGGT G	117 bp	DQ 395095 1-20
MMP-12 AS	P 371	TTTGTGCCTTTGTAGGTTTT AGTCC		DQ395095 93-117
MMP-13 S	P 229	GGCTTAGAGGTCCTGGCA AAC	118 bp	GI 6573122; 202-223
MMP-13 AS	P 230	TGGACCACTTGAGAGTTCG GG		GI 6573122; 319-299
MMP-14 S	P 231	GATTCCTTCCCAGACCTTGA TGTTT	116 bp	AY 534615; 242-266
MMP-14 AS	P 232	GGATGCCCAATGGAAAGAC CTAC		AY 534615; 173-151

**Tabelle 3-Fortsetzung: Primer für die qPCR inklusive Bezeichnung, Sequenz und Quelle**

TIMP-1 S	P 192	ACGGACACTTGCAGATCAA C	94 bp	GI 4204240; 388-407
TIMP-1 AS	P 193	GCAGCATAGGTCTTGGTGA A		GI 4204240; 481-462
TIMP-2 S	P 195	CCATCAAGCGGATTCAAGT	89 bp	GI 3719469; 54-71
TIMP-2 AS	P 194	GGAAGGAGCCGTGTAGATA A		GI 3719469; 142-123
CDV S	P 170	GCTCTTGGGTTGCATGAGT T	83 bp	GI 14150871; 954-973
CDV AS	P 171	GCTGTTTCACCCATCTGTTG		GI 14150871; 1036-1017
GAPDH S	P 190	GTCATCAACGGGAAGTCCA TCTC	84 bp	GI 6983846; 196-218
GAPDH AS	P 191	AACATACTCAGCACCAGCA TCAC		GI 6983846; 279-257

Bez.-Bezeichnung; Ampl.-Amplifikat; Acc.-Nr.-*accession number*; S-sense; AS-*antisense*; bp-Basenpaare; MMP-Matrix-Metalloproteinase, TIMP-*tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*; GAPDH-Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase;

### 3.8.5 Sensitivität der qPCR

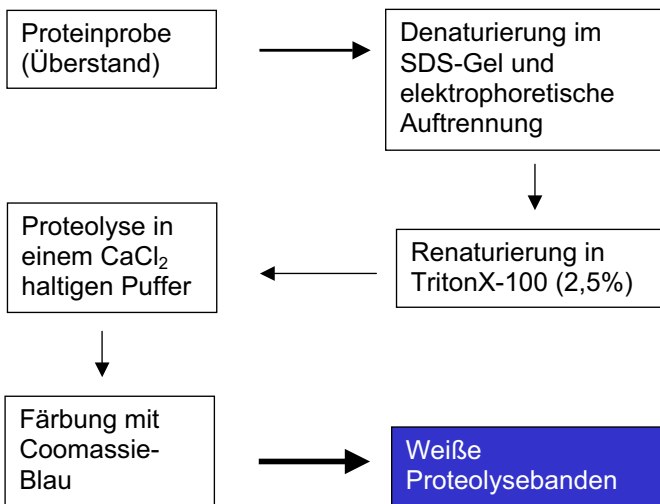
Um die Sensitivität der qPCR zu überprüfen, wurden von den mittels herkömmlicher PCR für die einzelnen Sequenzen hergestellten Mengenstandards Verdünnungsreihen von  $10^8$  bis  $10^1$  Kopien/ $\mu$ l hergestellt und in der qPCR als Template verwendet.

### 3.9 Zymographie

Die Zymographie ist eine elektrophoretische Methode zur Messung der proteolytischen Aktivität von Proteasen und ihren Proenzymen. Ein in das Natrium-Docedyl-Sulfat-Gel (SDS-Gel) eingebautes Proteinsubstrat (Gelatine/Kasein) wird nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteasen durch diese degradiert. Der Vorteil der Zymographie liegt in der vergleichsweise hohen Sensitivität, die sie zur Detektion auch geringer Mengen an Proteasen geeignet macht (SNOEK-VAN BEURDEN und VON DEN HOFF, 2005).

Die Aktivierung der Proenzyme ist durch den sogenannten *cysteine switch* zu erklären, welcher unter Laborbedingungen im SDS-Gel nachträglich durch Einlagerung von OH-Gruppen erfolgt (FERGURSON und MUIR, 2000).

**Abb. 6. Schematische Darstellung der Zymographie**



Die Proteinprobe, in diesem Fall der Zellkulturüberstand, wurde in jede Geltasche (slot) geladen. Nach der Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen, erfolgten die Renaturierung für 0,5 h und die 24 - (Gelatine) bzw. 36 (Kasein)-stündige Inkubation in Anwesenheit von  $\text{CaCl}_2$ . Die Blaufärbung des Gels bleibt nach der Entfärbung nur in den substrathaltigen Bereichen des Gels erhalten. Die Areale, in denen das Substrat verdaut wurde, erscheinen weiß.

### 3.9.1 Proben für die Zymographie

Die Zellkulturüberstände wurden zur Entfernung des Zelldetritus bei 450 x g zentrifugiert. Eine 10fache Konzentration der Proben erfolgte durch Zentrifugation mit Konzentratoren bei 15.000 x g (15 Min, 4 °C, Konzentratoren mit einer Polyethersulfon-Membran, Vivaspin 500, Vivascience, Deutschland). Anschließend wurde das Konzentrat mit Laemmli-Puffer (BIO-RAD, MÜNCHEN) ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol 1:1 verdünnt und bei – 80°C bis zur Durchführung der Zymographie gelagert.

Die Zymographie wurde jeweils in einem dreifachen Ansatz mit gleicher Zellzahl von Kontrollen und infizierten Zellen durchgeführt. Dabei wurden zur Vergleichbarkeit die Dreifachansätze der Kontrollen und der infizierten Zellen eines Zeitpunktes und eines Kultursystems (Gruppe A bzw. Gruppe B) gemeinsam auf einem Gel aufgetragen.

### 3.9.2 Protokoll zur Durchführung der Zymographie

1. Gießen der Gele, (Anhang 9.6).
2. Auftauen der Proben (Raumtemp).
3. Verdünnen des Lauf-Puffers 10:1 (BIO-RAD Laboratories, MÜNCHEN, BIO-RAD) und Füllen der Elektrophoresekammer (BIO-RAD).
4. Waschen der Geltaschen mit Lauf-Puffer (10 $\mu$ l Pipette), um vorhandene Luftblasen vom Boden zu lösen.
5. Laden der Proben mit Pipette Xcluda (Xcluda<sup>®</sup>Aerosol Barrier Pipet Tips, Style G, BIO-RAD).
6. Bei 15 mA/ Gel die Elektrophorese durchführen (ca. 2 Std und 45 Min, bis der blaue Probenpuffer aus dem Gel gelaufen ist).
7. Entfernen der Gele aus der Kammer und Markierung an einer Seite (Gel 1: links oben Ecke abschneiden, Gel 2: links unten Ecke abschneiden).
8. Inkubation der Gele in Plastikboxen in Aqua dest. mit 2,5 %igem TritonX-100 auf dem Plattformschüttler (New Brunswick, 30 Min, 55 rpm).
9. Waschen der Gele in Aqua dest. (dreimal, insgesamt 30 Min).



10. Inkubation der Gele in dem MMP-Substrat-Puffer (50 mM Tris HCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,6) für 24 Std (Kasein-Gele: 36 Std) in geschlossenen Plastikboxen.
11. Waschen mit Aqua dest. (insgesamt 10 – 15 Min).
12. Färben der Gele mit „Coomassie- Brilliant Blue R-250“ (45 Min, BIO-RAD, München).
13. Inkubation der Gele in der Entfärbelösung (30 Min, BIO-RAD), bis die weißen Banden auf dem blauen Untergrund deutlich sichtbar sind.
14. Waschen der Gele in Aqua dest. und Lagerung bei 4°C.
15. Dokumentieren der Ergebnisse mit dem BioDocAnalyse-System (Whatman Biometra, Göttingen).

### 3.9.3 Kontrollen

Als Massenstandard wurde der peqGOLD Protein-Marker II (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) benutzt.

Als Positivkontrolle für eine gelatinolytische Aktivität dienten gereinigtes, humanes MMP-2 und MMP-9 (Chemicon, Großbritannien). Dieser humane Standard weist proteolytische Banden bei 92 kDa (MMP-9 Proenzym), bei 180 kDa (MMP-9 Proenzym, Dimerform), bei 68 kDa (MMP-2 Proenzym) und bei 62 kDa (MMP-2 aktives Enzym) auf. 1  $\mu\text{l}$  der konzentrierten Stammlösung wurde mit 19  $\mu\text{l}$  Laemmle-Puffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol verdünnt.

Gelatinezymographie: der Überstand (2000 Zellen/Geltasche) der kaninen DH82 Makrophagenzelllinie diente als weitere Positivkontrolle der gelatinolytischen Aktivität (Barnes et al., 2000). Er wies eine Proteolysebande bei 90 kDa (pro MMP-9) und bei 230 kDa (vermutlich Dimerform oder Komplex MMP-9/TIMP-1) auf.

Kaseinzyzymographie: mit einem Onderstepoortstamm persistent infizierte DH82 Zellen exprimierten regelmäßig eine MMP mit kaseinolytischer Aktivität bei 50kDa interpretiert als pro-MMP-12 und im Westernblot bestätigt. Daher wurde Überstand dieser Zellen als Positivkontrolle in der Kaseinzyzymographie eingesetzt.

Zum Nachweis der Kalziumabhängigkeit der Proteasen wurde in simultanen Versuchsansätzen dem Entwicklungspuffer EDTA mit einer Endkonzentration von 50 mM zugesetzt.

### 3.10 Western-Blot

Zur Identifizierung der in der Zymographie detektierten MMPs wurde ein Western-Blot durchgeführt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: **Spezifität, Bezugsquelle und Verdünnung der im Western-Blot verwendeten Antikörper**

Antikörper	Klon, Spezifität	Bezugsquelle	Verdünnung
MMP-2 Ab-1	Monoklonal (Klon CA-4001) Maus-anti-Mensch	Neomarkers	1:200
RHMMP-3	Polyklonal Kaninchen anti- Mensch	Triple Point Biologics	1:2500
RM105 MMP-9	Polyklonal Kaninchen-anti- Maus	Triple Point Biologics	1:3000
RP1MMP-12	Polyklonal Kaninchen-anti- Mensch	Triple Point Biologics	1:3000
RP1MMP-13	Polyklonal Kaninchen-anti- Mensch	Triple Point Biologics	1:3000

#### 3.10.1 Protokoll Western-Blot

1. Konzentration der konditionierten Mediumproben (40fach), Erhitzung in einem 85° C heissen Wasserbad (10 Min).
2. Durchführung der Gelelektrophorese mit einem 10 %igen SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen (Laemmli-Puffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol), bei 215 Volt für 1 Stunde und 15 Min mit dem Laufpuffer.

3. Markierung der Membranen und Inkubation im Übertragungspuffer (5 Min).
4. Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (BIO-RAD) in der Transferzelle (Roth C. GmbH & Co. KG, Karlsruhe; 100 Volt , 2 ½ Std).
5. Waschen der Membranen in TBS-T (Anhang: 9.6, dreimal 15 Min).
6. Blocken der Membranen in 5%igem fettarmen Milchpulver (1,25 g Magermilch in 25 ml TBS-T, 90 Min, Raumtemp).
7. Waschen in TBS-T (dreimal 15 Min).
8. Inkubation mit dem jeweiligen 1. Antikörper für 1-2 Std bei Raumtemp oder bei 4°C über Nacht.
9. Waschen der Membranen in TBS-T (dreimal 5 Min).
10. Inkubation mit dem 2. Antikörper (Meerrettichperoxidase gekoppelt; 45 Min, Raumtemp).
11. Nach extensivem, dreimaligem Waschen mit TBS Visualisierung der Banden mit dem Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate for HRP Detection (Pierce) nach den Angaben des Herstellers.
12. Belichtung mit einem Kodak Scientific Imaging-BIO-Max, X-OMA AR-4 Film (Amersham, Biosciences Europe GmbH, Freiburg) und Entwicklung der Filme.

Als Positivkontrolle für den Western-Blot dienten kanine DH82 Zellen (BARNES et al., 2000), als Negativkontrolle 40fach-konzentriertes Nährmedium (Sato's Medium).

## 3.11 Auswertung

### 3.11.1 Immunfluoreszenz

Die Auszählung erfolgte unter dem Auflichtmikroskop IX 70 (Olympus) mit Hilfe einer eingesetzten Netzmikrometerplatte (U-OCMQ10/10, Olympus). Diese Platte begrenzt bei der Verwendung eines 20fach Okulars ein Zählfeld von  $0,25 \text{ mm}^2$  ( $0,05 \text{ mm} \times 0,05 \text{ mm}$ ).

Es wurden in 5 zufällig ausgewählten Zählfeldern zunächst die Kerne gezählt (mindestens 500 Zellen) und anschließend erfolgte mit dem Blau-/ oder Grünfilter die Auszählung der positiven Zellen der jeweiligen Marker.

Zur qualitativen Auswertung der Ond-GFP positiven doppelmarkierten Zellen wurden die gesamten Zellen einer Vertiefung auf eine Doppelmarkierung mit anderen Markern untersucht.

### 3.11.2 RT-qPCR

Für jedes Gen wurde durch Vergleich mit der aus den Mengenstandards ermittelten Standardkurve die Kopienzahl ermittelt. Um Schwankungen in der RNA-Extraktion und RT-Reaktion auszugleichen, wurde der Quotient aus den Kopienzahlen der exprimierten MMPs und TIMPs und dem konstant exprimierten *Housekeeping gene GAPDH* gebildet. Anschließend wurden die so normalisierten Kopienzahlen der verschiedenen Kulturarten untereinander und die Kontrollkulturen mit den infizierten Kulturen auf signifikante Unterschiede untersucht.

### 3.11.3 Densitometrie der Gelatine-Zymographie

Die densitometrische Auswertung der Gelatine-Zymographie erfolgte mit dem BioDocAnalyze-System (Whatman Biometra, Göttingen). Hierbei wurden die proteolytischen Banden der zu gleichen Zellzahlen aufgetragenen Überstände von Kontrollkulturen und infizierten Kulturen auf einem Gel nach den Angaben von Biometra ausgemessen und die Mittelwerte der Dreifachansätze einer jeden Präparation mit Standardabweichung einander gegenübergestellt. Hierbei wurden

die Werte der Kontrollkulturen als Ausgangswerte 100% gesetzt und die Abweichung der infizierten Kulturen berechnet.

#### **3.11.4 Statistik**

Die statistische Aufarbeitung der erhobenen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung der Programme SAS (Statistical Analysis System, Version 8.2, SAS Institute Inc., 1999) und SPSS (Superior Performing Software Systems, Version 12.0) bearbeitet. Die graphischen Darstellungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm SPSS (Version 12.0) erzeugt. Für die statistischen Analysen wurden die Mediane, Minima und Maxima der Daten berechnet. Des Weiteren wurden die Daten anhand des Shapiro-Wilks-Testes und mittels Q-Q-Plots auf Normalverteilung geprüft. Da die Daten sich als überwiegend nicht normalverteilt erwiesen, wurden in den weiterführenden Untersuchungen nicht-parametrische Testverfahren eingesetzt. Als Globaltest zum Gruppenvergleich wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Für den paarweisen Gruppenvergleich wurde als nicht-parametrischer Test der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Bei Benennung der statistischen Signifikanzen wurde ein vergleichsbezogenes Signifikanzniveau (ohne  $\alpha$ -Adjustierung nach Bonferroni) von  $\alpha = 0,05$  zu Grunde gelegt. Ergebnisse mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Für den Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte innerhalb einer Gruppe wurde als nicht-parametrischer Test der Wilcoxon-Test eingesetzt.



## 4. Ergebnisse

Die Ergebnisse werden entsprechend der Thematik in drei Abschnitte eingeteilt.

Unter 4.1 werden die Ergebnisse der Zellisolierung, Aufreinigung und Zellcharakterisierung vorgestellt. Zunächst wird auf die Zellausbeute der Primärkulturen eingegangen, gefolgt von der Charakterisierung der primären Mischkulturen (P1) und den Ergebnissen der Etablierung der Aufreinigung der Mikroglia/Makrophagenkulturen. Die serumfreien Kulturen schließen diesen ersten Teil der Ergebnisse ab.

Im zweiten Teil, 4.2, wird die MMP-Expression der nicht infizierten Kulturen der Gruppen  $A_{\text{ohne}}$ ,  $A_{\text{Kokultur}}$ ,  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  auf mRNA-Ebene (qPCR) und Proteinebene (Zymographie und Western-Blot) behandelt.

Schließlich werden unter 4.3 die Ergebnisse der Infektionsversuche mit den Gruppen  $A_{\text{Virus}}$  und  $B_{\text{Virus}}$  dargestellt.

### 4.1 Isolierung und Kultivierung der Gehirnzellen

#### 4.1.1 Zellausbeute und Morphologie der primären Mischkulturen, P0

Zur Untersuchung und Kultivierung der Zellen lagen insgesamt 12 Hundegehirne von Tieren im Alter von 8 Wochen bis 12 Jahren vor. Aus 11 von 12 Hundegehirnen wurden erfolgreich lebende Zellen kultiviert. Die post mortem Intervalle bis zur Gehirnentnahme betragen eine halbe bis vier Std (Tabelle 5 und 6).

Die isolierte Zellzahl betrug bei Aussaat in die Zellkulturflaschen  $86 \times 10^6$  lebende Zellen/Hundegehirn (minimum  $28 \times 10^6$ , Maximum  $410 \times 10^6$ , Tabelle 5 und 6) und bei  $0,9 \times 10^6$  Zellen/g Gehirn. Nach Methode 1 (3.3.1) wurden  $0,7 \times 10^6$  lebende Zellen/g Gehirn ( $0,30\text{-}5,6 \times 10^6$  Zellen) isoliert. Die Methode 2 (3.3.1.1, enzymatische Dissziation der Firation durch ein Netz vorangestellt) ergab eine Zellausbeute von  $3,31 \times 10^6$  lebenden Zellen/g Gehirn ( $1,73\text{-}5,6 \times 10^6$  Zellen). Die lichtmikroskopische Betrachtung der isolierten Gehirnzellen zeigte, dass die nach Methode 1 isolierten Zellen sich schneller auf dem Zellkulturboden absetzten und proliferierten als die nach der Methode 2 isolierten Kulturen. Erstere wiesen nach

3-4 Tagen Kultivierung kurze Ausläufer auf, während die nach Methode 2 isolierten Zellen bis zum 5./6. Tag als rundliche Zellen ohne Fortsätze den Flaschenboden bedeckten und zahlreiche Zellen sich in Suspension befanden. Im Verlauf der weiteren Kultivierung setzten sich die nach Methode 2 isolierten Zellen auf dem Flaschenboden ab und waren nicht von den nach Methode 1 isolierten Zellen zu unterscheiden. Die Kulturen beider Dissoziationsarten werden daher in den folgenden Abschnitten zusammen behandelt.

36 Std nach der Isolierung waren auf dem Flaschenboden neben zahlreichem Zelldetritus vereinzelt rundliche und spindelförmige Zellen mit einer Größe bis 10  $\mu\text{m}$  zu erkennen (fotographische Abbildung, Foto 1). Das Zytoplasma dieser Zellen zeigte sich insbesondere in den ersten Tagen der Isolierung feingranuliert (Foto 2). Im weiteren Verlauf proliferierten zwei große Zellpopulationen. Eine bestand aus eher flächigen, fibroblastenähnlichen Zellen, mit einem meist großen, längsovalen Zellkern und einer unterschiedlichen Anzahl und Länge von Fortsätzen. Diese Zellen erreichten eine Größe von bis zu mehreren 100  $\mu\text{m}$  und proliferierten sehr stark ab dem 6./7. Tag nach der Isolierung. Locker adhären auf den beschriebenen Zellen, aber auch adhären auf der PLL-Beschichtung fand sich eine Population kleinerer (10-60  $\mu\text{m}$ ), meist rundlicher Zellen mit einigen kurzen, plumpen (Foto 3) zum Teil auch kurzen, haarähnlichen Fortsätzen, oder einem bis >100  $\mu\text{m}$  langen Ausläufer und einem runden bis ovalen Zellkern. Nach 9-13 Tagen *in vitro* war ein weitgehend konfluenter, zweischichtiger Zellrasen ausgebildet (Foto 4). Diese Kulturen wurden zum Teil trypsinisiert (Gruppe A<sub>Kokultur</sub>, Foto 5, A<sub>ohne</sub> Foto 6) und zum Teil geschüttelt zur Aufreinigung der Mikroglia/Makrophagen (Gruppe B<sub>ohne+Kond+Kokultur</sub>).



Tabelle 5: Zur Etablierung der Kulturen verwendete Tiernummern, Zellausbeute, Reinheit der Mikroglia/Makrophagen

Tiennr.	p.m.i. Beginn (Std, Min)	p.m.i. Trypsin (Std, min)	Methode der Isolierung	Isolierte Gesamtzell- zahl (lebend/ tot)	Verwendet zur Etablierung der	Zeitpunkt Schütteln p.m.i. Tage	Zellzahl Gruppe B nach dem Schütteln (2x 25cm <sup>2</sup> Flaschen)	Reinheit Gruppe B (%) Dil-ac-LDL positive Zellen 24 Std n.a.
1	0,45	n.e	1	66.000.000/ 23.000.000	-Antikörper -Aufreinigung Gruppe B -Zymographie	12	800.000	75
2	2,30	n.e.	1	74.800.000/ 56.000.000	- Antikörper - Aufreinigung Gruppe B -Zymographie	9	650.000	84
3	2,30	n.e.	1	86.000.000/ 23.000.000	- Aufreinigung Gruppe B -Zymographie	11	1.500.000	81
4	4,00	n.e.	1	95.000.000/ 22.000.000	- Aufreinigung Gruppe B - Zeitpunkte Infektion	9	1.900.000	91
5	0,45	2,50	1	235.000.000/ 35.000.000	-Aufreinigung Gruppe B -Zeitpunkte Infektion	10	1.600.000	93

**Tabelle 6: Für die Infektionsversuche verwendete Hundegehirne (Zellausbeute, Reinheitsgrad der Gruppe B)**

Tierr.	p.m.i. Beginn (Std, Min)	p.m.i. Typ. (Std, Min)	Methode	Isolierte Gesamtzellzahl, (lebend/ tot)	Zeitpunkt Schütteln p.m.i. Tage	Zellzahl Überstand (2 x 25 x <sup>m2</sup> Flaschen)	Reinheit der Gruppe B (%) stark Dil-ac-LDL positiver Zellen	Zellzahl adhärenter Zellen nach dem Schütteln	
<b>6</b>	0,45	3.05	2	410.000.000/ 150.000.000	13	3.620.000	91,4	1.500.000	
<b>7</b>	0,30	2.45	1	78.400.000/ 10.000.000	9 SF	3.500.000	94,3	1.625.000	
<b>8</b>	1,10	3.45	2	140.000.000/ 98.000.000	13	2.605.000	93,3	2.117.500	
<b>9</b>	0,45	2.30	1	130.000.000/ 35.000.000	10 SF	4.070.000	95,4	1.820.000	
<b>10</b>	0,45	2.45	2	225.000.000/ 181.000.000	Nach 3 Tagen verworfen				
<b>11</b>	0,30	2.30	1	66.000.000/ 88.000.000	Infektion SF	entf	entf	entf	entf
<b>12</b>	0,30	2.45	1	28.000.000/ 1.200.000	Infektion SF	entf	entf	entf	entf

p.m.i.-post mortem Intervall, Std:Stunden, Min:Minuten, Methode 1: Filtrieren durch das Netz der enzymatischen Dissoziation vorangestellt;  
Methode 2: enzymatische Dissoziation vor der Filtration durch das Netz (nach YONG et al., 1992); n.e.: nicht erhoben; Gruppe B: gereinigte  
Mikroglia/Makrophagen-Kulturen; Dil-ac-LDL: Dil-azetylertes-Low-density-Lipoprotein; n.e.: nicht erhoben; entf.:entfällt.  
SF: diese Kulturen wurden zusätzlich bis 5 Wochen nach der Isolierung in serumfreien Medium kultiviert.

#### **4.1.2 Zur Etablierung der Kulturen verwendete Tiernummern, Zellausbeute, Reinheit der enzymatische Dissoziation Primäre Mischkulturen, P1 (Gruppe A<sub>ohne</sub>)**

Die Mischkulturen der ersten Passage (Foto 6) entsprachen bei lichtmikroskopischer Betrachtung den unter 4.1.1 beschriebenen Primärkulturen der P0. Die Kulturen wiesen einen zweischichtigen Aufbau auf. Auf dem Boden adhärent waren die vorwiegend flächigen Zellen zu finden, oberflächlich anhaftend befanden sich wenige bis 10 µm große, bi- bis tripolare Zellen und rundliche bis 60 µm große Zellen mit kurzen Ausläufern.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung (Tabelle 7) waren 24 Std nach der Aussaat 71,3% (65,6-88,6%) der Zellen Vimentin-positiv. Es handelte sich dabei um die beschriebenen, auf dem Boden adhärennten, flächigen Zellen. Vereinzelt wurde eine Doppelmarkierung mit A2B5 und häufig eine Doppelmarkierung mit schwach Dil-ac-LDL-positiven Zellen detektiert. Eine Doppelmarkierung mit O4 wurde nicht beobachtet, eine Doppelmarkierung mit GFAP wurde nicht durchgeführt. Eine weitere Zellpopulation war die als Mikroglia/Makrophagen identifizierte Zellpopulation (Foto 4+7). Sie besaß vorwiegend eine amöboide, abgerundete Form mit entweder piliformen, wenigen µm langen Fortsätzen oder einem unipolar ausgerichteten bis 100 µm langen Fortsatz. Diese Zellen machten 14,5% (9,5-18,4%) der gesamten Zellpopulation aus und waren stark Dil-ac-LDL-positiv (Foto 7), sie zeigten keine Doppelmarkierung mit den Markern A2B5, O4 und GFAP (Tabelle 8).

Weiterhin wiesen 18% der Zellen (11-24,5%) mit flächiger Morphologie und einem großen ovalen Zellkern eine im Vergleich zu den Mikroglia/Makrophagen schwächere Reaktion mit Dil-ac-LDL auf (Foto 8). Diese Zellen wiesen im Zytoplasma eine fein granuliert Anfärbung auf und waren Vimentin positiv. Eine Doppelmarkierung mit O4 oder GFAP und A2B5 wurde nicht detektiert.

Der Oberflächenmarker A2B5 erkennt ein Gangliosid sogenannter O2A-Progenitorzellen (siehe Tabelle 2). 15,5% der Zellen (11,6-21,3%) wurden durch ihn erfasst. Es handelte sich um eine morphologisch heterogene Population von Zellen; das Soma der Zellen war ca. 20-30 µm groß, mit einem kleinen, runden Zellkern und entweder langen, bipolar ausgerichteten oder kurzen, plumpen Ausläufern (Foto 9-

12). Bei diesen Zellen wurden vereinzelt Doppelmarkierungen mit Vimentin beobachtet.

Eine deutliche GFAP-Expression wiesen 4,3% der Zellen (0,6-6,8%) auf (Foto 7+13). Die Zellen wiesen meist eine verzweigte Struktur mit mehreren 100 µm langen Ausläufern auf. Diese Zellen exprimierten Vimentin und waren A2B5, Iba1 und O4 und Dil-ac-LDL negativ.

O4, einen Marker (prä)maturer Oligodendrozyten, exprimierten 1,4% (0-2,5%) der Zellen (Foto 14+15). Sie wiesen eine bi- bis multipolare Morphologie auf, waren ca. 20 µm groß, mit einem runden Zellkern, meist adhären auf den beschriebenen flächigen Zellen wachsend, aber auch direkt auf dem Flaschenboden.

Eine positive Immunreaktion mit O1 wurde nicht beobachtet. Die Färbung mit dem Antikörper p75 erfolgte in diesen Kulturen nicht.

**Tabelle 7: Antigenexpression (%) in Mischkulturen (Gruppe A<sub>ohne</sub>) und Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B<sub>ohne</sub>)**

Gruppe Zeitp.	A2B5	O4	Iba1	Dil-ac- LDL (stark)	Dil-ac- LDL (schwach)	GFAP	Vimentin
A <sub>ohne</sub> , 24 h	15,50	1,4	16,50	14,50	18,00	4,30	71,3
A <sub>ohne</sub> , 48 h	14,80	1,9	11,50	12,10	14,60	3,90	74,6
A <sub>ohne</sub> , 96 h	18,50	0,9	15,20	16,40	16,50	2,80	68,6
B <sub>ohne</sub> , 24 h	n.d.	<0,5	n.d.	94,00	0	0	n.d.
B <sub>ohne</sub> , 48 h	n.d.	<0,5	92,50	90,30	0	0	n.d.
B <sub>ohne</sub> , 96 h	n.d.	<0,5	79,80	82,50	0	0	n.d.

Die Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der positiven Zellen (%) an der Gesamtzellzahl bei 500 gezählten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Präparationen.

Gruppe A<sub>ohne</sub> = Mischkultur; Gruppe B<sub>ohne</sub> = Mikroglia/Makrophagen-Kultur; Std = Stunden nach der Aussaat der Primärkulturen der ersten Passage; A2B5 = gegen Gangliosid gerichteter Marker für Oligodendrozytenprogenitorzellen; Dil-ac-LDL = azetyliertes Low-Density-Lipoprotein konjugiert mit Dil und bindet an die Scavengerrezeptoren von Zellen mit Phagozytoseeigenschaften; GFAP = Saures Gliafaserprotein- Marker für Astrozyten; O4 = Sulfatid, Seminolipid, Marker für (prä)mature Oligodendrozyten; Vimentin = Strukturfilament von Astrozyten und Fibroblasten; n.d. = nicht durchgeführt;

**Tabelle 8: Qualitative Darstellung der in den Mischkulturen innerhalb einer Zelle detektierten Doppelmarkierungen**

	A2B5	O4	GFAP	Vimentin	Dil-ac-LDL
A2B5		-	+	+	-
O4	-		-	-	-
GFAP	-	-		+	-
Vimentin	+	-	n.d.		schwach Dil-ac-LDL +
Dil-ac-LDL	+	-	-	+	

+ Doppelmarkierung (DM) detektiert; - DM nicht detektiert; n.d. nicht durchgeführt.

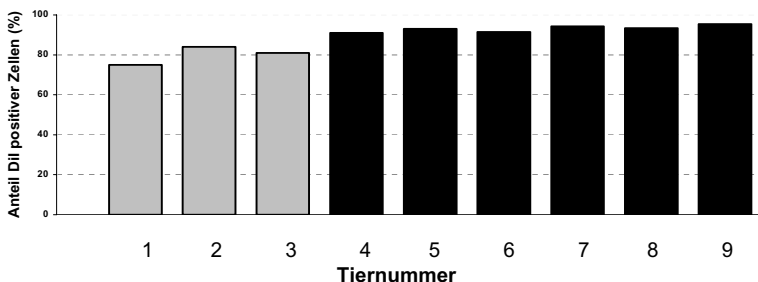
Die DM wurde aufgrund der beschränkten Zellzahl nur in zufällig ausgewählten Vertiefungen der Platten durchgeführt. Eine quantitative Auswertung war aufgrund der wenigen detektierten DM nicht sinnvoll.

A2B5: gegen Gangliosid gerichteter Marker für Oligodendrozytenprogenitorzellen; Dil-ac-LDL: Dil-ac-LDL; bindet an die Scavengerrezeptoren von Zellen mit Phagozytoseeigenschaften; GFAP: Saures Gliafaserprotein- Marker für Astrozyten; O4: Sulfatid, Seminolipid, Marker für (prä)mature Oligodendrozyten; Vimentin: Strukturfilament von Astrozyten und Fibroblasten; n.a.: nicht ausgewertet; n.d.: nicht durchgeführt;

#### 4.1.3 Etablierung der gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen, P1

Die Etablierung der Mikroglia/Makrophagen-Reinigung erfolgte mit den Gehirnen der Tiernummern 1-5 (Tabelle 5). Aus den Gehirnen von 8 Wochen bis 12 Jahre alten Tieren konnten Mikroglia und Makrophagen isoliert und gereinigt werden. Nach dem Schütteln befand sich der überwiegende Teil der zuvor locker adhärenen Zellen (Mikroglia/Makrophagen) in Suspension. Aus ½ Gehirn (2 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen) wurden nach 9-13 Tagen in der Kultur  $1,8 \times 10^6$  ( $0,65- 4,7 \times 10^6$ ) Mikroglia/Makrophagen isoliert. Der Überstand wurde zentrifugiert, die Zellen resuspendiert und in die unbeschichteten Platten ausgesät. Die Aussaat der Primärkulturen P1 der ersten drei Tiere (Tiernr. 1-3) erfolgte nach dem Schütteln ohne weitere Behandlung, hier betrug der Reinheitsgrad der Kulturen 81% (75-84%, Tabelle 5). Der Reinheitsgrad wurde anhand der stark-Dil-ac-LDL-positiven Zellen bestimmt (siehe 4.1.4, Foto 16). Bei den folgenden Präparationen (Tiernr. 4-9) wurde 20 Min nach der Aussaat der Überstand abgenommen. Dadurch ließ sich die Reinheit der Kulturen bei den Präparationen 4-9 auf 93,5% erhöhen (Abb.7). Die nähere Charakterisierung der Zellen ist unter 4.1.4 beschrieben.

**Abb. 7. Prozentsatz der stark Dil-ac-LDL-positiven Zellen in den Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B<sub>ohne</sub>)**



- Gereinigte Primärkulturen, P1, die ohne weitere Behandlung nach dem Schütteln in die unbeschichteten Zellkultur-Platten (24 Vertiefungen) ausgesät wurden, (Protokoll 3.3.2 ohne Schritt 9 II).
- Gereinigte Primärkulturen, P1, deren Überstand 20 Min nach der Aussaat abgenommen wurde. Durch die Abnahme des Überstandes wurde der Reinheitsgrad der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen 24 Std nach der Aussaat von 81% auf 93.5% erhöht.

#### 4.1.4 Primäre Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (P1, Gruppe B)

Nachdem die Kulturen 4 und 5 in der Etablierung einen höheren Reinheitsgrad aufwiesen, als die Kulturen 1-3 (Abb.7) wurde in den Kulturen der Gruppe B weiterhin der Überstand 20 Min nach der Aussaat abgenommen (Protokoll 3.3.2 Schritt 9 II).

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung bestanden die gereinigten Kulturen nach 24 Std aus ca. 40 µm großen Zellen mit einer vorwiegend amöboider, rundlicher Form (Foto 16) mit wenigen kurzen, fadenförmigen Fortsätzen (10 µm) oder plumpen Ausläufern mit Varikositäten an den Enden. Einzelne Zellen waren unipolar und bildeten einen bis zu 100 µm langen Fortsatz aus.

Bei täglicher, lichtmikroskopischer Kontrolle war keine Proliferation der Zellen festzustellen. Vereinzelt befanden sich zwischen den beschriebenen Zellen andere bis 100 µm große Zellen, mit flächiger Morphologie und einem großen ovalen Nukleus. Innerhalb von vier Tagen nach Aussaat war der Anteil dieser flächigen, Dil-

ac-LDL negativen Zellen an der Gesamtzahl der Zellen auf 17,5 % angewachsen (Foto 17).

Die weitere Identifizierung der Mikroglia/Makrophagen erfolgte mit Dil-acLDL und Iba1. (Tabelle 7). Die Markierung mit Dil-ac-LDL beschränkte sich weitgehend auf das Soma. Die Fortsätze der Zellen zeigten nur eine schwache bis keine Farbreaktion. Mit dem gegen Iba1 gerichteten Antikörper war in der gleichen Zellpopulation eine positive Reaktion im Soma und an den Fortsätzen vorhanden. 24 Std nach Aussaat waren 93,5% (91,4-97,3%) der Zellen, 48 Std nach Aussaat 90,3% (88-93,3%), 96 Std nach Aussaat 82,5% (79-86,2%) der Zellen stark Dil-ac-LDL-positiv. Die übrigen Zellen waren flächige Zellen (interpretiert als Fibroblasten) und einzelne bipolare, O4 positive Zellen (Tabelle 8). Diese beiden Zellpopulationen zeigten keine positive Immunreaktion mit Dil-ac-LDL oder Iba1. Eine schwach-positive Immunreaktion mit Dil-ac-LDL und mit GFAP wurde in den gereinigten Kulturen nicht beobachtet. Die Markierung mit gegen Vimentin und p75<sup>NGFR</sup> gerichteten Antikörpern erfolgte in diesen Kulturen nicht.

#### 4.1.4.1 Nachweis der Phagozytose von magnetischen Partikeln (*beads*)

Neben der Expression der Scavengerrezeptoren und des ionisierten Kalzium-bindenden Adaptermoleküls Iba1 wurde zur weiteren Charakterisierung eine Prüfung der funktionellen Aktivität der Mikroglia über den Nachweis der Phagozytose durchgeführt.

Die Mikroglia/Makrophagen phagozytierten 24 Std nach der Aussaat magnetische Partikel (*dynabeads*). Bei der mikroskopischen Inspektion war die Internalisierung der Partikel nur sehr schlecht von oberflächlich anhaftenden *beads* zu unterscheiden, daher wurde sich auf eine qualitative Aussage beschränkt. In einigen Zellen konnte eine Internalisierung der leuchtenden Partikel eindeutig nachgewiesen werden. Diese aktivierten, phagozytierenden Zellen wiesen ein deutlich hypertrophes, abgerundetes Soma und stark verkürzte Fortsätze auf (Foto 18).

#### 4.1.5 Serumfreie Kulturen

Einige Kulturen von vier Tieren (Nr. 7, 9, 11, 12) wurden nach zwei Wochen Kultivierung für einige Wochen in serumfreiem Sato's Medium kultiviert (Tabelle 6).



Nach zwei bis drei Wochen unter serumfreien Bedingungen proliferierten, oberflächlich auf den fibroblastenähnlichen Zellen gelegen, zwei Zellpopulationen.

Eine Population wies ein morphologisch mäßig homogenes Erscheinungsbild auf und bestand aus 15-20 µm großen Zellen, meist bi- oder tripolar mit einem kleinen, runden Zellkern. Diese wuchsen zum Teil netzartig, auf den flächigen Zellen, aber auch mäßig adhärent direkt auf dem Flaschenboden. Die Fortsätze waren teilweise mehrere 100 µm lang (Foto 19). Der konfluente oberflächliche Zellrasen ließ sich durch Waschen mit eiskaltem PBS und eine ca. 2-5 minütige Inkubation in 0,05%igem Trypsin leicht ablösen, während die flächigen Zellen weiterhin an dem Flaschenboden hafteten. Nach dieser ersten Passage (Foto 20) war weiterhin eine deutliche Vermehrung der Zellen zu beobachten. Die Zellpopulation wurde auf die Expression von Gangliosid (A2B5), GFAP und p75<sup>NGFR</sup> untersucht.

Die **fluoreszenzmikroskopische Untersuchung** der beschriebenen Zellen ergab eine positive Immunreaktion mit dem niedrig-affinen Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor p75<sup>NGFR</sup> und A2B5 (Foto 21+22). Sie waren sehr vereinzelt nur GFAP positiv. Eine weitere Charakterisierung der Zellen erfolgte im Rahmen dieses Versuches nicht.

Andere Zellen proliferierten in Inseln auf den flächigen Zellen der Kulturen von Nr. 7, 11 und 12. Diese Zellen bildeten eine morphologisch heterogene Population. Einige wiesen lange, strahlenartige Fortsätze und einen rundovalen, chromatinarmen Zellkern auf, andere besaßen eine protoplasmatische Form. Diese Zellpopulation war ebenso wie die erste Zellpopulation leicht durch kurze Trypsinierung von den flächigen Zellen zu separieren. Die Morphologie variierte von einem fibroblastenähnlichen Zelltyp bis hin zu Zellen mit einer ramifizierten Form (Foto 23+24).

Aufgrund des phänotypisch Astrozyten-ähnlichen Erscheinungsbildes wurde in den Primärkulturen P1 eine Markierung mit GFAP durchgeführt. Die Zellen waren >90% GFAP-positiv, Vimentin-positiv und nur sehr vereinzelt A2B5-positiv. Die Zellen aller vier Tiere zeigten im weiteren Verlauf auch nach Zugabe von den Wachstumsfaktoren FGF-2 und CNTF keine Proliferation nach der ersten Passage.

## 4.2 MMP- und TIMP-Expression der nicht infizierten Kulturen, P1

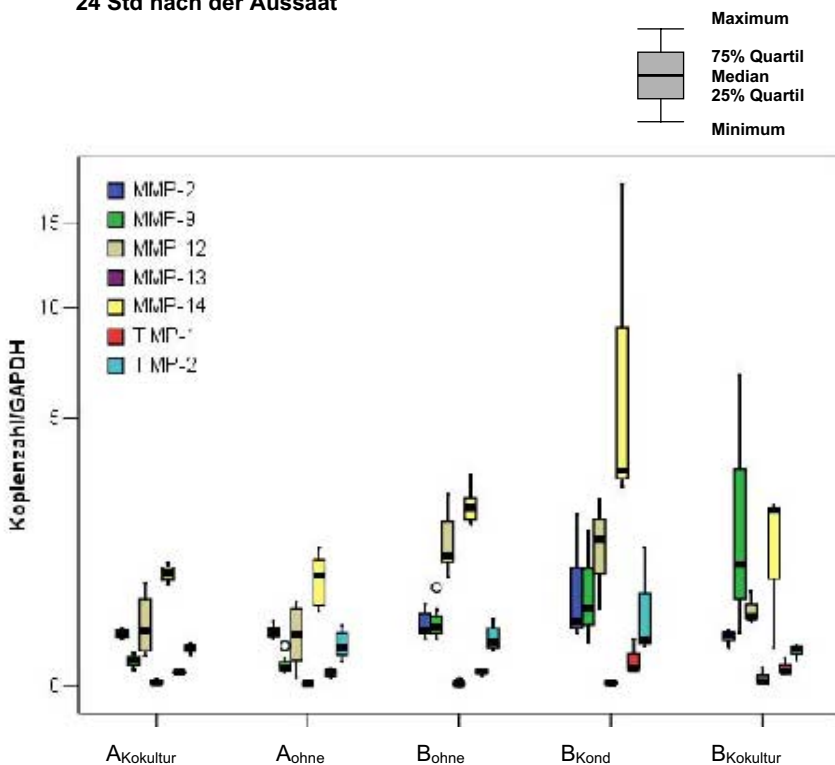
### 4.2.1 MMP- und TIMP-Expression auf mRNA-Ebene

Die MMP-Expression wurde zunächst in den fünf Gruppen 24 Std nach der Passage der Zellen untersucht. In 78 der 80 untersuchten Proben wurde eine Expression des *housekeeping gene's* GAPDH (siehe 4.2.1.8) nachgewiesen.

In diesen Proben konnte ebenfalls MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 und TIMP-2 nachgewiesen werden (Abb.8), wobei die Expression von MMP-13 und TIMP-1 in jeweils zwei Proben nicht nachweisbar war.

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird, war in allen Gruppen MMP-14 das höchst exprimierte Gen (Minimum-Maximum: 0,4-17 Kopien/1 Kopie GAPDH), während MMP-2 (0,07-2,06), MMP-12 (0,015-2,5) und TIMP-2 (0,015-1,35) eine mittlere Expression aufwiesen, gefolgt von TIMP-1 (0,005-0,05) und MMP-13 (0,0001-0,004). Die fünf Untergruppen werden ihrer Zellart entsprechend unter den beiden Gruppen A (Mischkulturen mit den Untergruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$ ) und B (Mikroglia/Makrophagenkulturen mit den Untergruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$ ) besprochen. Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der qPCR im Einzelnen dargestellt.

**Abb. 8. MMP- und TIMP-Expression in den Kulturen der Gruppen A und B  
24 Std nach der Aussaat**



MMP-14 ist in allen Gruppen das höchst exprimierte Gen, gefolgt von MMP-12 (ausgenommen Gruppe B<sub>Kokultur</sub>); die Kulturen der Gruppe A exprimieren mehr MMP-2 als MMP-9, während bei den Kulturen der Gruppe B die Expression von MMP-9 höher ist. Sehr niedrig exprimiert sind in allen Kulturen MMP-13 und TIMP-1.

**Gruppe A<sub>ohne</sub>:** Mischkulturen

**Gruppe A<sub>Kokultur</sub>:** Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellssystem)

**Gruppe B<sub>ohne</sub>:** Mikroglia/Makrophagen

**Gruppe B<sub>Kond</sub>:** Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium

**Gruppe B<sub>Kokultur</sub>:** Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>-

o Ausreißer

#### 4.2.1.1 Expression der MMP-2-mRNA

In 100% der untersuchten Proben mit GAPDH-Amplifikation wurde MMP-2-mRNA nachgewiesen. Die Kopienzahlen der MMP-2 sind im Folgenden auf eine Kopie GAPDH normalisiert.

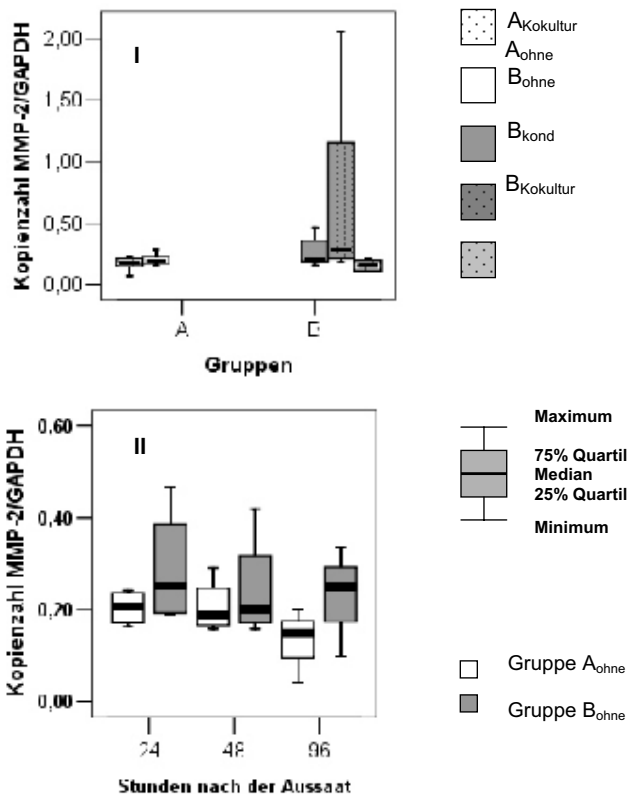
Die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$  wiesen 24 Std nach der Aussaat eine MMP-2-Expression von 0,2 Kopien (0,18-0,29 Kopien) bzw. 0,17 Kopien (0,07-0,21 Kopien) auf (Abb. 9 I). In der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  war 96 Std nach der Aussaat bei 75% der Präparationen ein Abfall der Expression zu beobachten (Abb. 9 II).

Die Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  exprimierten 0,28 Kopien (0,15-0,47 Kopien), 0,78 Kopien (0,18-2,06 Kopien) und 0,16 Kopien (0,12-0,21 Kopien, Abb. 9 I). Die MMP-2-Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant (Abb. 9 II).

Die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test ergab im Globalvergleich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der MMP-2-Expression ( $p=0,37$ ). Ein Mann-Whitney-U-Test zur Ermittlung der paarweisen Signifikanzen erübrigte sich daher.

Innerhalb der Gruppen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Kultur mittels Wilcoxon-Test ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt (Anhang 9.1.2.1).

**Abb. 9. Expression von MMP-2-mRNA in den fünf Gruppen 24 Std nach der Aussaat (I) und in den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat (II)**



I: MMP-2-Expression 24 Std nach der Aussaat der 1. Passage in den Gruppen A und B mit den verschiedenen Untergruppen, Extremwerte sind nicht berücksichtigt.

II: MMP-2-Expression mit 24, 48 und 96 Std nach Aussaat der 1. Passage, MMP-2 zeigt eine konstitutive Expression zu den verschiedenen Zeitpunkten in den Kulturen der Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub>. o Ausreißer

**Gruppe A<sub>ohne</sub>**: Mischkulturen; **Gruppe A<sub>Kokultur</sub>**: Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellsystem). **Gruppe B<sub>ohne</sub>**: Mikroglia/Makrophagen; **Gruppe B<sub>Kond</sub>**: Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium; **Gruppe B<sub>Kokultur</sub>**: Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>.

#### 4.2.1.2 Expression der MMP-9-mRNA

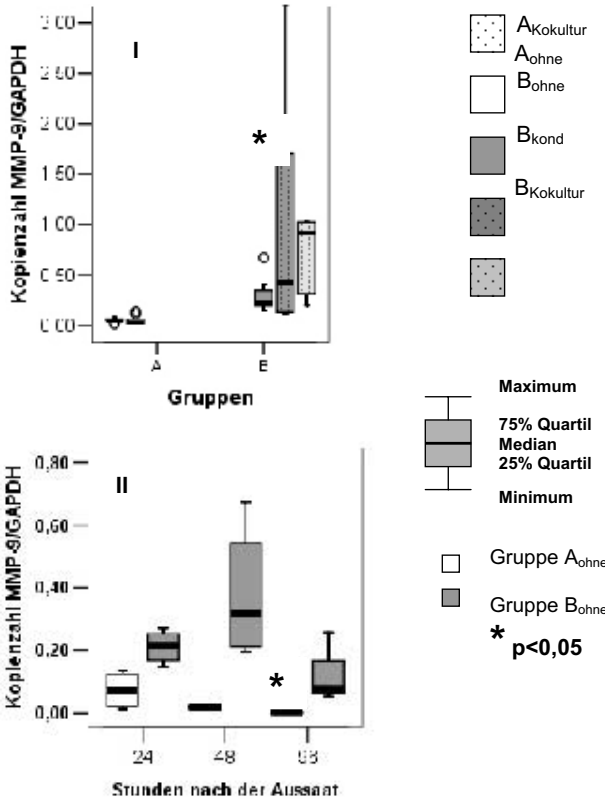
In 100% der untersuchten Proben mit GAPDH-Amplifikation wurde MMP-9-mRNA nachgewiesen. Die Kopienzahlen der MMP-9 sind im Folgenden auf eine Kopie GAPDH normalisiert.

Die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$  wiesen 24 Std nach der Aussaat eine MMP-9-Expression von 0,05 Kopien (0,01-0,12 Kopien) bzw. 0,049 Kopien (0,01-0,075 Kopien) auf (Abb.10 I). Die MMP-9-Expression der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  war 96 Std nach der Aussaat gegenüber der MMP-9-Expression 24 Std nach der Aussaat signifikant erhöht (Abb.10 II).

Die Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  exprimierten 0,3 Kopien (0,15 bis 0,67), 0,049 Kopien (0,01-0,075) und 0,6 Kopien (0,15 bis 1,7 Kopien; Abb.10 I). Die MMP-9-Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant (Abb.10 II).

Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab eine signifikant höhere Expression der Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  gegenüber der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  ( $p=0,042$ ,  $p=0,013$ ,  $p=0,001$ ) und der Gruppen  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  gegenüber der Gruppe  $A_{\text{Kokultur}}$  ( $p=0,013$  bzw.  $p=0,012$ , Abb. 10, I). Innerhalb der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  wurde 96 Std in Kultur gegenüber 24 Std in Kultur mittels Wilcoxon-Test ebenfalls ein signifikanter Unterschied ( $p=0,03$ ) festgestellt (Abb. 10 II, Anhang 9.1.2.2).

**Abb. 10. Expression von MMP-9-mRNA in den fünf Gruppen 24 Std nach der Aussaat (I) und in den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat (II)**



**I:** MMP-9-Expression 24 Std nach der Aussaat der 1. Passage in den Gruppen A und B mit den verschiedenen Untergruppen, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. MMP-9 war in den Kulturen der Gruppe B signifikant höher exprimiert als in den Kulturen der Gruppe A. **II:** MMP-9-Expression 24, 48 und 96 Std nach Aussaat der 1. Passage, MMP-9 war 96 Std in Kultur in der Gruppe A<sub>ohne</sub> signifikant niedriger exprimiert als 24 Std nach der Aussaat. o – Ausreißer.

**Gruppe A<sub>ohne</sub>:** Mischkulturen; **Gruppe A<sub>Kokultur</sub>:** Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellssystem); **Gruppe B<sub>ohne</sub>:** Mikroglia/Makrophagen; **Gruppe B<sub>kond</sub>:** Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium; **Gruppe B<sub>Kokultur</sub>:** Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>.

#### 4.2.1.3 Expression der MMP-12-mRNA

In 100% der untersuchten Proben mit GAPDH-Amplifikation wurde MMP-12-mRNA nachgewiesen. Die Kopienzahlen der MMP-12 sind im Folgenden auf eine Kopie GAPDH normalisiert.

Die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$  wiesen 24 Std nach der Aussaat eine MMP-9-Expression von 0,25 Kopien (0,04-0,39 Kopien) bzw. 0,17 Kopien (0,062-0,35 Kopien, Abb.11 I) auf.

Die MMP-12-Expression der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  war zu den Zeitpunkten 24 und 48 Std nach der Aussaat konstant. 96 Std nach der Aussaat reduzierte sich in 75% der Kulturen die Expression des MMP-12 gegenüber den Werten 24 und 48 Std nach Aussaat um 90%. In einer Kultur war jedoch 96 Std nach Aussaat eine vermehrte Expression auf 200% der vorangehenden Zeitpunkte zu beobachten (Abb.11 II).

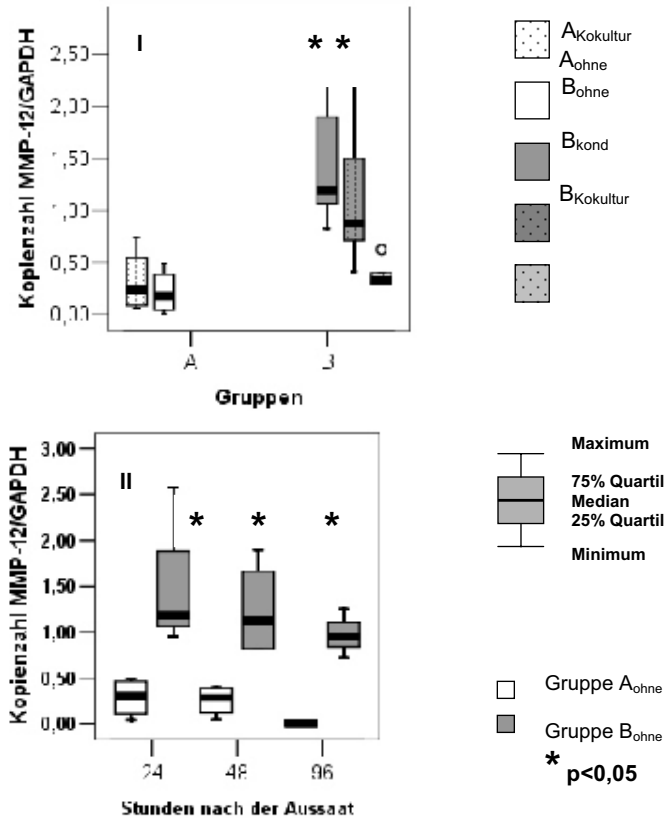
Die Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  exprimierten 1,24 Kopien (0,32-2,50 Kopien), 2,70 Kopien (0,15-9,16 Kopien) und 0,386 Kopien (0,284- 0,622 Kopien; Abb. 11 I). Die MMP-12-Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant (Abb. 11 II).

Die **statistische Auswertung** mittels Mann-Whitney-U-Test ergab für die Expression von MMP-12 signifikante Unterschiede: Die Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  wies gegenüber den Gruppen  $B_{\text{Kokultur}}$  ( $p=0,006$ ),  $A_{\text{ohne}}$  ( $p=0,001$ ), und  $A_{\text{Kokultur}}$  ( $p=0,012$ ) eine signifikant höhere MMP-12-Expression auf. Die Gruppe  $B_{\text{Kond}}$  exprimierte signifikant mehr MMP-12 als die Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  ( $p=0,033$ ). Die Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war gegenüber der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat statistisch hoch signifikant ( $p=0,001$ ) erhöht.

Innerhalb der Gruppen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Kultur mittels Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied festgestellt (Anhang 9.1.2.3).



**Abb. 11. Expression von MMP-12-mRNA in den fünf Gruppen 24 Std nach der Aussaat (I) und in den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat (II)**



**I:** MMP-12-Expression 24 Std nach der Aussaat der 1. Passage in den Gruppen A und B mit den verschiedenen Untergruppen, Extremwerte sind nicht berücksichtigt. MMP-9 war in den Kulturen der Gruppe B signifikant höher exprimiert als in den Kulturen der Gruppe A

**II:** MMP-12-Expression 24, 48 und 96 Std nach Aussaat der 1. Passage. MMP-12 war 24, 48 und 96 Std in Kultur in der Gruppe B<sub>ohne</sub> signifikant höher exprimiert als in der Gruppe A<sub>ohne</sub>-O-Ausreißer.

**Gruppe A<sub>ohne</sub>:** Mischkulturen; **Gruppe A<sub>Kokultur</sub>:** Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellsystem); **Gruppe B<sub>ohne</sub>:** Mikroglia/Makrophagen; **Gruppe B<sub>kond</sub>:** Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium; **Gruppe B<sub>Kokultur</sub>:** Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>;

#### 4.2.1.4 Expression der MMP-13-mRNA

In 83,25% der untersuchten Proben mit GAPDH-Amplifikation wurde MMP-13-mRNA nachgewiesen. MMP-13 wurde in allen Kulturen sehr niedrig exprimiert. Die Kopienzahlen der MMP-13 sind im Folgenden auf eine Kopie GAPDH normalisiert.

Die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$  wiesen 24 Std nach der Aussaat eine MMP-13-Expression von 0,0004 Kopien (0,0001-0-0,001) bzw. 0,001 Kopien (0,0002-0,004 Kopien, Abb.12 I) auf. In der Gruppe  $A_{\text{Kokultur}}$  konnte in einer Probe keine MMP-13-Expression nachgewiesen werden.

Die MMP-13-Expression der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  war zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant sehr niedrig (Abb.12 II).

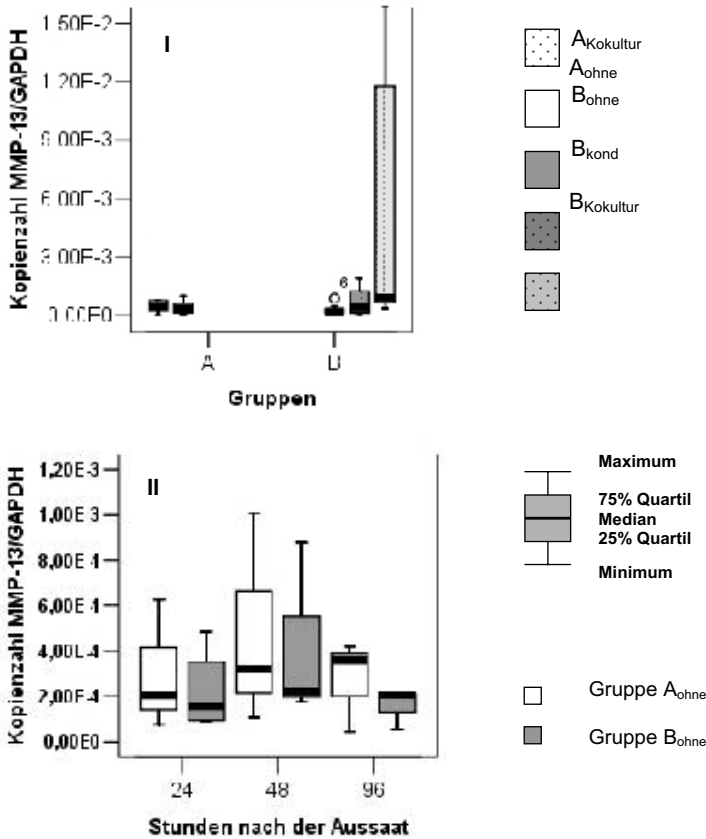
Die Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  exprimierten 0,0003 Kopien (0,0001-0,0009 Kopien), 0,0008 Kopien (0,0004-0,0022 Kopien), bzw. 0,00098 Kopien (0,0003-0,0019 Kopien, Abb. 12 I). In der Gruppe  $B_{\text{Kokultur}}$  konnte in zwei Proben keine MMP-13-Expression nachgewiesen werden.

Die MMP-13-Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant sehr niedrig (Abb. 12 II).

Die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test ergab im Globalvergleich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der MMP-13-Expression ( $p=0,580$ ). Ein Mann-Whitney-U-Test zur Ermittlung der paarweisen Signifikanzen erübrigte sich daher.

Innerhalb der Gruppen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Kultur mittels Wilcoxon-Test ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt (Anhang 9.1.2.4).

**Abb. 12. Expression von MMP-13-mRNA in den fünf Gruppen 24 Std nach der Aussaat (I) und in den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat (II)**



I: MMP-13-Expression 24 Std nach der Aussaat der 1. Passage in den Gruppen A und B mit den verschiedenen Untergruppen, Extremwerte sind nicht berücksichtigt worden, MMP-13 war in den Kulturen sehr niedrig exprimiert.

II: MMP-13-Expression 24, 48 und 96 Std nach Aussaat der 1. Passage.  
 ○ –Ausreißer.

**Gruppe A<sub>ohne</sub>:** Mischkulturen **Gruppe A<sub>Kokultur</sub>:** Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellssystem) **Gruppe B<sub>ohne</sub>:** Mikroglia/Makrophagen **Gruppe B<sub>kond</sub>:** Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium

**Gruppe B<sub>Kokultur</sub>:** Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>.

#### 4.2.1.5 Expression der MMP-14-mRNA

In 100% der untersuchten Proben mit GAPDH-Amplifikation wurde MMP-14-mRNA nachgewiesen. Die Kopienzahlen der MMP-14 sind im Folgenden auf eine Kopie GAPDH normalisiert.

Die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$  wiesen 24 Std nach der Aussaat eine MMP-14-Expression von 0,99 Kopien (0,44-2,3 Kopien) bzw. 0,77 Kopien (0,33- 1,04 Kopien) auf (Abb. 13 I).

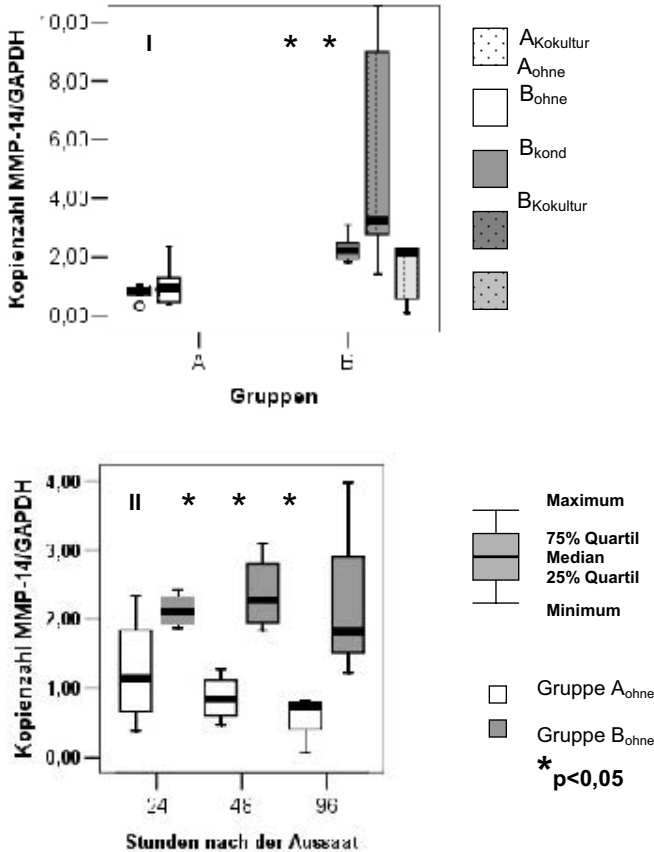
Die MMP-14-Expression der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  war zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat nicht immer konstant und zeigte zwischen den einzelnen Tieren sehr unterschiedlich hohe Werte (Abb.13 II).

Die Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  exprimierten 2,27 Kopien (1,8-3,2 Kopien), 3,45 Kopien (0,1-12 Kopien), 6,70 Kopien (1,4-17 Kopien, Abb.13 I).

Die MMP-14-Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant hoch (Abb.13 II).

Die **statistische Auswertung** ergab mittels Mann-Whitney-U-Test für die Expression von MMP-14 im Vergleich der Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ , und  $B_{\text{kond}}$  gegenüber den Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$  signifikante Unterschiede: Die Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  exprimierte 24 Std in Kultur signifikant mehr MMP-14 als die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  ( $p=0,004$ ) und  $A_{\text{Kokultur}}$  ( $p=0,006$ ) (Abb. 13 I). Die Gruppe  $B_{\text{kond}}$  exprimierte ebenfalls signifikant mehr als die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  ( $p=0,012$ ) und  $A_{\text{Kokultur}}$  ( $p=0,015$ ). Die Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war gegenüber der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat statistisch signifikant ( $p=0,004$ ,  $0,001$  bzw.  $0,001$ ) erhöht. Innerhalb der Gruppen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Kultur mittels Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied festgestellt (Anhang 9.1.2.5).

**Abb. 13. Expression von MMP-14-mRNA in den fünf Gruppen 24 Std nach der Aussaat (I) und in den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat (II)**



**I:** MMP-14-Expression 24 Std nach der Aussaat der 1. Passage in den Gruppen A und B mit den verschiedenen Untergruppen, Extremwerte sind nicht berücksichtigt worden. MMP-14 war in den Kulturen der Gruppe B<sub>ohne</sub> und B<sub>Kond</sub> signifikant höher exprimiert als in den Kulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub> und A<sub>Kokultur</sub>.

**II:** MMP-14-Expression 24, 48 und 96 Std nach Aussaat der 1. Passage, ○ –Ausreißer.

**Gruppe A<sub>ohne</sub>:** Mischkulturen **Gruppe A<sub>Kokultur</sub>:** Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellssystem) **Gruppe B<sub>ohne</sub>:** Mikroglia/Makrophagen

**Gruppe B<sub>Kond</sub>:** Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium

**Gruppe B<sub>Kokultur</sub>:** Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>.

#### 4.2.1.6 Expression der TIMP-1-mRNA

In 93,5% der untersuchten Proben mit GAPDH-Amplifikation wurde TIMP-1-mRNA nachgewiesen. Die Kopienzahlen des TIMP-1 sind im Folgenden auf eine Kopie GAPDH normalisiert.

Die Gruppen A<sub>ohne</sub> und A<sub>Kokultur</sub> wiesen 24 Std nach der Aussaat beide eine TIMP-1-Expression von 0,012 Kopien auf (0,005-0,052 bzw. 0,006-0,023, Abb. 14 I).

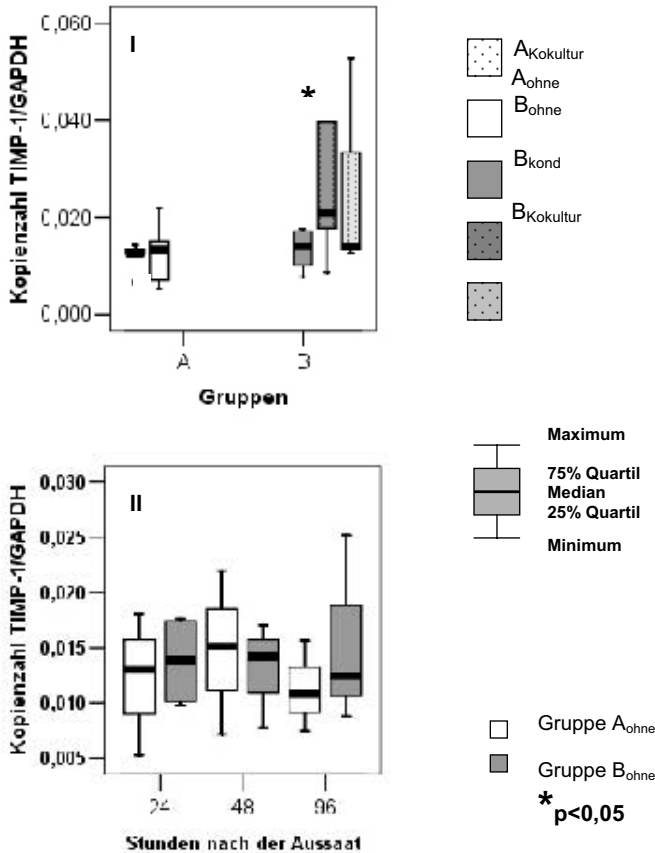
Die TIMP1-Expression der Gruppe A<sub>ohne</sub> war zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant (Abb. 14 II).

Die Gruppen B<sub>ohne</sub>, B<sub>kond</sub> und B<sub>Kokultur</sub> exprimierten 0,012 Kopien (0,0078-0,017 Kopien), 0,041 Kopien (0,01-0,05 Kopien), bzw. 0,02 Kopien (0,01-0,05 Kopien, Abb. 14 I).

Die TIMP-1-Expression der Gruppe B<sub>ohne</sub> war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant (Abb. 14 II).

Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab signifikante Unterschiede in der TIMP-1-Expression zwischen den Gruppen B<sub>ohne</sub> und B<sub>Kond</sub> ( $p=0,048$ ). Innerhalb der Gruppen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Kultur mittels Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied festgestellt (Anhang 9.2.1.6).

**Abb. 14. Expression vonTIMP-1-mRNA in den fünf Gruppen 24 Std nach der Aussaat (I) und in den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat (II)**



I: TIMP-1-Expression 24 Std nach der Aussaat in den Gruppen A und B mit den verschiedenen Untergruppen, Extremwerte sind nicht berücksichtigt worden.

II: TIMP-1-Expression 24, 48 und 96 Std nach Aussaat der 1. Passage, TIMP-1 war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat gleichmäßig exprimiert. o –Ausreißer.

**Gruppe A<sub>ohne</sub>:** Mischkulturen **Gruppe A<sub>Kokultur</sub>:** Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellssystem) **Gruppe B<sub>ohne</sub>:** Mikroglia/Makrophagen **Gruppe B<sub>kond</sub>:** Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium

**Gruppe B<sub>Kokultur</sub>:** Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>.

#### 4.2.1.7 Expression der TIMP-2-mRNA

In 100% der untersuchten Proben mit GAPDH-Amplifikation wurde TIMP-2-mRNA nachgewiesen. Die Kopienzahlen des TIMP-2 sind im Folgenden auf eine Kopie GAPDH normalisiert.

Die Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $A_{\text{Kokultur}}$  wiesen 24 Std nach der Aussaat eine TIMP-2-mRNA-Expression von 0,14 Kopien (0,055-0,25 Kopien) bzw. 0,08 Kopien (0,014-0,12 Kopien) auf (Abb. 15 I).

Die TIMP-2-Expression der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  zeigte einen Anstieg 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat. 48 Std nach der Aussaat betrug sie das 1,25fache bis 10fache der Expression von 24 Std nach der Aussaat. (Abb. 15 II).

Die Gruppen  $B_{\text{ohne}}$ ,  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{Kokultur}}$  exprimierten 0,170 Kopien (0,08 bis 0,3 Kopien) 0,07 Kopien (0,04 bis 0,11 Kopien) und 0,350 Kopien (0,04-1,35, Abb.15 I).

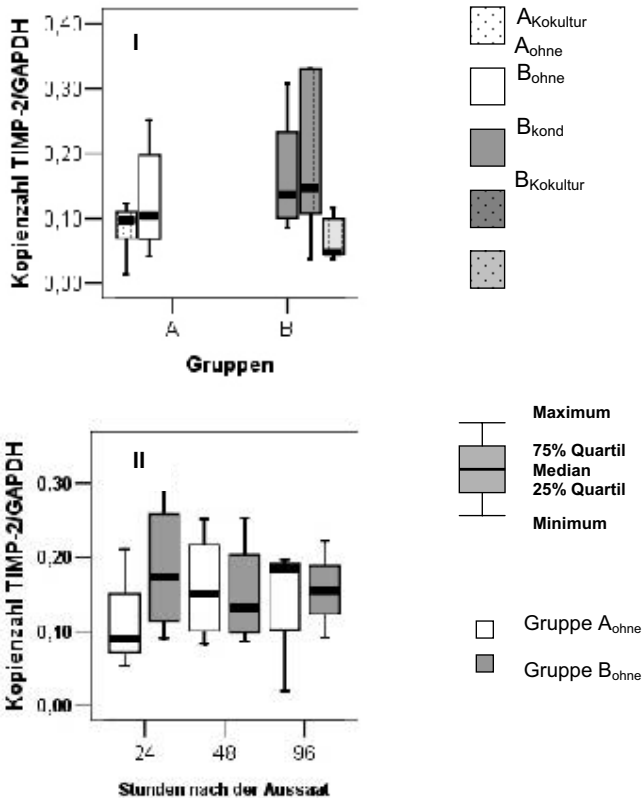
Die TIMP-2-Expression der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  war 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat konstant (Abb.15 II).

Die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test ergab im Globalvergleich zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der TIMP-2-Expression ( $p=0,48$ ). Ein Mann-Whitney-U-Test zur Ermittlung der paarweisen Signifikanzen erübrigte sich daher.

Innerhalb der Gruppen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten in der Kultur mittels Wilcoxon-Test ebenfalls kein signifikanter Unterschied festgestellt (Anhang 9.2.1.7).



**Abb. 15. Expression von TIMP-2-mRNA in den fünf Gruppen 24 Std nach der Aussaat (I) und in den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat (II)**



**I:** TIMP-2-Expression 24 Std nach der Aussaat der 1. Passage in den Gruppen A und B mit den verschiedenen Untergruppen, Extremwerte sind nicht berücksichtigt worden,  
**II:** TIMP-2-Expression 24, 48 und 96 Std nach Aussaat der 1. Passage. TIMP-2-mRNA war gleichmäßig exprimiert.

**Gruppe A<sub>ohne</sub>:** Mischkulturen

**Gruppe A<sub>Kokultur</sub>:** Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen; in Kokultur mit Mikroglia/Makrophagen (Transwellsystem)

**Gruppe B<sub>ohne</sub>:** Mikroglia/Makrophagen

**Gruppe B<sub>Kond</sub>:** Mikroglia/Makrophagen mit präkonditioniertem Medium

**Gruppe B<sub>Kokultur</sub>:** Mikroglia/Makrophagen in Kokultur mit Gruppe A<sub>Kokultur</sub>.

#### 4.2.1.8 Expression der GAPDH

Die verschiedenen Gruppen wiesen mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede in der Amplifikation der GAPDH auf ( $p=0,580$ ). Insbesondere war kein Unterschied zwischen der Expression der infizierten Kulturen und der Kontrollkulturen innerhalb einer Gruppe vorhanden. Die Negativkontrollen (NTC) bestehend aus Mastermix und DEPC-Wasser, wiesen keine GAPDH-Amplifikation auf.

#### 4.2.2 Nachweis der proteolytischen Aktivität

Neben dem Nachweis der MMP-Expression auf Transkriptionsebene wurde zusätzlich die proteolytische Aktivität der Gelatinasen, MMP-2 und MMP-9, und der Kollagenase, MMP-12, sowie einer nicht identifizierten Kollagenase mit einem Molekulargewicht von 55-60 kDa erbracht. Simultan zu den Versuchsansätzen wurden Gele in EDTA-haltigem Entwicklungspuffer inkubiert (siehe 3.9.3). In diesen Gelen entstanden keine Proteolysebanden.

##### 4.2.2.1 Ergebnisse der Etablierung

In Etablierungsversuchen wurden kanine Kulturen der Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{ohne}}$  (Tiernr. 1-4) auf ihre gelatinolytische Aktivität untersucht. Die Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  zeigte vorwiegend eine Expression auf der Höhe von pro-MMP-9 (90 kDa), leicht unterhalb des humanen Standards von pro-MMP-9 bei 92 kDa. Die Kulturen der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  wiesen unterschiedliche proteolytische Aktivitäten von pro-MMP-9 und eine dominierende Aktivität von pro-MMP-2 (68 kDa) auf (Foto 25). Aktive Formen von beiden MMPs wurden in diesen nicht infizierten Kulturen nicht detektiert.

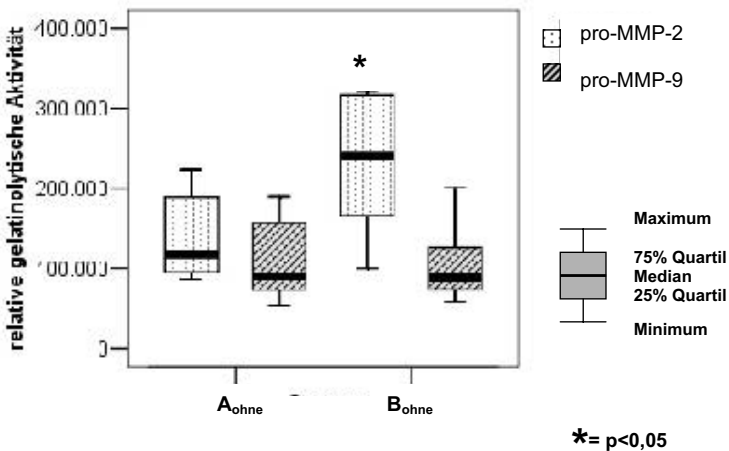
##### 4.2.2.2 Nachweis der Gelatinolyse von pro-MMP-2 und pro-MMP-9

Alle untersuchten Kulturen der **Gruppen  $A_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{ohne}}$**  wiesen zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat eine gelatinolytische Aktivität bei ca. 68 kDa auf. Diese Bande lag auf gleicher Höhe mit der Bande der Proenzymform des humanen Standards und wurde als pro-MMP-2 interpretiert.

Alle untersuchten Kontrollkulturen der **Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub>** wiesen zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat eine gelatinolytische Aktivität bei 90 kDa auf, diese lag auf gleicher Höhe wie die gelatinolytische Bande der DH82 Zellen und wurde als pro-MMP-9 interpretiert.

Die **statistische Auswertung** ergab mittels Mann-Whitney-U-Test eine signifikant höhere gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 der Kulturen der Gruppe B<sub>ohne</sub> gegenüber den Kulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub>  $p = 0,012$ . Zwischen den beiden Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede in der MMP-2-Expression ( $p = 0,916$ ).

**Abb. 16. Gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 und pro-MMP-9 in Mischkulturen (Gruppe A<sub>ohne</sub>) und Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B<sub>ohne</sub>) 24 Std nach der Aussaat**



**Gruppe A<sub>ohne</sub>**: Mischkulturen mit Mikroglia/Makrophagen;

**Gruppe B<sub>ohne</sub>**: Mikroglia/Makrophagen;

Dargestellt ist das relative Dichtevolumen der Gelatinolyse-Banden der MMPs im Zellkulturüberstand 24 Std nach der Aussaat. Die Kulturen der Gruppe B<sub>ohne</sub> wies eine signifikant höhere gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 auf, als die Kulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub>. Die Werte stellen die Daten der Dreifachansätze von vier Tiernummern dar. Um experimentelle Schwankungen zu minimieren, wurden die Überstände der beiden Gruppen (jeweils 6000 Zellen/Geltasche) einer Tiernummer zusammen auf einem Gel aufgetragen.

#### **4.2.2.3 Nachweis der Kaseinolyse von pro-MMP-9**

In der Kaseinzymographie waren verschiedene Proteolyseareale zu erkennen. Aufgrund der Heterogenität von Bandenbreite und Intensität wurde auf eine densitometrische Auswertung der Kaseinolyse verzichtet. Ein weiteres Problem, das die Auswertung der Kaseinzymographie erschwerte, stellte die inhomogene Verteilung des Kaseins im Gel dar. Als Positivkontrolle der Kaseinzymographie dienten persistent mit einem Onderstepoortstamm infizierte DH82 Zellen. Sie wiesen regelmäßig eine Kaseinolyse bei 90 kDa auf.

Bei 90 kDa wiesen die Kulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub> und der Gruppe B<sub>ohne</sub> regelmäßig undeutlich begrenzte Proteolysebanden von schwacher Intensität auf. Diese waren 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat vorhanden und wurden aufgrund ihres Molekulargewichtes als kaseinolytische Aktivität von pro-MMP-9 interpretiert.

#### **4.2.2.4 Nachweis der Kaseinolyse bei 25-50 kDa (interpretiert als pro-/intermediäre und aktive Formen von MMP-12)**

Die persistent mit dem Onderstepoort-Stamm infizierten DH82-Zellen wiesen konstitutiv eine Proteolyse zwischen 45 und 50 kDa, interpretiert als pro/intermediäre Form von MMP-12, auf.

Die Kulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub> wiesen 24 und 48 Std nach der Aussaat zu 50% eine Kaseinolyse zwischen 25 und 45 kDa auf, während nach 96 Std keine proteolytische Aktivität in diesen Bereichen zu detektieren war.

Die Kulturen der Gruppe B<sub>ohne</sub> wiesen 24, 48 und 96 Std nach der Aussaat zu 50% eine Kaseinolyse zwischen 25 und 45 kDa auf.

Diese Proteolyseareale wurden aufgrund ihrer Substratspezifität und ihres Molekulargewichts zum einen als intermediäre (30-45 kDa) zum anderen als aktive Formen (25kDa) der auch Makrophagenelastase genannten MMP-12 interpretiert.

#### **4.2.2.5 Kaseinolyse 55-60 kDa (pro-MMP-3 oder pro- MMP-13)**

50% der Kulturen der Gruppe B<sub>ohne</sub> wiesen 48 Std nach der Aussaat eine kaseinolytische Aktivität zwischen 55 und 60 kDa auf. Weitere kaseinolytische Aktivitäten der Kontrollkulturen wurden bei 55-60 kDa nicht detektiert. Aufgrund des Molekulargewichtes kann es sich bei diesen Kasein umsetzenden MMPs insbesondere um MMP-3 oder MMP-13 handeln. Zur Differenzierung von anderen

Proteasen wurden Gele in Simultanansätzen in EDTA-haltigem Puffer inkubiert und der Nachweis erbracht, dass die Aktivität dieser Enzyme ebenfalls kalziumabhängig war.

#### 4.2.3 Nachweis der Proteine mittels Western-Blot

Der Western-Blot diente der Identifizierung der MMPs auf Proteinebene. Dazu wurden die Zellkulturüberstände mit einer nachgewiesenen Gelatinolyse bzw. Kaseinolyse in Stichproben im Western-Blot untersucht. Insbesondere war der Nachweis von MMP-3, MMP-12 und MMP-13 zur Identifikation der verschiedenen Banden in der Kaseinzymographie wichtig.

**Nachweis von MMP-2:** Die untersuchte Zelllinie DH82 (nicht infiziert und persistent mit Ond infiziert) und die Proben der Gehirnzellkulturen (Mikroglia/Makrophagen-Kulturen) wiesen eine Immunpräzipitation in Form einer Bande bei 64 kDa auf und wurde als pro-MMP-2 interpretiert. Neben dieser Bande war eine weitere Immunpräzipitation von 50 kDa zu finden.

**Nachweis von MMP-3:** Die Zelllinie DH82 und DH82-Ond wiesen ebenso wie die untersuchten Gehirnzellkulturen (Mikroglia/Makrophagen-Kulturen) bei 57 und 59 kDa Immunpräzipitationen auf.

**Nachweis von MMP-9:** Die Immunpräzipitation erfolgte bei der Zelllinie DH82 bei 92 kDa und wurde als Proenzym interpretiert.

**Nachweis von MMP-12:** Bei der persistent infizierten Zelllinie DH82-Ond lagen bei 54 kDa (interpretiert als Proenzym), 45 kDa (interpretiert als intermediäre Form), und 30 kDa (aktive Form) Immunpräzipitationsprodukte vor. Bei der Zelllinie DH82 wurde eine Bande bei 54 kDa nachgewiesen (interpretiert als Proenzym). Die untersuchten Gehirnzellen (Mikroglia/Makrophagen-Kulturen) wiesen Banden auf Höhe der intermediären Form und der Proenzyme auf.

**Nachweis von MMP-13:** Bei 60 kDa wurde eine Immunpräzipitation der Zellkulturüberstände der nicht infiziert und persistent infizierten DH82 Kulturen und der Gehirnzellen (Mikroglia/Makrophagen-Kulturen) nachgewiesen.

Im Western-Blot wurden in Zellkulturüberständen der Gehirnzellen und der infizierten und nicht infizierten DH82-Zellen die Proteine pro-MMP-2, MMP-3, MMP-12 und MMP-13 nachgewiesen. MMP-9 wurde in der Zelllinie DH82 nachgewiesen, die Untersuchung der Zellkulturüberstände der Gehirnzellen auf eine MMP-9-Expression

erfolgte nicht. Im Western-Blot wurden sowohl MMP-3 als auch MMP-13 nachgewiesen, eine eindeutige Identifizierung der kaseinolytischen Aktivität konnte daher nicht erfolgen. MMP-12 wurde im Western-Blot, ähnlich wie in der Zymographie in verschiedenen Aktivitätsformen nachgewiesen.

Die nachgewiesenen Proteasen wiesen in Zymographie und Western-Blot Unterschiede im Molekulargewicht auf. Dies lässt sich auf die unterschiedlichen Strukturen der Proteine bei den verschiedenen Methoden zurückführen. Bei der Zymographie liegen die MMPs in denaturierter Form vor, während die Enzyme im Western-Blot reduziert werden.

### 4.3 Virusinfektion der Zellkulturen

Die Hauptversuche zur Bestimmung der MMPs und TIMPs nach Infektion wurden mit den Gruppen A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub> durchgeführt und nach Infektion als A<sub>Virus</sub> und B<sub>Virus</sub> benannt. Zunächst werden die Ergebnisse der Virusvermehrung und Bestimmung der TCID<sub>50</sub> in Verozellen beschrieben (4.3.1). Nach den Vorversuchen (4.3.2) werden der Zelltropismus und zytopathogene Effekt in den Gehirnzellkulturen beschrieben (4.3.3, 4.3.4, 4.3.5), bevor auf die MMP- und TIMP-Expression nach der Infektion eingegangen wird.

Unter 4.3.6.1 und 4.3.6.2 werden zunächst von der Staupevirusinfektion beeinflusste MMPs dargestellt, bevor abschließend die nach Infektion konstitutiv exprimierten MMPs beschrieben werden (4.3.6.3).

#### 4.3.1 Virusvermehrung und Virustitration in Verozellen

Die Vermehrung des Virus wurde in Verozellen durchgeführt (siehe 3.6.1). 24 Std p.i. waren erste Synzytien zu beobachten, diese waren drei Tage p.i. deutlich ausgeprägt (Foto 26). Die infizierten Zellen exprimierten das GFP (Foto 27+28). Einige der positiven Zellen zeigten eine Karyomegalie und –hyperchromasie. 24 Std p.i. exprimierten ca. 20% der Zellen das GFP, 68 Std p.i. waren nahezu 100% der Zellen infiziert, es hatten sich zahlreiche Synzytien gebildet (Foto 27). In einigen Bereichen war eine beginnende Lyse der Zellen zu beobachten. Das Virus wurde zu diesem Zeitpunkt geerntet, portioniert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Mittels Virustitration wurde eine TCID<sub>50</sub> von 10<sup>4,5</sup>/100µl bzw. 10<sup>4,25</sup>/100µl ermittelt.

### 4.3.2 Vorversuche

Vorversuche zur Bestimmung der geeigneten Zeitpunkte der Probennahme wurden von zwei Präparationen (Nr. 4+5) zu den drei Zeitpunkten 24, 72 und 120 Std p.i. durchgeführt. In den Mischkulturen wurde eine veränderte gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 und von pro-MMP-9 24 Std p.i. detektiert. Aufgrund der beschränkten Zellausbeute der Primärkulturen der ersten Passage (Tabelle 5) musste die Probennahme auf zwei Zeitpunkte p.i. beschränkt werden. Es wurden die Zeitpunkte 24 und 72 Std p.i. gewählt.

### 4.3.3 Infizierte Mischkulturen (Gruppe A<sub>Virus</sub>)

In allen infizierten Mischkulturen war 24 und 72 Std p.i. **CDV-mRNA** nachweisbar, während in den Kontrollkulturen keine Expression detektierbar war (Abb. 17).

Die infizierten Kulturen der **Gruppe A<sub>Virus</sub>** exprimierten 24 Std p.i. 0,26 Kopien (0,2-0,3 Kopien) und 72 Std p.i. 0,6 Kopien (0,2-3,1 Kopien).

Bei **fluoreszenzmikroskopischer** Betrachtung waren 24 Std p.i. 1,8% (1,70%-3,60%) der Mischkulturen **Ond-GFP** positiv (Abb. 18).

Die Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt keine Veränderungen in der Morphologie auf. 72 Std p.i. erhöhte sich der Prozentsatz auf 15,5% (15,2%- 29%) der Gesamtzellzahl (Foto 29).

Die infizierten Zellen wiesen zum größten Teil eine flächige Morphologie auf und waren Vimentin-positiv. Unter den GFP-exprimierenden Zellen fanden sich sehr vereinzelt auch GFAP- (Foto 30+31) und A2B5 positive-Zellen (<1% der Ond-GFP exprimierenden Zellen). In den GFAP-positiven Zellen konnte mittels Doppelmarkierung in Bereichen Ond-GFP-positiver Einschlüsse eine Minderung der GFAP-Expression beobachtet werden (Foto 30+31). Einzelne Mikroglia/Makrophagen waren ebenfalls infiziert (<0,5% der Ond-GFP positiven Zellen, 2 % der Mikroglia/Makrophagen in den Mischkulturen, Foto 32+33). Wenige infizierte Zellen rundeten sich 72 Std p.i. ab, und wiesen Varikositäten an Soma und Fortsätzen auf. Nach 72 Std p.i. fanden sich vereinzelte Synzytien (Foto 34).

#### 4.3.4 Infizierte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B<sub>Virus</sub>)

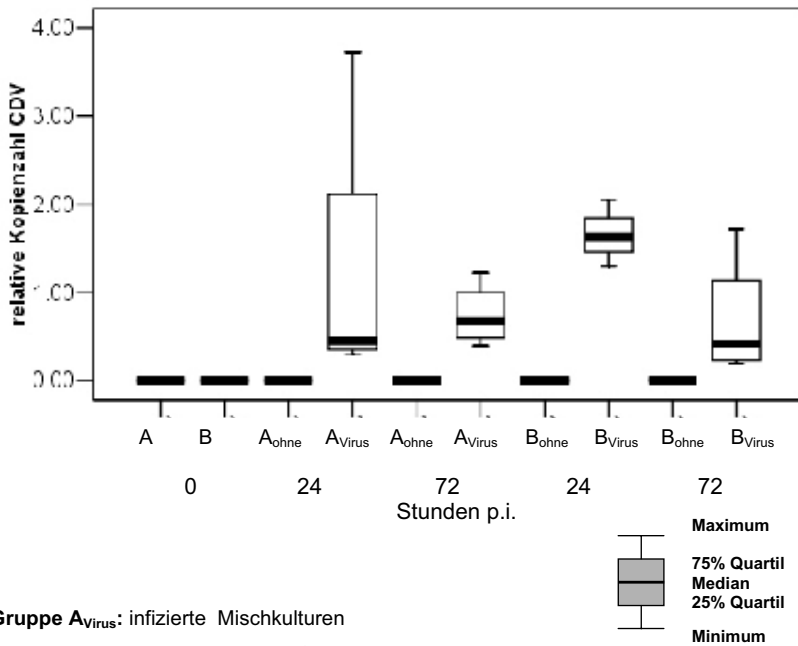
In allen infizierten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen war 24 und 72 Std p.i. **CDV-mRNA** nachweisbar, während in den Kontrollkulturen keine Expression detektierbar war (Abb.17).

Die infizierten Kulturen der **Gruppe B<sub>Virus</sub>** wiesen 24 Std p.i. eine Expression von 1,4 Kopien (0,80- 5,50 Kopien) auf. 72 Std p.i. betrug die Expression 0,66 Kopien (0,60-0,80 Kopien).

Bei **fluoreszenzmikroskopischer** Betrachtung 24 Std p.i. waren 0,17% (0,1-0,2%) der Mikroglia/Makrophagen OND-GFP-positiv. 72 Std p.i. war die Zahl der positiven Zellen auf 1,1% angestiegen (0,3-1,5%). Die Zellen waren amöboid und wiesen auffällig lange und bewegliche haarähnliche Fortsätze auf (Foto 35). Ein CPE wurde bis 72 Std p.i. nicht beobachtet.



Abb. 17. CDV-mRNA-Expression in Kontrollkulturen und infizierten Kulturen

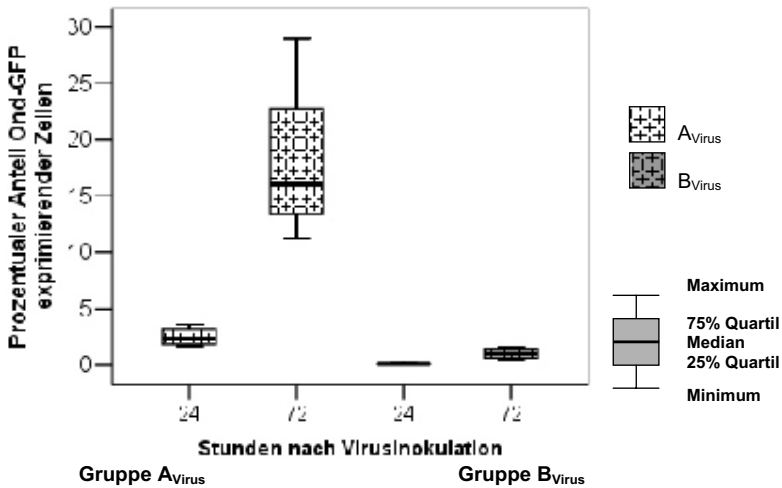


**Gruppe A<sub>Virus</sub>:** infizierte Mischkulturen

**Gruppe B<sub>Virus</sub>:** infizierte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen

Die infizierten Kulturen der Gruppe A wiesen 24 und 72 Std nach der Virusinokulation deutlich mehr Ond-GFP exprimierende Zellen auf, als die infizierten Kulturen der Gruppe B

**Abb. 18. Prozentsatz Ond-GFP-positiver Zellen in den Gruppen A<sub>Virus</sub> und B<sub>Virus</sub>**



**Gruppe A<sub>Virus</sub>:** infizierte Mischkulturen

**Gruppe B<sub>Virus</sub>:** infizierte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen

Die infizierten Kulturen der Gruppe A wiesen 24 und 72 Std nach der Virusinokulation deutlich mehr Ond-GFP exprimierende Zellen auf, als die infizierten Kulturen der Gruppe B.

#### 4.3.5 Infizierte p75<sup>NGFR</sup>-positive Zellen

Die p75<sup>NGFR</sup>/A2B5-positiven Zellen der serumfreien Kulturen wurden nach der 1. Passage ebenfalls mit Virus inokuliert. 12 Std p.i. exprimierten einzelne über die Kultur verteilte Zellen Ond-GFP. Es kam zu einer raschen Ausbreitung der Infektion und nach 6 Tagen waren >70% der p75<sup>NGFR</sup>-positiven Zellen der Mischkulturen in den Flaschen infiziert. Der CPE zeigte sich vorwiegend als Einzelzelldegeneration. Die Fortsätze wiesen an ihren Enden Varikositäten auf und retrahierten sich. Die Zellen waren nur schwach adhären und lösten sich vom Flaschenboden ab (Foto 36+37). Synzytien mit mehrkernigen Zellen wie bei den Vimentin-positiven Zellen der Mischkulturen A<sub>Virus</sub> wurden nicht beobachtet.

#### 4.3.6 Expression der MMPs und TIMPs in den infizierten Gruppen A<sub>Virus</sub> und B<sub>Virus</sub>

Das Ziel dieser Studie war, den frühen Einfluß der Staupevirusinfektion *in vitro* zu untersuchen. Daher wurde 24 und 72 Std p.i. die MMP-Expression der Mischkulturen (Gruppe A<sub>Virus</sub>) und Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B<sub>Virus</sub>) mit den jeweiligen Kontrollkulturen (A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub>) verglichen.

In den Kulturen der Gruppe A gab es zwischen Kontrollen und infizierten Kulturen signifikante Unterschiede in der MMP-Expression, während es in den Kulturen der Gruppe B keine signifikanten Expressions- und Aktivitätsunterschiede gab.

Auf mRNA-Ebene erfolgte in den Mischkulturen der Gruppe A<sub>Virus</sub> eine signifikante Aufregulierung von MMP-9 und MMP-13, sowie eine in allen Kulturen der Gruppe A<sub>Virus</sub> erhöhte MMP-2 und TIMP-1-Expression. Auf Proteinebene wies die Gruppe A<sub>Virus</sub> eine gesteigerte gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2, aktivem MMP-2 und pro-MMP-9 auf.

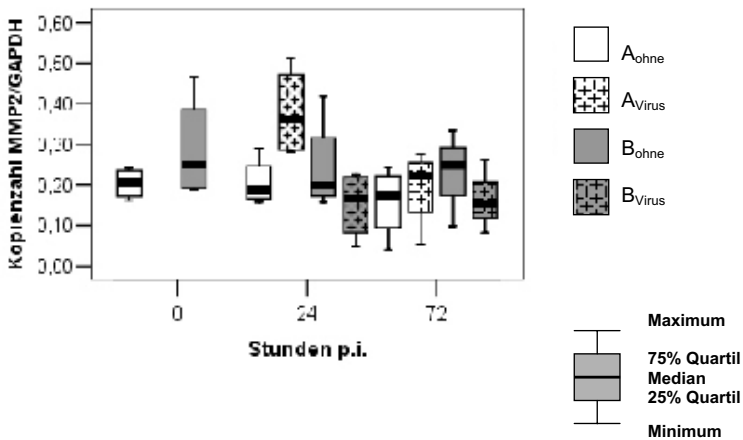
#### 4.3.6.1 MMP-2, MMP-9, MMP-13, und TIMP-1 mRNA-Expression

Die **MMP-2**-mRNA-Expression der **Gruppe A<sub>Virus</sub>** betrug 24 Std p.i. das 1,7fache (1,4- 2,1fache) der MMP-2-mRNA der Kontrollkulturen. 72 Std p.i. betrug die MMP-2-mRNA-Expression das 1,3fache (0,95-1,7fache) der Kontrollkulturen.

Die Kulturen der Gruppe **B<sub>Virus</sub>** wiesen 24 Std p.i. die 0,8fache (0,5-1,3fache) MMP-9-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrollkulturen auf. 72 Std p.i. lag gegenüber den Kontrollkulturen eine 0,7fache (0,7-1,1fache) Expression vor.

Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab zwischen den Kontrollkulturen und den infizierten Kulturen der jeweiligen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der MMP-2-mRNA-Expression (Anhang 9.1.2.1).

**Abb. 19. MMP-2-mRNA-Expression der Kulturen A<sub>ohne</sub>, A<sub>Virus</sub>, B<sub>ohne</sub> und B<sub>Virus</sub>**



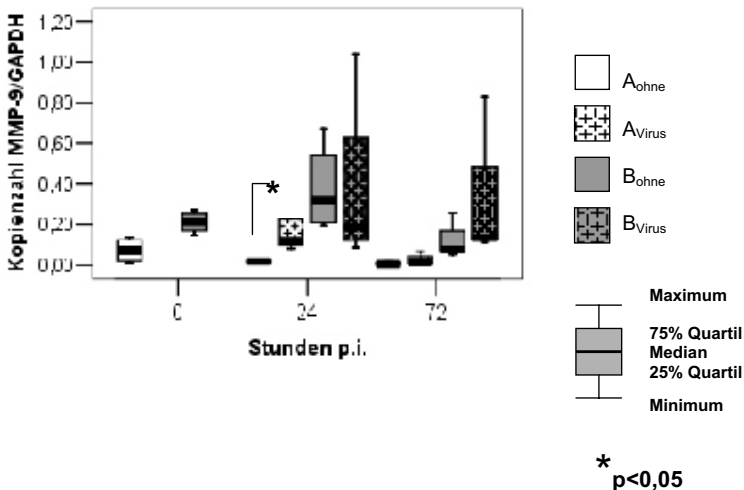
Die MMP-2-mRNA-Expression war 24 Std p.i. in allen Mischkulturen gegenüber den Kontrollkulturen erhöht.

Die MMP-9-mRNA-Expression der Gruppe A<sub>Virus</sub> betrug 24 Std p.i. das 7fache (1,4-17fach) der Kontrollkulturen. 72 Std p.i. zeigten die Kulturen die 1,1fache (0,8-16fache) MMP-9mRNA-Expression der Kontrollkulturen.

Die Kulturen der Gruppe B<sub>Virus</sub> wiesen 24 Std p.i. die 0,7fache (0,5-1,4fache) MMP-9 Expression der Kontrollkulturen auf. 72 Std p.i. lag gegenüber den Kontrollkulturen eine 1,3fache (0,5-2fache) Expression vor.

Die **statistische Auswertung** mittels Mann-Whitney-U-Test ergab in der Gruppe A<sub>Virus</sub> 24 Std p.i. eine signifikant höhere MMP-9-mRNA-Expression gegenüber der Gruppe A<sub>ohne</sub> ( $p=0,018$ ). Zwischen den infizierten und den nicht infizierten Kulturen der Gruppe B gab es keine signifikanten Unterschiede in der MMP-9-mRNA-Expression (Anhang, 9.1.2.2)

**Abb. 20. MMP-9-mRNA-Expression der Kulturen A<sub>ohne</sub>, A<sub>Virus</sub>, B<sub>ohne</sub> und B<sub>Virus</sub>**



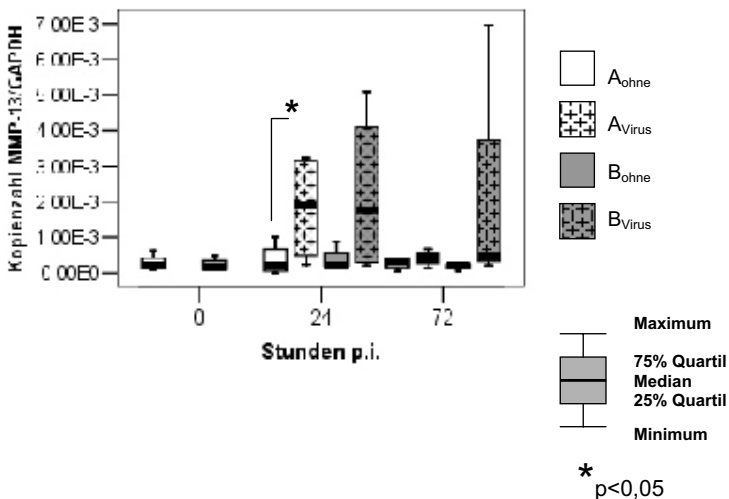
Die Expression der MMP-9-mRNA war 24 Std nach der Infektion in den Mischkulturen gegenüber den Kontrollkulturen signifikant erhöht.

Die MMP-13-mRNA-Expression der Gruppe A<sub>Virus</sub> betrug 24 Std p.i. das 11,5fache (2,7-30fache) der Kontrollkulturen. 72 Std p.i. waren keine Unterschiede zwischen infizierten Kulturen und Kontrollkulturen feststellbar.

Die Kulturen der **Gruppe B<sub>Virus</sub>** wiesen 24 Std p.i. die 2,5fachen (0,9-6fachen) MMP-13-mRNA-Expression der Kontrollkulturen auf. 72 Std p.i. wies die Gruppe B<sub>Virus</sub> eine 2fache (2-10fache) Expression der Kontrollkulturen auf.

Die **statistische Auswertung** mittels Mann-Whitney-U-Test ergab für die MMP-13-mRNA-Expression zwischen den Kontrollkulturen und den infizierten Kulturen der Gruppe A zum 24 Std p.i. signifikante Unterschiede ( $p=0,0017$ , Anhang 9.1.2.4).

**Abb. 21. MMP-13-mRNA-Expression der Kulturen A<sub>ohne</sub>, A<sub>Virus</sub>, B<sub>ohne</sub> und B<sub>Virus</sub>**



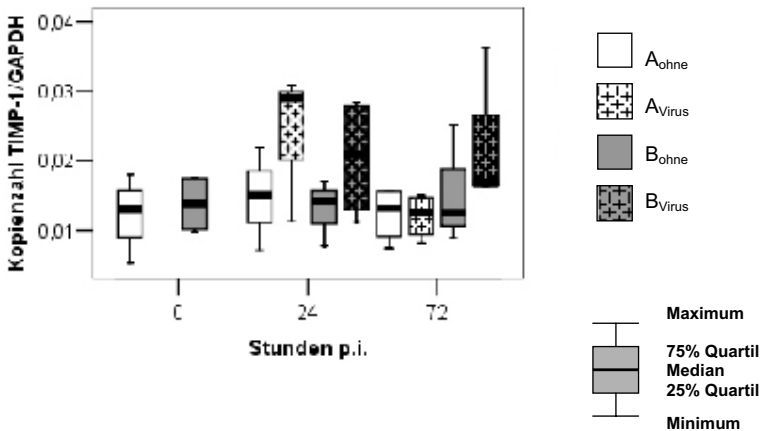
Die Expression der MMP-13-mRNA war 24 Std nach der Infektion in den Mischkulturen gegenüber den Kontrollkulturen signifikant erhöht.

Die **TIMP-1**-mRNA-Expression der **Gruppe A<sub>Virus</sub>** betrug 24 Std p.i. das 1,7fache (1,25-2fache) der Kontrollkulturen. 72 Std p.i. entsprachen die Werte der infizierten Kulturen den Werten der Kontrollgruppen.

Die Kulturen der Gruppe **B<sub>Virus</sub>** wiesen 24 Std p.i. die 1,2fache (0,75-1,4fache) **TIMP-1**-mRNA-Expression der Kontrollkulturen auf. 72 Std p.i. lag gegenüber den Kontrollkulturen keine veränderte Expression vor.

Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab zwischen den Kontrollkulturen und den infizierten Kulturen der jeweiligen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der **TIMP-1**-mRNA-Expression (Anhang 9.1.2.6).

**Abb. 22. TIMP-1-mRNA-Expression der Kulturen A<sub>ohne</sub>, A<sub>Virus</sub>, B<sub>ohne</sub> und B<sub>Virus</sub>**



Die **TIMP-1**-mRNA-Expression war 24 Std p.i. in allen Mischkulturen gegenüber den Kontrollgruppen erhöht.

#### 4.3.6.2 Gelatinolytische Aktivität von (pro)-MMP-2 und pro-MMP-9 in den Kulturen A<sub>Virus</sub> und B<sub>Virus</sub>

Die Gruppe A<sub>Virus</sub> wies ebenso wie die Kontrollkulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub> ebenfalls zu allen untersuchten Zeitpunkten eine enzymatische Aktivität bei 68 kDa (**pro-MMP-2**) auf. 24 Std p.i. fand sich gegenüber den jeweiligen Kontrollkulturen eine 1,35fach (1,16-1,83) erhöhte gelatinolytische Aktivität (Foto 37). 75% der Kulturen der Gruppe A<sub>Virus</sub> wiesen außerdem eine gelatinolytische Aktivität bei 62kDa, interpretiert als **aktive Form der MMP-2** auf. 72 Std p.i. betrug die gelatinolytische Aktivität der infizierten Kulturen das 1,21fache (0,98-1,83) der Kontrollkulturen. 50% der Kulturen wiesen eine Gelatinolyse bei 62 kDa (aktive Form von MMP-2) auf.

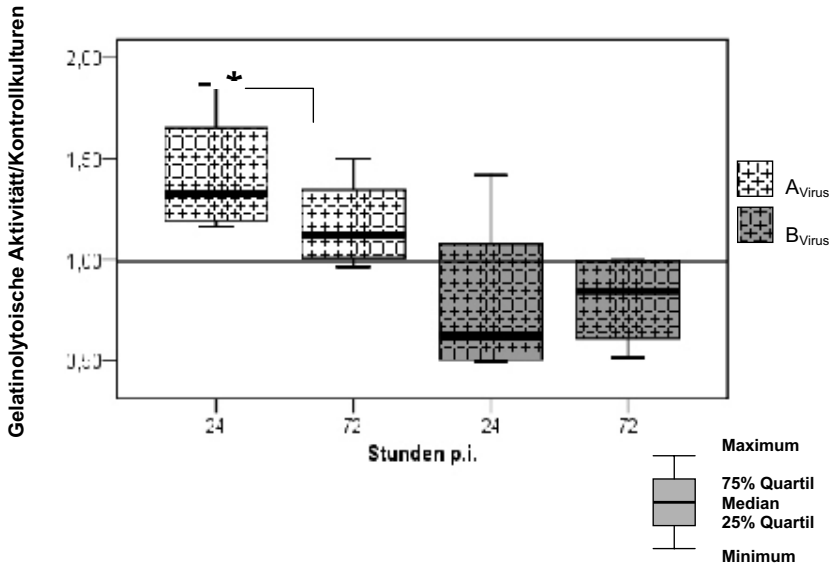
24 Std p.i. betrug die gelatinolytische **pro-MMP-2** Aktivität der Gruppe B<sub>Virus</sub> das 0,6fache (0,5-1,4fache) der Gruppe B<sub>ohne</sub>. 72 Std p.i. wies die Gruppe B<sub>Virus</sub> eine 0,8fache (0,6-1fach) pro-MMP-2 Aktivität auf. Aktive Formen wurden nicht detektiert.

Die **statistische Auswertung** mittels Mann-Whitney-U-Test ergab eine signifikant höhere gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 in der Gruppe A<sub>Virus</sub> gegenüber den Kontrollkulturen (Gruppe A<sub>ohne</sub>) 24 Std p.i. ( $p=0,037$ ).

Zwischen den Kontrollkulturen und den infizierten Kulturen der Gruppe B ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der pro-MMP-2-Expression (Anhang 9.1.2.1).



**Abb. 23. relative gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 der Gruppen A<sub>Virus</sub> und B<sub>Virus</sub> 24 und 72 Std nach Infektion**



\*  $p < 0,05$

**A<sub>Virus</sub>**: infizierte Kulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub>

**B<sub>Virus</sub>**: infizierte Kulturen der Gruppe B<sub>ohne</sub>

Dargestellt ist die gelatinolytische Aktivität der infizierten Kulturen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollkulturen zum gleichen Zeitpunkt. Die Werte stammen von vier Versuchen, die jeweils im Dreifachansatz gemessen wurden. Die gelatinolytische Aktivität der Kontrollkulturen wurde gleich 1 gesetzt.

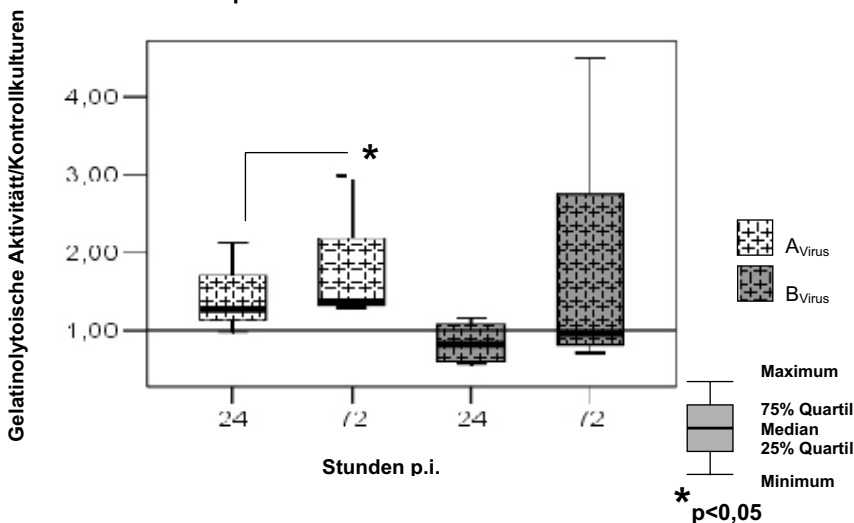
Die Gruppe A<sub>Virus</sub> wies 24 Std p.i. eine gegenüber den Kulturen der Gruppe A<sub>ohne</sub> 1,3fach (1-2,1fach) erhöhte gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 auf. Von einer Präparation konnten jedoch keine Daten erhoben werden. 72 Std p.i. lag die gelatinolytische Aktivität der pro-MMP-9 bei der Gruppe A<sub>Virus</sub> höher als die der zugehörigen Kontrollkulturen. Sie betrug das 1,4fache (1,4-2,9fache) der Kontrollkulturen (Foto 37). Eine Gelatinolyse der aktiven Formen der MMP-9 wurde nicht detektiert.

Die **statistische Auswertung** mittels Mann-Whitney-U-Test ergab in der Gruppe  $A_{\text{Virus}}$  72 Std p.i. eine signifikant höhere gelatinolytische Aktivität der pro-MMP-9-Expression gegenüber der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$ , ( $p=0,029$ , Anhang 9.1.2.3).

Die Gruppe  $B_{\text{Virus}}$  zeigte 24 Std p.i. im Vergleich zu den Kontrollkulturen eine 0,9fache (0,53-1,04fache) pro-MMP-9 Aktivität. 72 Std p.i. war die Expression der Gruppe  $B_{\text{Virus}}$  identisch (1,0; 0,7-4fache) mit der Expression der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$  zum gleichen Zeitpunkt. Aktive MMP-9-Formen wurden nicht detektiert.

Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab zwischen den Gruppen  $B_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{Virus}}$  keine signifikanten Unterschiede in der pro-MMP-9-Expression (Anhang 9.1.2.3).

**Abb. 24. Gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 der Gruppen  $A_{\text{Virus}}$  und  $B_{\text{Virus}}$  24 und 72 Std p.i.**



$A_{\text{Virus}}$ : infizierte Kulturen der Gruppe  $A_{\text{ohne}}$

$B_{\text{Virus}}$ : infizierte Kulturen der Gruppe  $B_{\text{ohne}}$

Dargestellt ist die gelatinolytische Aktivität der infizierten Kulturen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollkulturen. Die Werte stammen von vier Versuchen, die jeweils im Dreifachansatz gemessen wurden. Die gelatinolytische Aktivität der Kontrollkulturen wurde gleich 1 gesetzt.

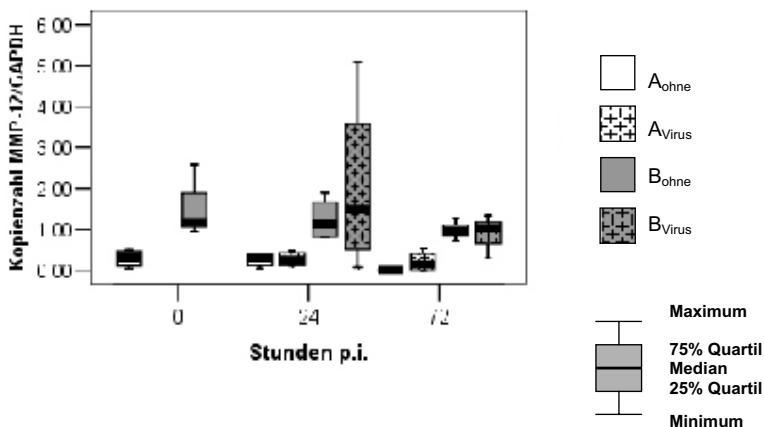
#### 4.3.6.3 Nach Infektion konstitutiv exprimierte MMPs (MMP-12, MMP-14 und TIMP-2- mRNA-Expression)

Die **MMP-12-mRNA-Expression** der Kulturen der **Gruppe A<sub>Virus</sub>** betrug 24 Std p.i. das 1,4fache (0,5 bis 6fache) gegenüber den Kontrollkulturen. 72 Std p.i. war bei den Präparationen kein Unterschied zwischen den infizierten Kulturen und den Kontrollkulturen der Gruppe A feststellbar.

**Die Gruppe B<sub>Virus</sub>** wies 24 Std p.i. wies eine 1,8fache (1-50fache) MMP-12-Expression der Kontrollkulturen auf. 72 Std nach der Infektion wiesen die Kulturen eine 1,3fache (0,95-4fache) Expression auf.

Die **statistische Auswertung** ergab mittels Mann-Whitney-U-Test für die Expression zwischen den Kontrollkulturen und den infizierten Kulturen der Gruppen A und B keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,932$ , Anhang 9.1.2.3).

**Abb. 25. MMP-12-mRNA-Expression der Kulturen A<sub>ohne</sub>, A<sub>Virus</sub>, B<sub>ohne</sub> und B<sub>Virus</sub>**



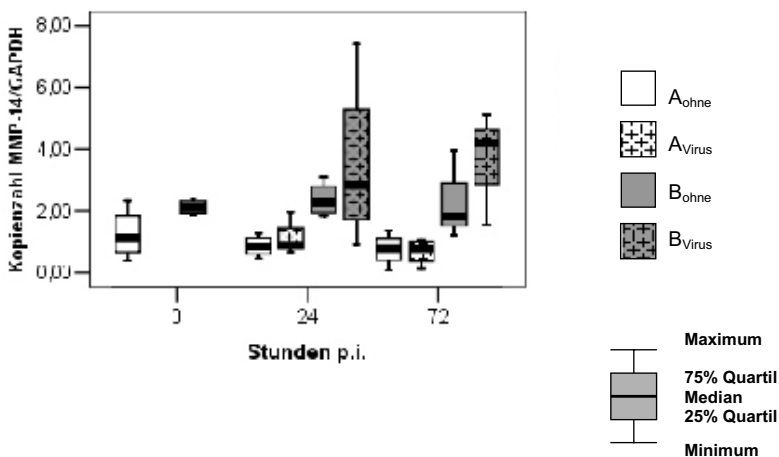
Die MMP-12mRNA-Expression war bei beiden Gruppen zu den Zeitpunkten 24 und 72 Std p.i. nicht signifikant verändert. p.i.:post inoculationem.

Die **MMP-14-mRNA-Expression der Gruppe A<sub>Virus</sub>** betrug 24 und 72 Std p. i. das 0,8fache (0,7-1,3fach) verglichen mit den Kontrollkulturen.

Die **MMP-14-mRNA-Expression der Gruppe B<sub>Virus</sub>** wies 24 Std p.i. ein inhomogenes Expressionsmuster im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollkulturen auf. Die Expression betrug das 1.25fache (0,5-3,4fache), 72 Std p.i. betrug die Expression das 1.1fache (0,80-3fache).

Die **statistische Auswertung** mittels Kruskal-Wallis-Test ergab für die Expression zwischen den Kontrollkulturen und den infizierten Kulturen der Gruppen A und B keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,512$ , Anhang 9.1.2.5).

**Abb. 26. MMP-14-mRNA-Expression der Kulturen A<sub>ohne</sub>, A<sub>Virus</sub>, B<sub>ohne</sub> und B<sub>Virus</sub>**



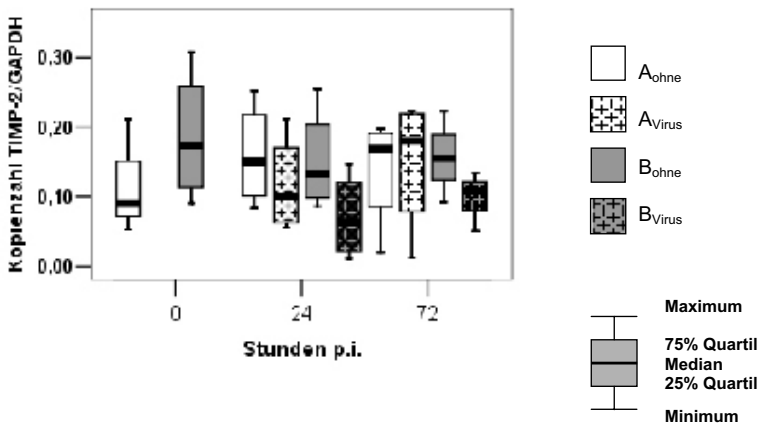
Die MMP-14-mRNA-Expression war zu den Zeitpunkten 24 und 72 Std p.i. nicht signifikant verändert. 72 Std p.i. war in der Gruppe B<sub>Virus</sub> ein Anstieg gegenüber den Kontrollkulturen zum gleichen Zeitpunkt vorhanden. p.i.:post inoculationem;

Die **TIMP-2-mRNA-Expression der Gruppe A<sub>Virus</sub>** betrug 24 Std p. i. das 0,6fache (0,5-0,75fache) der Kontrollkulturen. 72 Std p.i. entsprachen sie den Werten der Kontrollgruppen.

Die **TIMP-2-mRNA-Expression der Gruppe B<sub>Virus</sub>** wies 24 Std p.i. ein inhomogenes Expressionsmuster im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollkulturen auf. Die Expression betrug das 1,25fache (0,5-3,4fache). 72 Std p.i. betrug die Expression das 1,1fache (0,8-3fache).

Die **statistische Auswertung** mittels Kruskal-Wallis-Test ergab für die Expression von TIMP-2 zwischen den Kontrollkulturen und den infizierten Kulturen der Gruppen A und B keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,430$ , Anhang 9.1.2.7).

**Abb. 20. TIMP-2-mRNA-Expression der Kulturen A<sub>ohne</sub>, A<sub>Virus</sub>, B<sub>ohne</sub> und B<sub>Virus</sub>**



Die TIMP-2-mRNA-Expression war zu den Zeitpunkten 24 und 72 Std p.i. nicht signifikant verändert. 72 Std p.i. war ein Anstieg gegenüber den Kontrollkulturen zum gleichen Zeitpunkt vorhanden. p.i.:post inoculationem.

#### 4.3.6.4 Kaseinolytische Aktivität nach Infektion

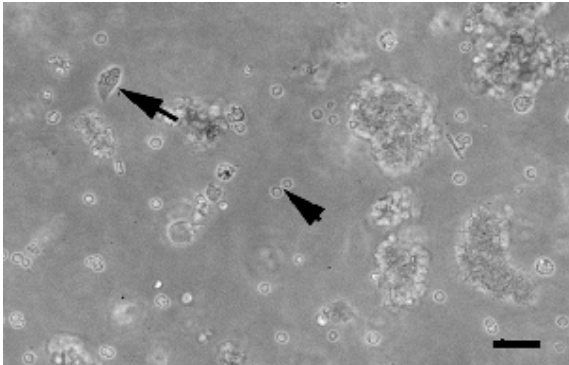
Die kaseinolytische Aktivität war innerhalb der verschiedenen Gruppen nach der Infektion sehr uneinheitlich.

25 % der Kulturen der Gruppe A<sub>Virus</sub> wiesen im Gegensatz zu den Kontrollkulturen 24 Std p.i. und 75 % (Nr.6,Nr.7 Nr.8) 72 Std p.i. eine sichtbare kaseinolytische Aktivität im Bereich von 55-60 kDa (MMP-3 oder MMP-13) auf (Foto 38).

50 % der Kulturen der Gruppe A<sub>Virus</sub> (Nr. 7, Nr. 8) wiesen 24 Std nach Infektion eine Kaseinolyse zwischen 25- und 45 kDa auf (verschiedene Formen der MMP-12). 72 Stunden nach der Infektion ließen sich bei den infizierten Kulturen und den Kontrollkulturen keine Expressionsunterschiede feststellen.

Die infizierten Kulturen der Gruppe B wiesen im Vergleich zu den Kontrollkulturen keine Unterschiede in der Kaseinolyse auf.

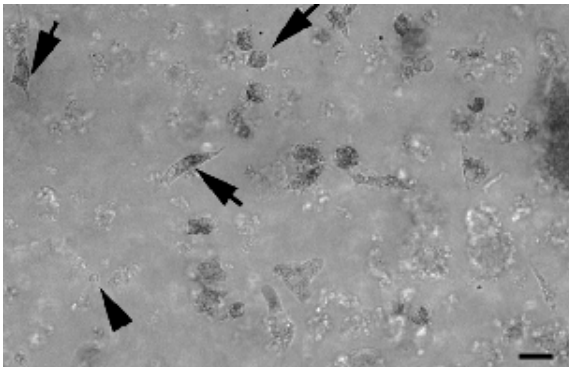
#### 4.4 Fotografische Abbildungen

**Foto 1**

Primärkultur P0, 36 Std nach Isolierung der Gehirnzellen; neben Detritus sind vereinzelt adhärenente Zellen vorhanden.

**Pfeil:** Proliferierende Zelle;  
**Pfeilspitze:** Erythrozyten.  
(Nr.6)

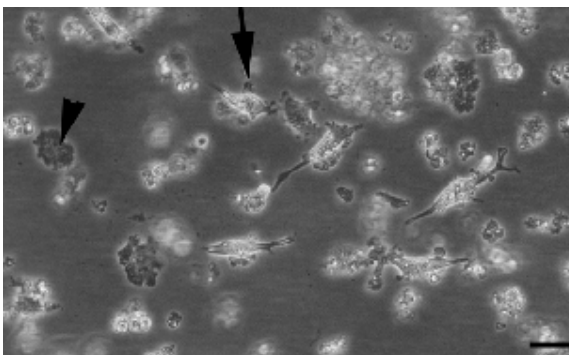
**Bar=35 µm**

**Foto 2**

Primärkultur P0, 5 Tage nach Isolierung der Zellen.

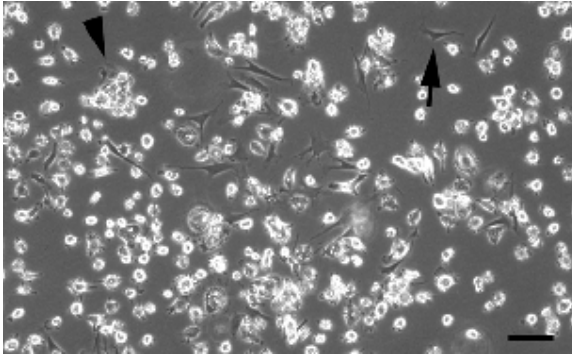
**Pfeil:** Phagozytierte Zellrümmter;  
**Pfeilspitze:**Erythrozyt.  
(Nr.6)

**Bar=25 µm**

**Foto 3**

Primärkultur P0, 5 Tage nach Isolierung der Zellen.

**Pfeil:** Aktivierte Mikrogliazelle mit kurzen, an Ausläufern  
**Pfeilspitze:** Zellrümmter.  
(Nr.5)

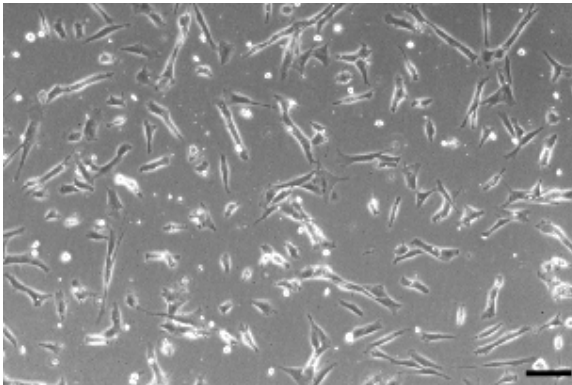
**Foto 4**

Primärkultur P0, 9 Tage nach Isolierung.

**Pfeil:** Adhärente, flächige Zellen

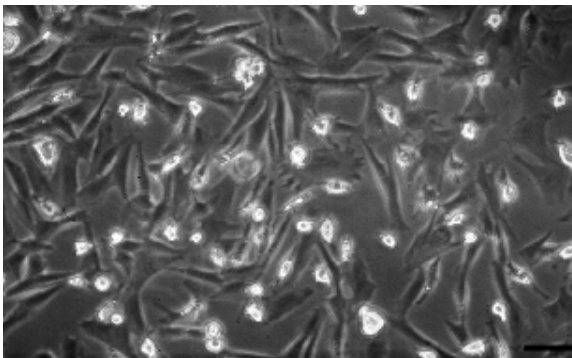
**Pfeilspitze:** Abgerundete, amöboide Mikroglia (Nr.9)

**Bar=90 µm**

**Foto 5**

Die Kultur von Foto 4 nach dem Schütteln der Zellkulturflaschen zur Aufreinigung der Mikroglia/Makrophagen. Dem Substrat anhaftende, flächige Zellen sind zurückgeblieben. Gruppe A<sub>Kokultur</sub> (Nr.9)

**Bar=70 µm**

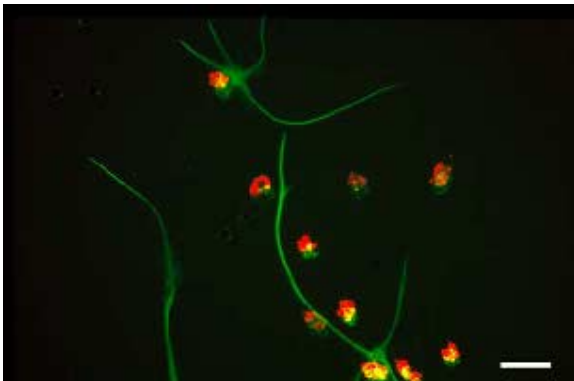
**Foto 6**

Mischkultur P1, 24 Std nach der Passage (Gruppe A<sub>ohne</sub>).

Auf den flächigen Zellen sitzen bis 50 µm große, runde Zellen (Mikroglia/Makrophagen). (Nr.8)

**Bar=50 µm**



**Foto 7**

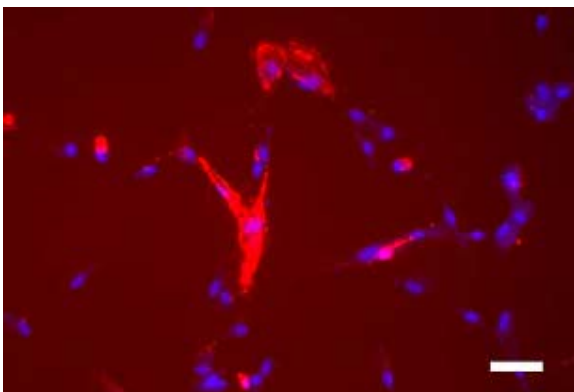
Mischkultur P1, 24 Std nach der Aussaat.

**Rot:**Dil-ac-LDL-Aufnahme aktivierter Mikroglia von amöboider Form.

**Grün:**GFAP-positive Astrozyten (Nr.8)

Dil-ac-LDL/GFAP-FITC

**Bar=90 µm**

**Foto 8**

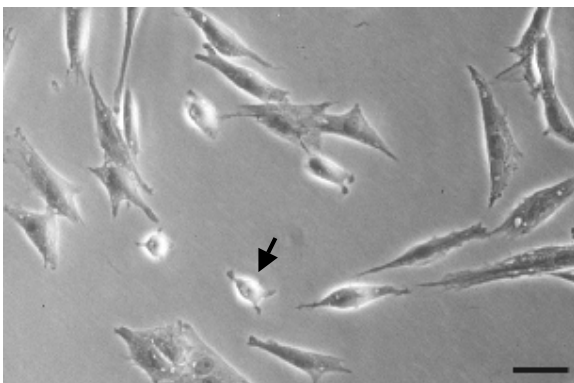
Mischkultur P1, 48 Std nach der Aussaat.

**Rot:**“Schwach“-Dil-ac-LDL-positive Zellen

**Blau:** Zellkerne (Nr.8)

Dil-ac-LDL/Bisbenzimidide

**Bar=50 µm**

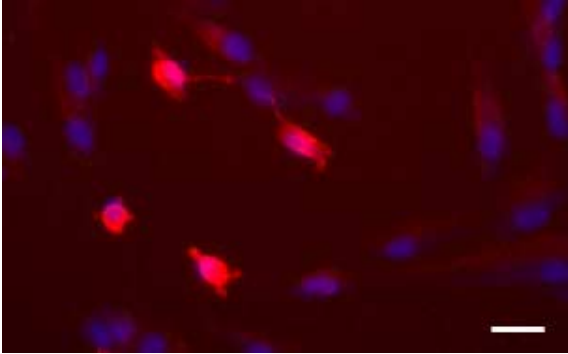
**Foto 9**

Mischkultur P1, 24 Std nach der Aussaat.

**Pfeil:** Bi- bis tripolare Zellen mit kurzen Ausläufern proliferieren zwischen den flächigen Zellen. (Nr.6)

Phasenkontrast

**Bar= 40 µm**

**Foto 10**

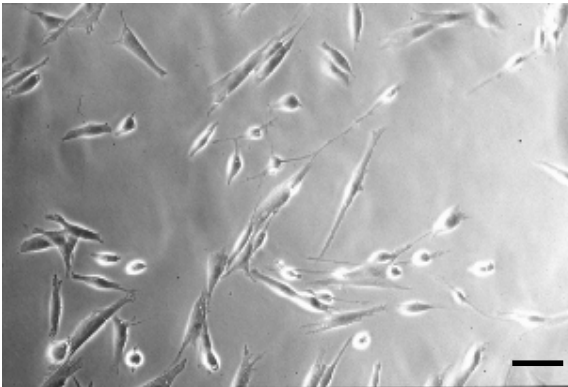
Mischkultur P1 wie Foto 9,  
**Rot:** Die A2B5 positiven  
 Zellen sind rundlich.

(Nr.6)

**Blau:** Zellkerne

A2B5-Cy3/Bisbenzimidide

**Bar=40 µm**

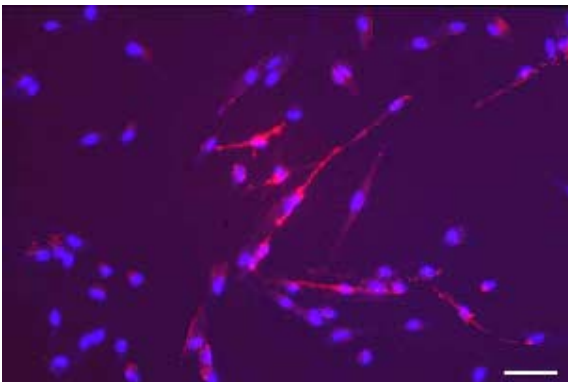
**Foto 11**

Mischkultur P1, 96 Std nach  
 Isolierung

Bi- bis tripolare Zellen mit  
 langen Fortsätzen  
 (Nr.8)

Phasenkontrast

**Bar=90 µm**

**Foto 12**

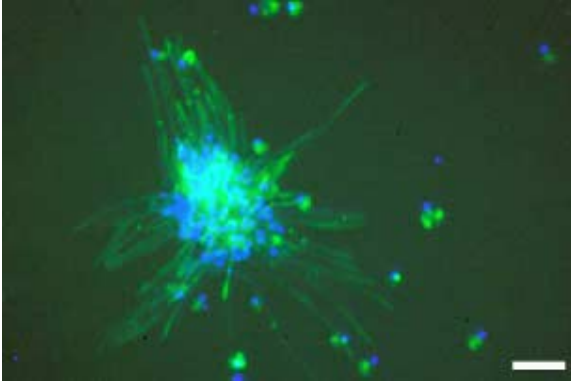
Mischkultur P1 wie Foto 11

**Rot:** Die bipolaren Zellen  
 sind A2B5-positiv

**Blau:** Zellkerne

A2B5-Cy3/Bisbenzimidide

**Bar=90 µm**

**Foto 13**

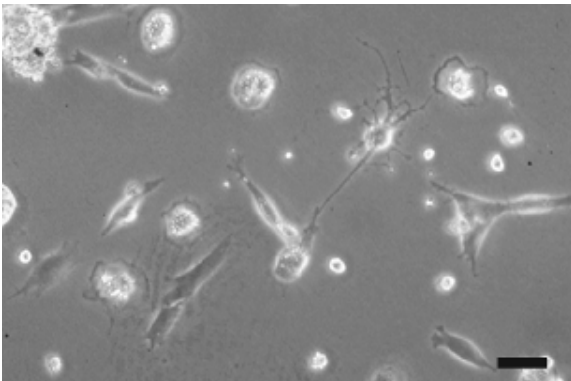
Mischkultur P1, 48 Std nach der Aussaat

**Grün:** GFAP-positive, fibrilläre Astrozyten

**Blau:** Zellkerne (Nr.7)

GFAP-FITC/Bisbenzimidide

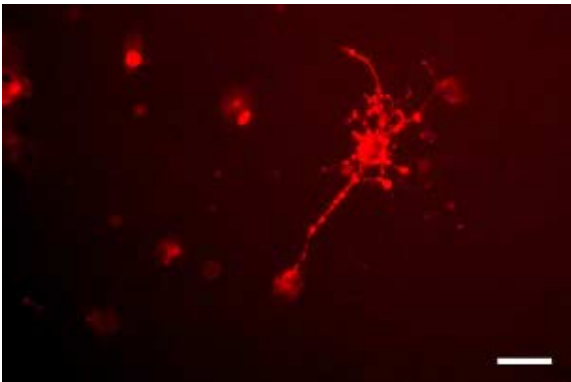
**Bar=120 µm**

**Foto 14**

Mischkultur P1, 24 Std nach der Aussaat Oligodendrozyt mit zahlreichen, verzweigten Ausläufern und wenig Soma. (Nr.8)

Phasenkontrast

**Bar=25 µm**

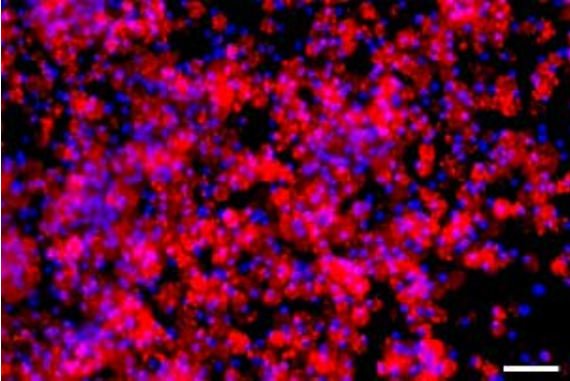
**Foto 15**

Mischkultur P1 wie Foto 14, 24 Std nach der Aussaat.

**Rot:** O4-positiver (prä)maturer Oligodendrozyt

O4-Cy3

**Bar=25 µm**

**Foto 16**

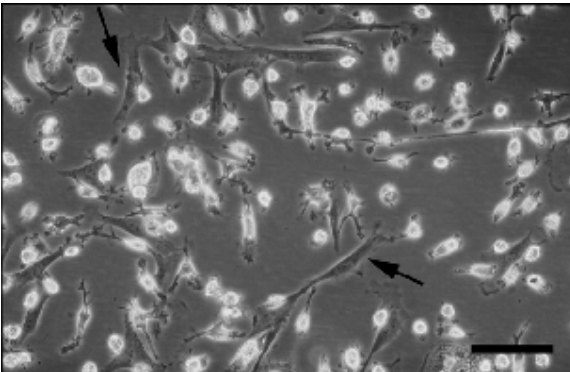
Mikroglia/Makrophagen-Kultur P1, 24 Std nach der Aussaat

**Rot:** Dil-ac-LDL positive Mikroglia

**Blau:** Zellkerne

Dil-ac-LDL/Bisbenzimid

**Bar=140 µm**

**Foto 17**

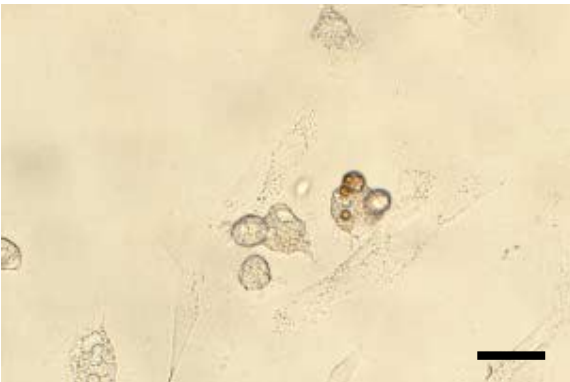
Mikroglia/Makrophagen-Kultur, 5 Tage nach der Aussaat.

Die Mikroglia/Makrophagen sind teilweise mehr amöboid (aktiviert) zum Teil ramifiziert (ruhend).

**Pfeile:** Proliferation flächiger Zellen (Fibroblasten)

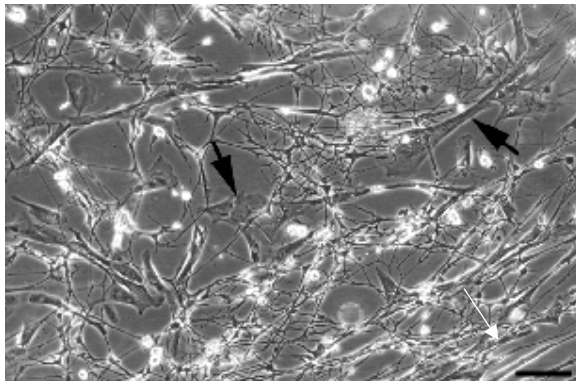
Phasenkontrast

**Bar=100 µm**

**Foto 18**

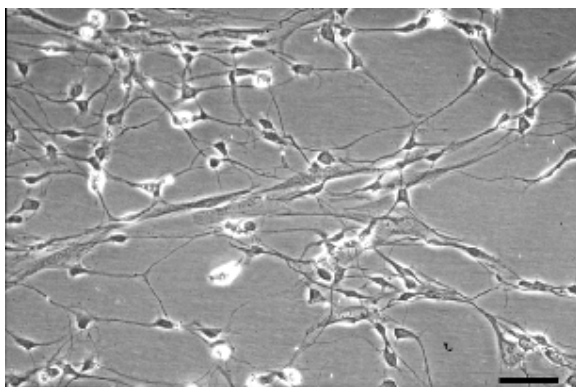
Mikroglia/Makrophage  
Internalisierung von magnetischen Partikeln (*beads*).

**Bar=50 µm**

**Foto 19**

Serumfreie Kultur, P0  
6 Wochen in Kultur,  
**Pfeile:** Zahlreiche meist tripolare Zellen proliferieren auf den fibroblasten-ähnlichen Zellen. Sie sind locker adhären und bilden mit ihren Fortsätzen ein feines Netzwerk.  
(Nr.12)

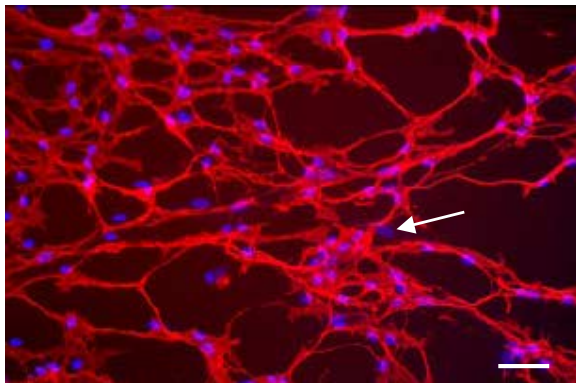
Phasenkontrast

**Bar=120 µm****Foto 20**

Serumfreie Kultur P1,

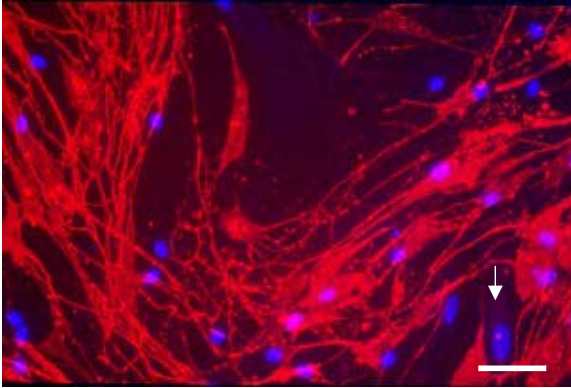
(Nr. 12)

Phasenkontrast

**Bar=90 µm****Foto 21**

Serumfreie Kultur P1 wie Foto 20

**Rot:** Die Zellen exprimieren  $p75^{NGFR}$ ,**Blau:** Zellkerne**Pfeil:** wenige Zellen mit größeren Zellkernen sind negativ (Fibroblasten). $p75^{NGFR}$  Cy3/ Bisbenzimid.**Bar= 90 µm**

**Foto 22**

Gereinigte Kultur P1,  
Zellen aus der gleichen  
Passage wie die p75<sup>NGFR</sup>-  
positiven Zellen

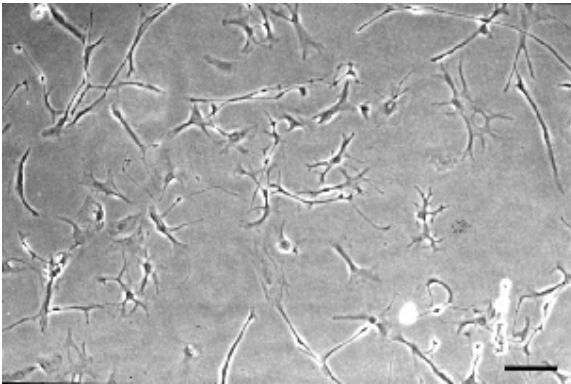
**Rot:** A2B5-positive Zellen

**Blau:** Zellkerne

**Pfeil:** Negative Zelle  
(Nr.12)

A2B5-Cy3/Bisbenzimidide

**Bar=70 µm**

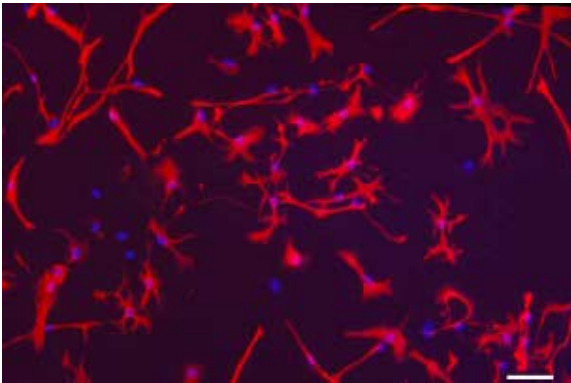
**Foto 23**

Serumfreie Kultur, P 1 der  
gereinigten, heteromorphen  
Astrozyten.

Flächige und stark  
verzweigte, strahlenartige  
Zellen mit ovalem Kern.  
(Nr.11)

Phasenkontrast

**Bar=120 µm**

**Foto 24**

Serumfreie Kultur, P 1 wie  
Foto 23

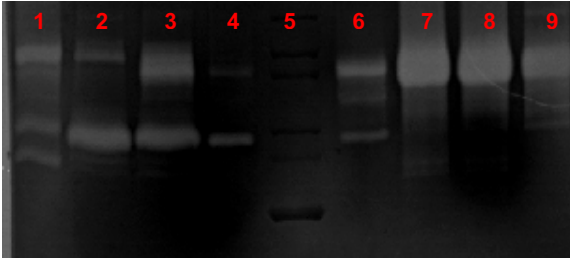
**Rot:** Die Zellen sind >90%  
GFAP-positiv.

**Blau:** Zellkerne

GFAP-Cy3/Bisbenzimidide

**Bar=120 µm**

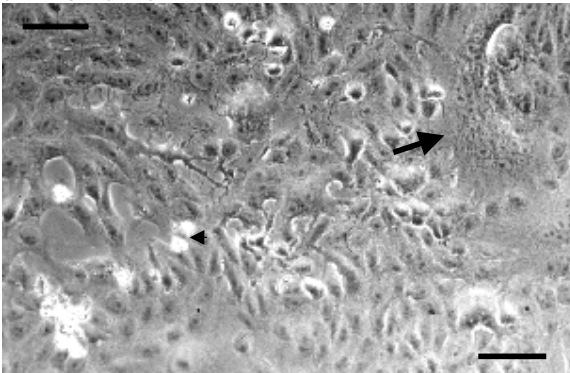




1 Humaner Standard  
 2-4 Mischkultur (Gruppe A<sub>ohne</sub>) Nr. 2, Nr. 3, Nr.4  
 5: pEqLab-Proteinmarker  
 6-8: Mikroglia/Makrophagen-Kultur, Nr 2, Nr. 3, Nr.4  
 9: DH82 Zelllinie

**Foto 25**  
**Gelatinezymographie**  
 90 kDa (pro)-MMP-9

← 68 kDa (pro)-MMP-2  
 ← 64 kDa MMP-2  
 ← 50 kDa  
**Slot 2-8:**  
 Überstand von jeweils  
 6000 Zellen

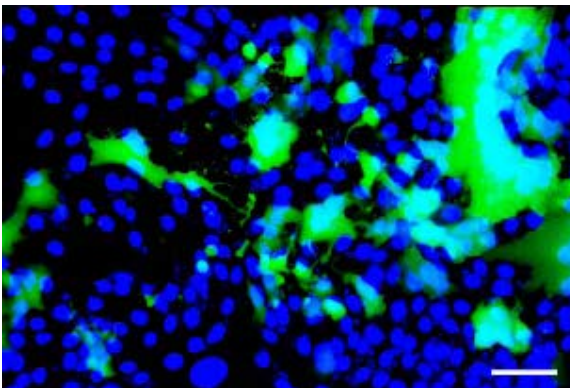


**Foto 26**

Verozellen 3 Tage p.i.  
**Pfeil:**  
 zytopathogener Effekt  
 (Synzytienbildung)

Phasenkontrast

**Bar=40 µm**

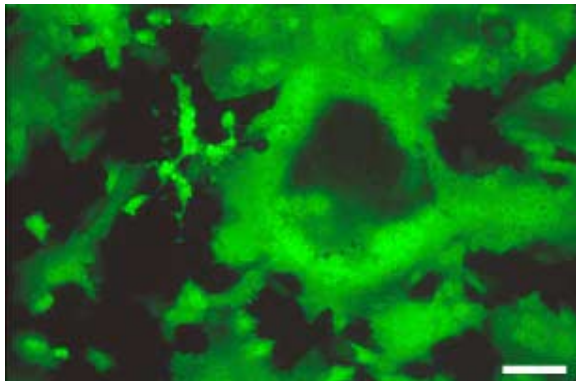


**Foto 27**

Verozellen wie Foto  
 24  
**Grün:** Ond-GFP-  
 exprimierende Zellen  
**Blau:** Zellkerne

Bisbenzimid

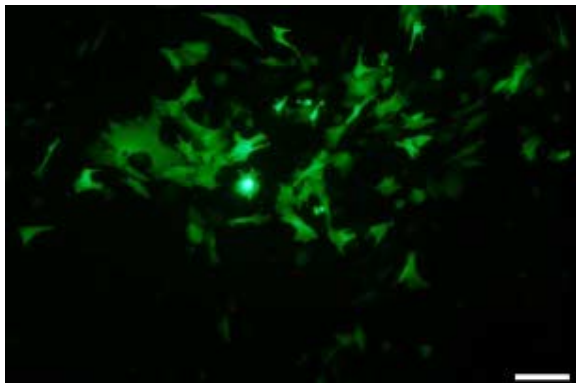
**Bar=40 µm**

**Foto 28**

Verzellen, 4 Tage p.i.  
Die Synzytienbildung ist fortgeschritten, es finden sich sogenannte Plaques

**Grün:** Ond-GFP-exprimierende Zellen

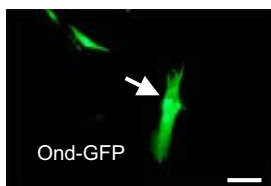
**Bar=50 µm**

**Foto 29**

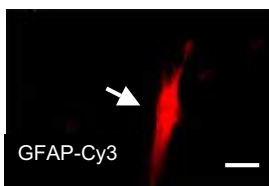
Gehirnzellkultur  
Infizierte Mischkultur P1, 72 Std p.i.

**Grün:** Zahlreiche Ond-GFP exprimierende Zellen, ein CPE ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu sehen. (Nr.7)

**Bar=80 µm**



Ond-GFP



GFAP-Cy3

**Fotos 30+31**

Mischkultur, infizierter Astrozyt, 72 Std p.i. (Nr.9)

**Pfeile:** GFAP freie Areale mit intrazytoplasmatischen Viruseinschlüssen

**Bar=40 µm**

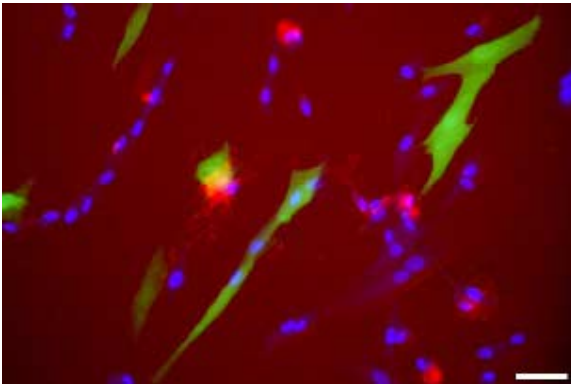


**Foto 32**

Mischkultur P1, 24 Std p.i.  
(Nr.8)

Phasenkontrast

Bar=60 µm

**Foto 33**

Mischkultur P1, wie Foto  
32

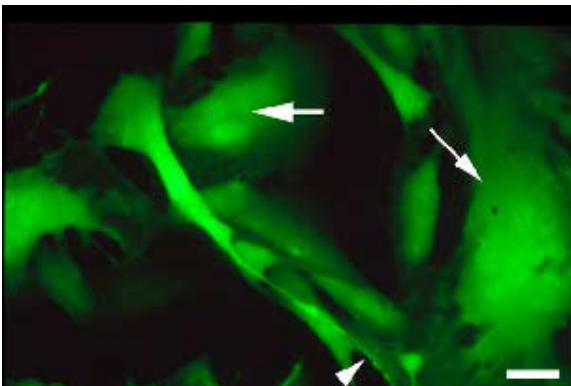
**Rot:** Dil-ac-LDLpositive  
Mikrogliazelle/  
Makrophage .

**Grün:** Ond-GFP-  
exprimierende Zelle

**Blau:** Zellkern

Dil-ac-LDL/  
Bisbenzimidide

Bar=60 µm

**Foto 34**

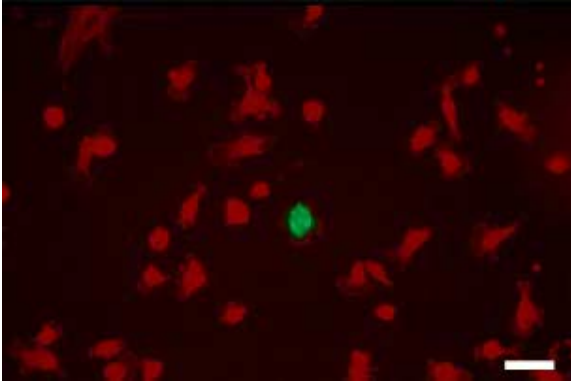
Mischkultur P1, 6 Tage p.i.

**Grün:** Ond-GFP  
exprimierende Zellen

**Pfeile:** Synzytium  
Ond-GFP-positiver Zellen.

**Pfeilspitze:** Varikositäten  
an den Ausläufern

Bar=20 µm

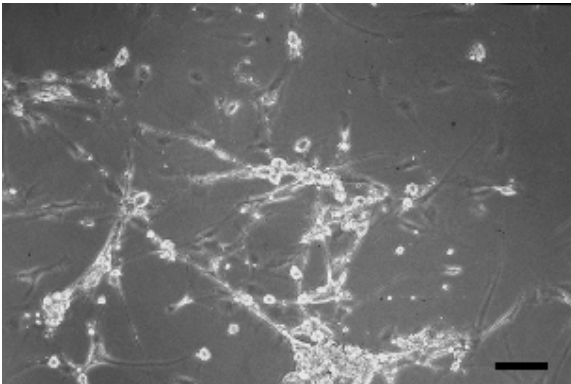
**Foto 35**

Gereinigte  
Mikroglia/Makrophagen-  
Kultur  
(Nr.7)

**Rot:** Iba1

**Grün:** Ond-GFP-positive  
Zelle

**Bar:**80  $\mu\text{m}$

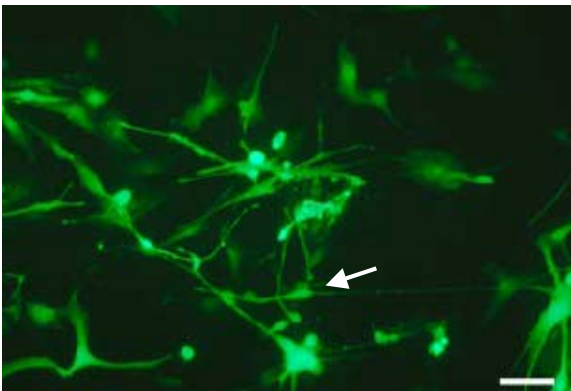
**Foto 36**

Serumfreie, p75 positive  
Kultur P1, 6 Tage p.i.  
(Nr.12)

Zytolyse

Phasenkontrast

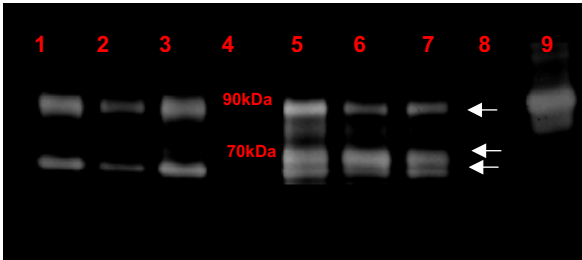
**Bar=**100  $\mu\text{m}$

**Foto 37**

Serumfreie Kultur wie Foto  
36

**Grün:** Ond-GFP  
exprimierende Zellen  
weisen Varikositäten auf.

**Bar=**100  $\mu\text{m}$

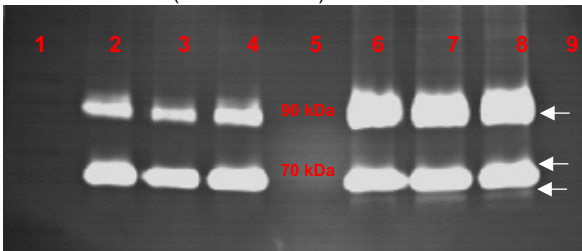


- 4: peqlab-Proteinmarker;  
 5-7: infizierte Kulturen;  
 8: Sato's Medium (Negativkontrolle);  
 9: DH82-Zellen (Positivkontrolle)

Foto 36

Gelatine-Zymographie  
 Mischkultur, 24 Std p.i.  
 (Nr.7)

**Kontrollkulturen:** Pro-MMP-9 (90 kDa) und pro-MMP-2-(68 kDa) Aktivität;  
**Infizierte Kulturen:** unterhalb der pro-MMP-2 Bande zusätzliche Aktivität von MMP-2 (ca. 64 kDa).

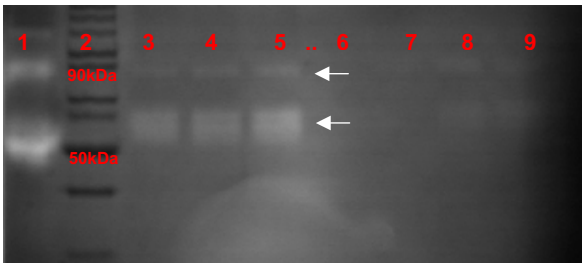


- 1: peqlab-Proteinmarker;  
 2-4: Kontrollkulturen;  
 5 Sato's Medium (Negativkontrolle);  
 6-8: Infizierte Kulturen  
 9: DH82-Zellen (Positivkontrolle).

Foto 37

Gelatine-Zymographie  
 Mischkultur, 72 Std p.i.

**Kontrollkulturen:** pro-MMP-9 (90 kDa) und pro-MMP-2-(68 kDa) Aktivität;  
**infizierte Kulturen:** Aktivität von MMP-2 (64 kDa) sowie erhöhte pro-MMP-9 Aktivität



- 1: DH82-Zellen persistent mit CDV-Ond infiziert (Kontrolle),  
 2: peqlab-Proteinmarker  
 3-5: Kontrollkulturen;  
 6: Sato's Medium;  
 7-9: Infizierte Kulturen.

Foto 38

Kaseinzymographie, pro-MMP-9, pro-MMP-13/MMP-3

Mikroglia/Makrophagen-Kultur,  
 72 Std p.i.  
 (Nr.8)

**Kontrollkulturen:** Aktivität einer Kollagenase bei 55-60 kDa (pro-MMP3/pro-MMP-13)

**Infizierte Kulturen:** Keine Aktivität eindeutig zu identifizieren.  
 Persistent infizierte DH82-Zellen mit Kaseinolyse bei 45-50 kDa (pro-MMP-12).



## 5. Diskussion

MMPs sind zinkabhängige Proteasen, die in der Lage sind, die extrazelluläre Matrix umzubauen. Sie spielen als Mediatoren bei zahlreichen neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen eine große Rolle (ROSENBERG, 2002). *In vivo* Studien weisen darauf hin, dass MMPs auch in die Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis (DLE) involviert sind (MIAO et al., 2003, GRÖTERS et al., 2005).

Die Intention der vorgelegten Arbeit war daher, den Einfluss einer Staupevirusinfektion auf die MMP- und TIMP-Expression von Dissoziationskulturen aus Gehirnen adulter Hunde zu untersuchen. Hierzu war es zunächst notwendig, eine bislang nicht beschriebene Isolierung und Reinigung adulter kaniner Gehirnzellen zu etablieren. Um die zelluläre Quelle der MMP-Expression zu untersuchen, wurde ein Protokoll zur Reinigung der Mikroglia/Makrophagen entwickelt. Diese Zellpopulation ist dahingehend von Bedeutung, als sie eine wichtige Quelle der MMP-Expression im pathologisch alterierten Gehirn darstellt (CROSS und WOODROOFE, 1999). Die Charakterisierung der adulten kaninen Gliazellen erfolgte mit Hilfe von bereits bei anderen Spezies (Maus, Ratte, Mensch) etablierten Antikörpern.

Während inzwischen zahlreiche Veröffentlichungen zur MMP-Expression von Gliazellen des Menschen, der Maus und der Ratte vorliegen (GOTTSCHALL und YU 1995; MUIR et al. 2002; LIUZZI et al., 2004) ist eine MMP-Expression beim Hund bislang nicht beschrieben worden. So bestand zunächst die Aufgabe darin, ein Expressionsmuster von MMPs in kultivierten Gliazellen zu erstellen. Hierzu wurde die MMP-Expression unter Kontrollbedingungen auf RNA- und Proteinebene zu verschiedenen Zeitpunkten in der ersten Passage der Primärkulturen bestimmt. Anschließend wurde erstmalig der Effekt der Staupevirusinfektion auf die MMP- und TIMP-Expression in Gehirnzellpopulationen des adulten Hundes untersucht.

Im folgenden wird zunächst auf die Zellausbeute der adulten Gliakulturen, die Charakterisierung der Zellen und die MMP- und TIMP-Expression der kaninen Gehirnzellen eingegangen. Abschließend wird der Einfluss der

Staupevirusinfektion auf Mischkulturen und gereinigte Mikroglia/Makrophagen-Kulturen diskutiert.

## 5.1 Zellausbeute adulter Gehirnzellkulturen

Verschiedenste Studien am Nagermodell haben gezeigt, dass die Zellausbeute und die Kultivierbarkeit glialer Kulturen sich umgekehrt proportional zum Alter der Tiere verhält (WOLSWIJK und NOBLE, 1989) Dies gilt noch mehr für den Menschen, die adulten Gliakulturen weisen gegenüber fetalen und neonatalen Zellen sehr geringe Zellzahlen und Proliferationsraten auf (YONG et al., 1988, YONG et al., 1992). Studien über kanine Gliazellen beschränken sich weitgehend auf den fetalen und neonatalen Hund (PEARCE-KELLING et al., 1991; ZURBRIGGEN et al.; 1993 MILWARD et al., 1997; ARCHER et al., 2002), während Daten adulter kultivierter Glia nur sehr spärlich existieren. STEIN et al. (2004a) isolierten adulte kanine Mikroglia *ex vivo* und untersuchten die Expression zahlreicher Antigene, eine längere Kultivierung der Zellen führten sie jedoch nicht durch. Weiterhin gibt es Arbeiten über Explantatkulturen aus Material adulter Hundehirne (GRÖNE et al., 2002). Dissoziationskulturen der Gliazellen des adulten Hundes sind kaum beschrieben. Lediglich die Isolierung olfaktorischer Hüllzellen (*Olfactory ensheathing cells*, OECs) aus dem Bulbus olfactorius ist im Rahmen von Transplantationsstudien beschrieben worden (SMITH et al., 2002; JEFFERY et al., 2005).

In der vorgelegten Arbeit wurden adulte kanine Gliazellen bis 4 Std post mortem isoliert. Die Zellausbeute betrug  $0,9 \times 10^6$  Zellen/g Gehirn und lag damit über den Werten von humanem Autopsiematerial ( $0,5 \times 10^6$  Zellen/g Gehirn; YONG et al., 1992), aber deutlich unter den Werten von humanem Biopsiematerial ( $5-10 \times 10^6$  Zellen/g Gehirn).

Die Schwankungen zwischen den Individuen waren sehr groß. So reichte die Zellzahl/g Gehirn von  $0,3 \times 10^6$  Zellen bis hin zu  $5,3 \times 10^6$  Zellen. Ein Zusammenhang zwischen dem Tialter, der isolierten Zellzahl, der Zellpopulation und dem post mortem Intervall wurde nicht festgestellt, kann aber aufgrund der geringen Zellzahl und starker interindividueller Schwankungen nicht

ausgeschlossen werden. Bei einem Hund verlief die Isolierung aufgrund bakterieller Kontamination nicht erfolgreich.

In dieser Studie gelang es nur unregelmäßig, größere Populationen von kaninen Astrozyten anzureichern. Eine Proliferation der Zellen nach der ersten Passage wurde mit den Wachstumsfaktoren CNFT und FGF-2 nicht erreicht. Diese Faktoren werden bei Rattenastrozyten als Wachstumsfaktoren angewandt (GIULIAN et al., 1986).

Ähnliche Beobachtungen machten YONG und ANTEL (1988) in den Gliakulturen adulter Menschen. Die humanen Astrozyten wiesen im Vergleich zu Astrozyten der adulten Ratte eine wesentlich geringere Proliferationsrate auf. Auch durch eine Zugabe von Wachstumsfaktoren gelang es in verschiedenen Studien nicht, diese zu steigern (NEWCORBE et al., 1992).

Im Gegensatz dazu wurde von DE GROOT et al. (1996) ein Kultivierung kryopräservierter Astrozyten beschrieben. Mit ihrer Isolierungsmethode wurde nach einer Kulturdauer von 4-6 Wochen, von anfänglich weniger als 5000 Zellen/g Gehirn eine Zellzahl von  $0.5 \times 10^6$  Zellen/g Ausgangsgewebe erreicht. Diese Zellen waren zu mehr als 98% GFAP-positive Astrozyten. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den isolierten Zellen um Vorläuferzellen handelte, die nach der zwölften Passage ausdifferenzierten und nicht weiter proliferierten.

Es lässt sich schlussfolgern, dass in der vorliegenden Versuchsreihe eine ähnliche Zellausbeute der post mortem isolierten kaninen Gehirnzellen gelang, wie sie in der Literatur für humanes Autopsiematerial beschrieben wird. Eine regelmäßige Anreicherung und Proliferation von Astrozyten wurde mit dem beschriebenen Protokoll nicht erreicht.

## 5.2 Charakterisierung der Mischkulturen, P1

Gliale Mischkulturen adulter Tiere sind eingehend bei den Nagerspezies Ratte und Maus beschrieben worden. Wie erwähnt, existieren diese Zellkulturmodelle für die Spezies Hund bisher ausschließlich für neonatale Tiere (ZURBRIGGEN et al., 1986; MILWARD et al., 1997; ARCHER et al., 2002).

In dieser Arbeit wiesen die Mischkulturen der 1. Passage im untersuchten Zeitraum wenige interindividuelle Unterschiede auf. Sie setzten sich aus antigen und morphologisch verschiedenen Zellpopulationen zusammen. Zur Charakterisierung der Zellen wurden Dil-ac-LDL und Iba1, als Marker für Mikroglia/Makrophagen, A2B5, ein Marker bipotentialer Vorläuferzellen (Oligodendrozyten, Typ-II-Astrozyten), O4, ein Oberflächenmarker prämaturer und reifer Oligodendrozyten, O1 ein Marker maturer Oligodendrozyten, GFAP, ein Intermediärfilament der Astrozyten, p75<sup>NGFR</sup> exprimiert von zahlreichen Gliazellen, und Vimentin (exprimiert von Fibroblasten und Astrozyten) verwendet.

### 5.2.1 Stark Dil-ac-LDL und Iba1 positive Zellpopulation

Eine Population der Mischkulturen waren die Dil-ac-LDL und Iba1 positiven, als Mikroglia/Makrophagen identifizierten Zellen. Sie befanden sich in den zweischichtigen Mischkulturen vorwiegend oberflächlich adhärent auf den anderen Zellen. Die Morphologie war vorwiegend amöboid und abgerundet mit entweder piliformen, wenigen µm langen Fortsätzen oder unipolar ausgerichteten bis 100 µm langen Fortsätzen.

Diese Beobachtung stimmt mit den Beschreibungen anderer Spezies überein. Die sogenannte aktivierte Form der Mikroglia wird *in vitro* direkt nach der Isolierung von zahlreichen Autoren beschrieben (GIULIAN und BAKER, 1986; SUZUMURA et al., 1990). Dies ist dadurch zu erklären, dass die Zellen durch den Zelldetritus und ins Medium sezernierte Faktoren anderer Zellen stimuliert werden. *In vivo* kommt diese Form der Mikroglia in pathologisch alteriertem Gewebe vor (STREIT, 1995).

### 5.2.2 A2B5-positive Zellpopulation

In dieser Studie wurde in den Mischkulturen der 1. Passage zu allen drei Zeitpunkten in der Kultur eine Reaktion mit A2B5 festgestellt (15,5% der Zellen). Es handelte sich bei diesen Zellen um eine morphologisch mäßig heterogene Population, die in allen untersuchten Mischkulturen regelmäßig vorkam.

Zahlreiche Studien beschreiben A2B5 als vorübergehenden Oberflächenmarker für Oligodendrozytenprogenitorzellen. Die Expression ist eingehend bei neonatalen



und adulten Vorläuferzellen von Maus, Ratte und Mensch beschrieben (LEE et al., 2003; RUFFINI et al. 2004).

*In vitro* wird neben der Entwicklung in Oligodendrozyten eine Differenzierung von A2B5-positiven Zellen in sogenannte Typ-II-Astrozyten (ANDERSSON et al., 1994; VON VISGER et al., 1994) beobachtet. Welche Bedeutung diese Bipotentialität der Zellen *in vivo* einnimmt wird kontrovers diskutiert. SCOLDING et al. (1999) konnten jedoch in der weißen Substanz adulter Menschen neben A2B5-positiven Oligodendrozytenvorläufern auch A2B5-positive Astrozyten nachweisen. Studien über die A2B5-Expression in Gehirnen von adulten Hunden sind nicht erstellt worden. *In vitro* erwähnte PEARCE-KELLING (1991) jedoch A2B5-positive Astrozyten in neonatalen Dissoziationskulturen des Hundehirns.

Die kaninen A2B5-positiven Gliazellen in der vorliegenden Arbeit zeigten keine Ko-Expression mit O4, einem weiteren Marker adulter Oligodendrozytenvorläufer. GENSERT und GOLDMANN (2003) identifizierten *in vitro* O-2A-Progenitorzellen adulter Ratten ohne O4 Expression, diese schienen bipotentielle Vorläuferzellen zu sein. Weiterhin beschrieben sie eine Population A2B5-positiver Zellen mit O4-Expression, deren Entwicklung in die Richtung der Oligodendrozytenlinie festgelegt zu sein schien. Diese Beobachtungen würden dafür sprechen, dass es sich hier um eine bipotentielle Vorläuferzelle handelt, die umgebungsabhängig zu den sogenannten Typ-II-Astrozyten oder Oligodendrozyten differenzieren kann.

In den serumfreien 4-6 Wochen alten Kulturen konnte eine Ko-Expression mit dem p75<sup>NGFR</sup> festgestellt werden. Dieser niedrig affine Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor ist beim Hund im ZNS bisher nur in einer spezialisierten Gliazellpopulation, den olfaktorischen Hüllzellen untersucht worden (SMITH et al., 2002). Diese umhüllen *in situ* die Neuriten der olfaktorischen Rezeptorneurone auf ihrem Weg zum Bulbus olfactorius (BARBER 1982, RAISMAN, 1985).

Interessant erscheint im Hinblick auf die hier detektierte Doppelmarkierung von A2B5 und p75<sup>NGFR</sup> eine Arbeit von CHANG et al. (2000). Dort wurde *in vivo* eine Ko-Expression von Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan (NG-2), einem Marker adulter Oligodendrozyten-Vorläufer und p75<sup>NGFR</sup> in periventrikulär gelegenen Zellen

nachgewiesen. CALZA et al. (1998) wiesen ebenfalls p75<sup>NGFR</sup> positive Zellen nur in der periventrikulären Zone und nicht in anderen Hirnarealen nach.

In der vorliegenden Studie wurden kanine A2B5 und A2B5/p75<sup>NGFR</sup> positive Zellen isoliert. Es ist beachtenswert, dass diese Gliazellpopulation sich vermehrte und passagieren ließ. Aufgrund der Markereexpression und der Vermehrung ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Zellen um adulte Vorläuferzellen handelt. Ausgehend von dieser Vermutung wären in Zukunft weiterführende Studien über Kulturen regionenspezifischer Gehirnproben z.B. der periventrikulären oder subkortikalen Zone von Bedeutung.

In dieser Arbeit konnte in den Mischkulturen der Infektionsversuche der Marker p75<sup>NGFR</sup> nicht untersucht werden, da die Infektionsversuche bereits abgeschlossen waren. Deshalb bleibt es spekulativ, inwieweit es sich bei den A2B5-positiven Zellen in diesen Kulturen um die gleiche Zellpopulation handelt wie die A2B5-positiven Zellen der Mischkulturen aus den Infektionsversuchen. Dies ist jedoch die erste Beschreibung A2B5- und p75<sup>NGFR</sup>-positiver vorwiegend bi- und tripolarer Zellen in Dissoziationskulturen adulter Hundehirne.

### 5.2.3 Schwach Dil-ac-LDL und GFAP-positive Zellpopulation

Eine Zellpopulation der Mischkulturen war schwach Dil-ac-LDL-positiv. Sie zeigte im Gegensatz zu der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen stark Dil-ac-LDL-positiven Population eine flächige Morphologie und eine Koexpression von Vimentin. Wie unter 5.1.2 erwähnt, zeigen sowohl Astrozyten als auch Gefäßendothelzellen *in vitro* und *in vivo* eine regulierbare Expression der Scavengerrezeptoren (HUSEMANN et al., 2002, 2003). Bei pathologischen Prozessen im Gehirn ist die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Scavengerrezeptoren der Astrozyten bekannt (HUSEMANN et al., 2002, MAGNUS, et al., 2002).

In der vorliegenden Studie war die Dil-ac-LDL Aufnahme in diesen protoplasmatischen Zellen deutlich schwächer als in den Mikroglia/Makrophagen. Möglicherweise steht dies im Zusammenhang mit den Studien von MAGNUS et al. (2002); sie verglichen *in vitro* die Phagozytose von Astrozyten und Mikroglia und wiesen eine wesentlich höhere Effizienz der Phagozytose in Mikroglia nach.

Zudem war die Phagozytose in Mikroglia durch proinflammatorische Substanzen induzierbar, während Astrozyten keine Steigerung der Phagozytose-Aktivität zeigten.

In dieser Studie könnte die schwächere Markierung dieser Zellen also auch durch eine geringere Expressiondichte oder Effizienz der Scavenger-Rezeptoren bedingt sein. Eine Ko-Expression des Astrozytenmarkers GFAP, das nur von 0,7-6,8% aller Zellen der Mischkulturen exprimiert wurde, war nicht nachweisbar. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Doppelmarkierung aufgrund der geringen Zellzahl für jede Tiernummer nur einmal durchgeführt werden konnte, so dass diese Aussage nur mit Einschränkung getroffen werden kann. Möglicherweise handelt es sich bei diesen schwach Dil-ac-LDL-positiven Zellen um Astrozyten.

Eine GFAP-Expression wiesen lediglich 4% der Zellen in den Mischkulturen auf. Das intermediäre Strukturfilament GFAP wird im ZNS als der Marker für Astrozyten angesehen (BIGNAMI et al., 1972).

Im vorliegenden Versuch besaßen die GFAP-positiven Zellen eine teils fibrilläre, teils flächige Morphologie mit wenigen bis zahlreichen Fortsätzen und einem großen ovalen Zellkern. Diese heterogene und wandelbare Morphologie beschrieben ebenfalls YONG et al. (1992) in adulten Astrozytenkulturen des Menschen. Auch *in vivo* besitzen die Astrozyten eine von ihrer anatomischen Lage und von ihrer Funktion abhängige Gestalt (PETERS et al., 1991; MILLER et al., 1994).

GFAP-positive Astrozyten konnten lediglich bei zwei Präparationen in serumfreien Kulturen nach 3-4 Wochen angereichert werden. Eine Vermehrung der Astrozyten auch mit verschiedenen Wachstumsfaktoren war in der Sekundärkultur jedoch nicht erfolgreich. Ähnliche Beobachtungen machten YONG et al. (1988) und NEWCOMBE et al. (1992): Die aus Gehirnbiospien/Autopsien adulter Menschen gewonnenen Astrozytenkulturen proliferierten auch nach Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht.

Als weitere Möglichkeit muß erwogen werden, dass es sich bei der schwach-Dil-ac-LDL positiven Zellpopulation um GFAP-negative Astrozyten handelt. So beschreiben verschiedene Autoren unter bestimmten Kulturbedingungen eine

Population GFAP-negativer protoplasmatischer Astrozyten (GIFFARD and SWANSON, 2005). Eine andere Erklärung wäre, dass der monoklonale Antikörper aus der Maus, nur eine Subpopulation der kaninen GFAP-exprimierenden Astrozyten erkennt. Ein weiterer monoklonaler, gegen die Maus gerichteter GFAP-Antikörper, zeigte jedoch keine Reaktion mit kaninen Astrozyten. Ein in der Immunhistologie routinemäßig verwandter polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen zeigte in Vorversuchen unspezifische Reaktionen (persönliche Beobachtungen).

### 5.3 Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen, P1

Die gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Die Methode war demnach effizient und führte bei allen acht Präparationen regelmäßig zu einer 91,5%-97% reinen Population. Gleiche Beobachtungen machten GIULIAN und BAKER (1986), die Mikroglia der Ratte mit einer ähnlichen Methode erfolgreich anreicherten. Auf den Plastikböden der Zellkulturplatten wiesen die Zellen zum Teil eine aktivierte, abgerundete Form, zum Teil aber auch eine ramifizierte Form auf. Diese heterogene Morphologie der Mikroglia wird auch in der Literatur beschrieben (DE GROOT et al., 1992; DAVIS et al., 1994) und scheint von den Kulturbedingungen beeinflusst zu sein. Die ramifizierte Form der Mikroglia ist charakteristisch für das adulte, gesunde Gehirn (DEL RIO-HORTEGA, 1932; GIULIAN und BAKER, 1986).

Zur antigenen Charakterisierung der Zellen wurden die Aufnahme von Dil-ac-LDL und ein gegen das ionisierte-Kalzium-bindende Adaptermolekül-1(Iba1) gerichteter Antikörper verwendet. Dil-ac-LDL wird neben anderen lipophilen Substanzen von den Scavengerrezeptoren SR-A und SR-B gebunden. SR-A und SR-B sind Oberflächenproteine und vermitteln Zelladhäsion und die Endozytose verschiedener Substanzen; sie haben Anteil an der intrazellulären Signaltransduktion, dem Lipidstoffwechsel und der körpereigenen Abwehr. Die Expression von SR-A und SR-B ist in verschiedenen Gehirnzellpopulationen induzierbar. So ist die Expression neben Mikroglia auch in Makrophagen, Astrozyten, zerebralen, mikrovaskulären Gefäßendothelzellen und Zellen der glatten Arterienmuskulatur (ZHOU et al., 1996, HUSEMANN et al., 2001, 2002;) beschrieben. Perivaskulär gelegene Mikroglia, bekannt als Mato-Zellen, exprimieren ebenfalls diese Rezeptoren und man vermutet aufgrund ihrer Eigenschaften, dass sie eine wichtige Rolle im System der Blut-Hirn-Schranke einnehmen (MATO et al., 1996). *In vivo* wird die Expression der Rezeptoren entwicklungsabhängig reguliert und ist in Mikroglia nur neonatal nachweisbar (HUSEMANN et al., 2001). *In vitro* ist sie ebenfalls in neonataler Mikroglia

nachweisbar und durch verschiedene Amyloide, Lipopolysaccharide, IL-1 $\alpha$  und andere stimulierbar (GIULIAN und BAKER, 1986; PARESCIE et al., 1996; GREWAL et al., 1997).

Hingegen gibt es keine Daten zur Expression der Scavengerrezeptoren kaniner adulter Mikrogliazellen. Astrozyten zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine regulierbare Expression der Scavengerrezeptoren (HUSEMANN et al., 2002). Adulte Makrophagen exprimieren *in vitro* beide Scavengerrezeptoren (GIULIAN und BAKER, 1986; PARESCIE et al., 1996).

Zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung von Dil-ac-LDL-positiven Zellen anderer Herkunft wurde ein Antikörper gegen Iba1 verwendet. In Gehirnen von Ratte, Maus und Mensch wird Iba1 spezifisch von Mikroglia/Makrophagen exprimiert und reagiert nicht mit Astrozyten (IMAI et al., 1996). Da die starke Dil-ac-LDL-Markierung in den benachbarten Fluoreszenzkanal stahlte, war eine Doppelmarkierung mit diesen beiden Markern aus technischen Gründen nicht eindeutig auswertbar. In den gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen waren jedoch regelmäßig > 92% der Zellen mit beiden Markern positiv. Weiterhin konnte in den gereinigten Kulturen eine Phagozytose von magnetischen Partikeln nachgewiesen werden. Die phagozytierenden Zellen waren deutlich abgerundet, hypertrophisch und wiesen verkürzte Fortsätze auf. Diese Morphologie ist wiederum ein Ausdruck der phänotypischen Heterogenität der Mikroglia und wird von verschiedenen Autoren beschrieben (LEONHARDT, 1990; SCHULZ, 1991). Die Phagozytose dieser magnetischen Partikel (*beads*) ist bei anderen Spezies beschrieben worden (FROYSTAD et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis der Aufnahme von Dil-ac-LDL, Iba1, und der Phagozytose von magnetischen Partikeln erbracht. Die Zellen waren sowohl adhären auf unbeschichteten Platten als auch auf der PLL-Beschichtung der Mischkulturen. Diese antigenen und funktionellen Eigenschaften ermöglichten es, die Zellpopulation als Mikroglia/Makrophagen zu identifizieren.

Die isolierte kanine Zellpopulation vermehrte sich in der Primärkultur auf den Zellen in der Mischkultur und war sowohl auf den PLL-beschichteten als auch auf den

unbeschichteten Platten adhärent. GIULIAN und BAKER (1986) beobachteten ähnliche Eigenschaften bei Mikroglia, nicht jedoch bei Makrophagen-Kulturen.

Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass es sich bei der gereinigten Zellpopulation überwiegend um im ZNS residente Mikroglia und nicht um Makrophagen handelt. Eine sichere Unterscheidung zwischen Mikroglia und kontaminierenden Makrophagen aus zerebralen Gefäßen konnte jedoch anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht getroffen werden.

STEIN et al. (2004a) beschrieben bei den isolierten kaninen Mikrogliazellen mittels Durchflußzytometrie eine niedrige Expression der Oberflächenrezeptoren CD 14, CD 44 und CD 45, während Makrophagen eine hohe Expression dieser Antigene aufwiesen. Die Untersuchung des Expressionsmusters dieser Antigene könnte weitere Erkenntnisse über die in der vorgelegten Arbeit isolierten kaninen Zellen bringen.

#### **5.4 MMP- und TIMP-Expression in kaninen Gehirnzellpopulationen**

Ein Ziel der Untersuchungen war die Erstellung eines MMP-Expressionsmusters in kaninen, glialen Zellkulturen. Auf Transkriptionsebene wurden MMP-2, -9, -12, -13, und -14 sowie die Inhibitoren der MMPs TIMP-1 und TIMP-2 nachgewiesen. Diese Beobachtungen sind weitgehend in Übereinstimmung mit den MMP-Expressionen in Gliakulturen von Mensch, Maus und Ratte (MUIR et al., 2002; ROSENBERG et al., 2002; LIUZZI et al., 2004).

Neben der Transkription wurde eine proteolytische Aktivität der Zymogene MMP-2, MMP-9 und MMP-12 sowie einer nicht identifizierten Protease bei 55-60kDa nachgewiesen. Eine Aktivität der aktiven Formen von MMP-2 und MMP-9 fand sich in den nicht-infizierten Kulturen mit einer Ausnahme nicht. Dies ist in Übereinstimmung mit zahlreichen *in vitro* Studien, die eine konstitutive Expression der Proenzyme der Gelatinasen, nicht jedoch der aktiven Formen zeigten (GOTTSCHALL und YU, 1995; LIUZZI et al., 2004). Die Identifizierung der MMPs erfolgte im Western-Blot. Hier wurden MMP-9, -12 und MMP-13 nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde bis 96 Std nach der Isolierung zu drei verschiedenen Zeitpunkten eine konstante Expression von MMP-2, MMP-12, MMP-13, MMP-14 und TIMP-1 beobachtet. Lediglich MMP-9 in den Mischkulturen und TIMP-2 in den Mikroglia/Makrophagen-Kulturen wiesen starke Schwankungen im Kulturverlauf in der Expression auf. Daraus ist zu schließen, dass die Kulturdauer keinen Einfluss auf die Expression der meisten MMPs hatte. Einflüsse der Kulturdauer auf die MMP-Expression sind in glialen Zellen wenig beschrieben. Um Effekte einer möglichen Stimulierung zu interpretieren, ist es jedoch wichtig, die Basisexpression zu verschiedenen Zeitpunkten zu kennen.

#### **5.4.1 Vergleich der MMP- und TIMP-Expression der Mischkulturen (Gruppe A) und der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B)**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Mischkulturen (Gruppe A) mit und ohne Mikroglia/Makrophagen eine geringere MMP-Expression aufwiesen, als die gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B).

In den Kulturen der Gruppe A waren MMP-14 und MMP-12 hoch exprimiert, während MMP-2 und TIMP-2 eine mittlere Expression zeigten, und MMP-9, MMP-13 und TIMP-1 niedrig exprimiert waren.

Dieses Expressionsmuster weist Ähnlichkeiten mit dem Expressionsmuster in neonatalen und adulten Astrozytenkulturen sowie Oligodendrozytenkulturen auf. *In vitro* wurde in Astrozytenkulturen vornehmlich eine konstitutive Expression von MMP-2 beschrieben, während MMP-9 induzierbar war (CROSS und WOODROOFE, 1999). LARSEN und YONG (2004) zeigten, dass Oligodendrozytenvorläufer vornehmlich MMP-12 exprimierten und dass MMP-12 neben MMP-9 eine wichtige Rolle in der Ausdifferenzierung zur reifen O1-positiven Zelle besaß.

Möglicherweise sind die A2B5-positiven Zellen eine Quelle der MMP-12-Expression. Es ist zu bedenken, dass auch die Gruppe B (Mikroglia/Makrophagen) MMP-12 exprimierte. Da jedoch die Gruppe A ohne Mikroglia/Makrophagen eine höhere MMP-12 Expression aufwies, als die Gruppe A mit Mikroglia/Makrophagen, schienen auch andere Zellen MMP-12 zu exprimieren.



Die Kulturen der Gruppe B<sub>ohne</sub> exprimierten signifikant mehr MMP-9, MMP-12, und MMP-14 als die Kulturen der Gruppe A. Diese Beobachtungen sind ähnlich den Angaben in der Literatur. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* werden Mikroglia/Makrophagen als die Hauptquelle der MMP-9 und MMP-12 (Makrophagen-Elastase) Synthese beschrieben. Dies gilt insbesondere nach Aufregulierung bei neuroinflammatorischen Prozessen (GOTTSCHELL et al., 1995; VOS et al., 2003; TOFT-HANSEN et al., 2004).

Bezüglich der Expression von MMP-2, MMP-13, TIMP-1 und TIMP-2 waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vorhanden. Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur. So wird eine konstitutive MMP-2-Expression sowohl von Astrozyten als auch von Mikroglia, Makrophagen, Neuronen und Gefäßendothelzellen beschrieben (APODACA et al., 1990; GOTTSCHELL und YU, 1995; HUMMEL et al., 2000; VECIL et al., 2000).

Innerhalb der Gruppe A (Mischkulturen mit und ohne Mikroglia/Makrophagen) wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Dies liegt vermutlich daran, dass der Anteil der Mikroglia/Makrophagen in Gruppe A nur 14% ausmachte, und die Kulturen ansonsten gleicher Herkunft waren.

In den Zellkulturüberständen der Mischkulturen und der Mikroglia/Makrophagenkulturen fanden sich die Gelatinasen pro-MMP-2 und pro-MMP-9. Hier ist aber zu beachten, dass die proteolytische Aktivität der beiden Gelatinasen nicht 1:1 ins Verhältnis zur Proteinmenge gesetzt werden kann, sondern dass MMP-9 eine bis zu 25fache gelatinolytische Aktivität von MMP-2 aufweist (LEPPERT et al., 1995). In der Literatur wird in gereinigten Astrozytenkulturen vorwiegend eine konstitutive gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-2 beschrieben (GOTTSCHELL und YU, 1995; LIUZZI et al. 1999). Bei den Kulturen der vorliegenden Arbeit handelte es sich um Mischkulturen, so dass einer erhöhten konstitutiven gelatinolytischen Aktivität von pro-MMP-9 vermutlich eine Expression der anderen glialen Zellen wie Mikroglia, Makrophagen und den A2B5-positiven Zellen zugrunde liegt (CROSS und WOODROOFE, 1999; LARSEN und YONG, 2004). Die Mikroglia/Makrophagen-Kulturen hingegen wiesen eine deutliche gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 auf, während pro-MMP-2 nicht

gleichmäßig exprimiert war. Dieses Muster der vorherrschenden gelatinolytischen Aktivität von pro-MMP-9 in Mikroglia-kulturen beschrieben auch GOTTSCALL und YU (1995) und CROSS und WOODROOFE (1999).

#### **5.4.2 Vergleich der MMP- und TIMP-Expression der Mikroglia/Makrophagen (Gruppe B) unter verschiedenen Kulturbedingungen**

Ein weiteres Ziel bestand darin, den Einfluß von konditioniertem Medium auf die MMP-Expression zu untersuchen. Hierzu wurden zwei Systeme verwendet. Ein Teil der Kulturen der Gruppe B wurde nur mit Sato's Medium kultiviert (Gruppe B<sub>ohne</sub>) ein Teil mit präkonditioniertem Medium (Gruppe B<sub>Kond</sub>) und ein weiterer Teil im Transwell-System (Gruppe B<sub>Kokultur</sub>) mit Mischkulturen ohne Mikroglia/Makrophagen.

Die Expression von MMP-2 und TIMP-2 war unter den verschiedenen Kulturbedingungen konstitutiv und nicht auf/abreguliert. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der verbreiteten Annahme, dass MMP-2 vorwiegend konstitutiv exprimiert wird (MATRISIAN, 1994). VECIL et al. (2000) stellten in Astrozyten/Neuronenkulturen ebenfalls eine konstitutive Expression von MMP-2 fest.

MMP-9 war in der Gruppe B<sub>Kokultur</sub> signifikant höher exprimiert als in der Gruppe B<sub>ohne</sub>. Einflüsse der Kulturbedingungen auf die MMP-Expression sind nur wenig untersucht. Einen Einfluß auf die MMP-9 Expression wiesen MASSENGALE et al. (2002) nach. Demnach beeinflusst die Kohlenhydratquelle im Medium die Stimulierbarkeit der Zellen.

Einflüsse einer Kokultur von Zellen auf die MMP-Expression sind in Mäusefibroblastenkulturen in Kokultur mit epithelialen Tumorzellen untersucht worden. In einer Studie wurde wie im vorliegenden Versuch eine Kokultur von Zellen im Transwell-System untersucht, bei der kein zellulärer Kontakt möglich war, sondern die Zellpopulationen sich das Medium und damit die löslichen Substanzen teilten (SELVERY et al., 2004). Sie fanden keinen Einfluß auf die Expression von MMP-14 und MMP-11.

Gegensätzliche Beobachtungen machten POLETTE et al. (1997). In der Arbeit wurde in Fibroblastenkulturen eine erhöhte Expression von MMP-14 durch präkonditioniertes Medium von invasiven Tumorzellen nachgewiesen.

Im vorliegenden Versuch war zwischen den Gruppen  $B_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{Kond}}$  ein stimulierender Einfluß des präkonditionierten Mediums nur bei der Expression von TIMP-1 feststellbar. TIMP-1 wurde wahrscheinlich durch im präkonditionierten Medium Substanzen signifikant aufreguliert.

SURYADEVARA et al. (2003) wiesen nach, dass TIMP-1 durch IL-1 $\beta$  induzierbar war. Inwieweit nun das Vorkommen von IL-1 $\beta$  in dem präkonditionierten Medium zu einer Aufregulierung führt, bleibt spekulativ. In der Literatur wurde beschrieben, dass Astrozyten-Kulturen insbesondere nach Stimulierung eine IL-1 $\beta$  Produktion aufweisen (ANDERSON et al., 2005).

Die Gruppen  $B_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{Kond}}$  zeigten eine signifikant höhere Expression von MMP-12 und MMP-14 als die Gruppe  $B_{\text{Kokultur}}$ . Diese Unterschiede sind möglicherweise auf suboptimale Kulturbedingungen zurückzuführen. Es ist bekannt, dass Mikroglia/Makrophagen eine selektive Plastikadhärenz besitzen (GIULIAN und BAKER, 1986). Möglicherweise bot der poröse Polykarbonateinsatz den Mikroglia/Makrophagen im Transwellsystem, im Vergleich zu dem Plastikboden in der Gruppe  $B_{\text{Kond}}$  und  $B_{\text{ohne}}$  schlechte Adhäsionsmöglichkeiten. Dies könnte zu einer Herabregulierung von MMP-12 und MMP-14 geführt haben.

Die Gruppen  $B_{\text{Kokultur}}$  und  $B_{\text{Kond}}$  nicht jedoch die Gruppe  $B_{\text{ohne}}$  wiesen eine signifikant höhere MMP-9-Expression auf, als die Gruppe  $A_{\text{Kokultur}}$ . Dies könnte auf eine Aufregulierung von MMP-9 unter Einfluß des konditionierten Mediums hinweisen.

Eine Induktion der MMP-9-Expression ist unter Einfluß verschiedener Zytokine und anderer proinflammatorischer Substanzen gezeigt worden (GOTTSCHELL et al., 1995; CROSS und WOODROOFE 1999; LIUZZI et al., 2004). Auf die anderen MMPs schien weniger das konditionierte Medium, und damit die von den Mischkulturen sezernierten löslichen Substanzen Einfluß auf die MMP-Expression zu haben, als die Adhäsionsbedingungen.

Aus diesen Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass das konditionierte Medium der Mischkulturen lediglich auf die TIMP-1-Expression einen stimulierenden Einfluß besaß. Außerdem boten die Einsätze des Transwellsystems den Mikroglia/Makrophagen vermutlich suboptimale Wachstumsbedingungen, was zu einer Herabregulierung der MMP-12 und MMP-14 Aktivität führte.

## **5.5 Zelltropismus des Staupevirus und zytopathogener Effekt der Infektion**

In den durchgeführten Infektionsversuchen waren in den Mischkulturen 72 Std nach der Virusinokulation 15% der Zellen infiziert. Diese Zellen wiesen ein flächiges Zytoplasma auf, und waren fast ausschließlich Vimentin-positiv. Vereinzelt waren auch A2B5-positive Zellen (1% der infizierten Zellen) GFAP-positiv und Dil-ac-LDL-positiv (jeweils <0,1% der infizierten Zellen) infiziert.

Es ist aus zahlreichen *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen bekannt, dass Astrozyten die Hauptzielzelle der Staupevirusinfektion sind (ZURBRIGGEN et al., 1987; MUTINELLI et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit waren nur 4% der Zellen eindeutig als GFAP-exprimierende Astrozyten zu identifizieren. Eine Infektion von GFAP-exprimierenden Zellen wurde in den Mischkulturen nur vereinzelt nachgewiesen. Es liegt nahe, dass der Hauptgrund vor allem in der geringen Zahl der GFAP-positiven Zellen in der Kultur war. Vimentin wird als Strukturfilament sowohl von Astrozyten, Fibroblasten als auch von anderen mesenchymalen Zellen exprimiert. Auch nach der Staupevirusinfektion war keine verstärkte GFAP-Expression der Vimentin-positiven Zellpopulation vorhanden. Dies steht wiederum im Gegensatz zu den Beobachtungen von ZURBRIGGEN et al. (1987), die nach der Infektion eine Konzentration der GFAP-Expression in dem perinukleären Bereich der Zellen feststellten. Diese Astrozyten stammten jedoch aus Präparationen neonataler Tiere, so dass ein Vergleich aus diesem Grunde nur bedingt möglich ist. PEARCE-

KELLING et al. (1991) und GRÖNE et al. (2000) wiesen *in vitro* neben der Infektion von Astrozyten auch eine Infektion von Fibroblasten nach.

Es ist nicht zweifelsfrei zu klären, inwieweit es sich bei den infizierten Vimentin-positiven Zellen um Astrozyten oder Fibroblasten handelt. Die Vimentin-Expression wird in aktivierten Astrozyten ebenso wie GFAP aufreguliert.

Der zytopathogene Effekt der Staupevirusinfektion äußerte sich insbesondere in einer Synzytienbildung und anschließender Lyse der Zellen und setzte vier Tage nach der Infektion ein.

Die Synzytienbildung ist ein typischer Effekt einer Morbillivirusinfektion (APPEL und GILLESPIE, 1972). PEARCE-KELLING et al. (1991) und ZURBRIGGEN et al. (1987) fanden nach Infektion kaniner Gehirnzellkulturen mit attenuierten Staupestämmen im Gegensatz zu den virulenten Stämmen neben einer Riesenzellbildung eine Zytolyse der infizierten Zellen 14 Tage nach der Infektion. Die Infektion mit virulenten Staupevirusstämmen führte hingegen zu einer persistenten Infektion der Gehirnzellkulturen. Der CPE bestand in einer Synzytienbildung; eine Lyse der Zellen war jedoch auch 4 Wochen nach der Infektion nicht zu beobachten.

Diese Situation spiegelt die *in vivo* Situation im Rahmen der demyelinisierenden Staupevirusenzephalitis wider. Die Verwendung virulenter Stämme erscheint insbesondere dann sinnvoll, wenn es um Untersuchung von späten Effekten der Staupevirusinfektion geht. In den durchgeführten Versuchen wurde jedoch der frühe Einfluß der Virusinokulation und Infektion auf die MMP-Expression untersucht. Eine Synzytienbildung und Lyse der Zellen fand sich 24 Std nach der Infektion nicht und 72 Std nach der Infektion nur vereinzelt.

Die Kulturen wurden bis 6 Tage nach der Infektion beobachtet. Eine Lyse mit Ausbildung von Varikositäten in Zytosol und Fortsätzen lag 5 Tage nach der Infektion bei Vimentin-positiven, sowie A2B5 und p75<sup>NGFR</sup> positiven Zellpopulationen vor. Wie unter 5.2.2 erwähnt, bleibt es spekulativ, inwieweit es sich bei den A2B5 positiven Zellen um Oligodendrozytenvorläufer handelt. Eine Ko-Expression von p75<sup>NGFR</sup> und NG2, einem Marker für Oligodendrozytenvorläufer ist jedoch bei Oligodendrozytenvorläufern beschrieben worden (PETRATOS et al.,

2004). Eine Infektion mit CDV von bipolaren Galactozerebrosid (GC)-positiven Oligodendrozytenvorläuferzellen beschrieb PEARCE-KELLING et al. (1991).

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit und von PEARCE-KELLING et al. (1991) sind eine interessante Beobachtung im Hinblick auf den Zelltropismus im Rahmen der Staupevirusinfektion. Bei verschiedenen *in vitro* Studien konnte in multipolaren kaninen Oligodendrozyten keine Staupevirusproteinexpression nachgewiesen werden (VANDEVELDE, 1985; ZURBRIGGEN et al., 1986, 1987, PEARCE-KELLING et al., 1991). Dies entspricht *in vivo* Studien, die bei erkrankten Tieren kein Staupevirusprotein in Oligodendrozyten nachwiesen. (VANDEVELDE et al., 1983).

Wie erwähnt, ist fast ausschließlich eine restriktive Infektion der multipolaren Oligodendrozyten beschrieben worden (ZURBRIGGEN et al., 1993). Im Zusammenhang mit dieser wurde eine starke Herabregulierung verschiedener Myelin-assoziiierter Gene beobachtet (GRABER et al., 1995; ZURBRIGGEN et al., 1998). Schobesberger et al. (1999) zeigten mit virulenten Staupevirusstämmen, dass die restriktive Staupevirusinfektion zu einer langsamen morphologischen Änderung der Oligodendrozyten führte, und nicht zu Apoptose und Nekrose der Zellen. Die Degeneration setzte an den Ausläuferenden der Zellen ein und führte zu einem Verlust der multipolaren Zellform. Diese Beobachtungen ließen sie folgern, dass ein virusinduziertes metabolisches Ungleichgewicht mit Herabregulierung von Myelinen die initiale Phase der Demyelinisierung bestimmt.

In der vorgelegten Studie ließen sich bipolare gliale Vorläufer gut infizieren und zeigten Zytolyse, jedoch keine Synzytienbildung. Diese Beobachtungen liefern möglicherweise neue Aspekte in den Zelltropismus des Staupevirus. Es ist denkbar, dass sich die hier infizierte Population von Vorläuferzellen in einer für das Virus empfänglichen Phase befindet.

Dies ist für andere Viren wie das murine Theilervirus beschrieben worden (O'SHEA et al., 1997). In glialen Kulturen induzierte das Theilervirus lediglich eine Zytolyse bipolarer A2B5-positiver Vorläuferzellen während ausdifferenzierte

Oligodendrozyten eine relativ Resistenz gegenüber dem virusinduzierten Zelltod zu besitzen schienen.

Zur Bestätigung dieser Untersuchungen muß eine weitere Charakterisierung der Zellen erfolgen. Eine Differenzierung der Zellen zu O4-positiven, multipolaren Oligodendrozyten wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet.

## **5.6 Staupevirus-induzierte Aufregulierung der MMP-2, MMP-9 und MMP-13-Expression in den Mischkulturen**

Die Staupevirusinfektion führte zu einer signifikanten Aufregulierung von MMP-2-, MMP-9- und MMP-13-mRNA in den Mischkulturen. Der Anstieg der MMP-2 Expression war nur auf Proteinebene signifikant. 24 Std p.i. fand sich ein 1,6facher (1,4-17facher) Anstieg der gelatinolytischen Aktivität von pro-MMP-2. Weiterhin konnte in den infizierten Kulturen im Gegensatz zu den nicht infizierten Kulturen eine gelatinolytische Aktivität des aktiven Enzyms (MMP-2) regelmäßig nachgewiesen werden.

Diese Aufregulierung der MMP-2-Expression wird in der Literatur in Astrozytenkulturen nach Zugabe proinflammatorischer Substanzen beschrieben. Ähnliche Ergebnisse finden sich bei GOTTSCHALL und YU (1995) und MUIR et al. (2002). Demnach wird die MMP-2-Protein-Expression in Astrozytenkulturen nach Stimulierung mit IL-1 und LPS aufreguliert. Auch in Endothelzellen wurde eine Expression von MMP-2 und MMP-3 beschrieben (HUMMEL et al., 2002).

Nach Staupevirusinfektion wurde eine Aufregulierung von pro-MMP-2 in immunhistologischen Untersuchungen beschrieben. MIAO et al. (2003) fanden eine erhöhte pro-MMP-2 Expression in Staupe-assoziierten Gehirnläsionen in zahlreichen Gliazellpopulationen (Astrozyten, Gemistozyten, Mikroglia, Zellen des Plexus chorioideus, infiltrierenden perivaskulären monozytären Zellen und Gefäßwandzellen).

Im Gegensatz dazu war eine pro-MMP-2-Expression in Gehirnen gesunder Hunde lediglich in protoplasmatischen Astrozyten und Purkinje-Zellen vorhanden. Auch bei der Pathogenese der MS spielt eine frühe Aufregulierung von MMP-2 eine Rolle. In frühen ZNS-Läsionen (demyelinisierten Herden) von MS-Patienten wurde

eine erhöhte MMP-2-Protein-Expression mittels Immunhistologie und qPCR nachgewiesen (CUZNER et al., 1996; LINDBERG et al., 2001).

MMP-2 wird sowohl eine Beteiligung an der Modulierung der Öffnung der Blut-Hirnschranke als auch eine Beteiligung an reparativen Prozessen zugesprochen. Rosenberg et al. (2001) zeigten, dass eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke unter anderem über die MMP-2-Produktion der Astrozyten-Endfortsätze und Endothelzellen reguliert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem eine gelatinolytische Aktivität der aktiven Form von MMP-2 nachgewiesen. In den nicht-infizierten Kulturen war aktives MMP-2 nicht nachweisbar.

Die Aktivierung von pro-MMP-2 wird unter anderem über das Verhältnis von TIMP-2 zu MMP-14 reguliert (HERNANDEZ-BARRANTES et al., 2000). In den nicht-infizierten Kulturen der vorliegenden Studien betrug das MMP14/TIMP-2 Verhältnis 5,4:1 gegenüber einem Verhältnis von 9,5:1 (7,1-15,9) in den infizierten Kulturen. Eine Erklärung für die beobachtete Aktivierung von MMP-2 ist also, dass nicht nur eine geringe TIMP-2-Expression, als viel mehr ein verändertes MMP-14/TIMP-2 Verhältnis zur Aktivierung von pro-MMP-2 führte.

Ein weiteres Ergebnis war die 700%ige Aufregulierung von MMP-9-mRNA 24 Std p.i., 72 Std nach der Infektion war auf RNA-Ebene keine Erhöhung der MMP-9-Expression mehr feststellbar, während die gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 72 Std nach der Infektion signifikant erhöht war.

Aufgrund der Ergebnisse kann angenommen werden, dass die erhöhte gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 auf eine erhöhte Transkription zurückzuführen war. Dies ist in Übereinstimmung mit zahlreichen *in vitro* Untersuchungen der MMP-Expression nach Stimulierung. So wiesen z.B. MUIR et al. (2002) und LIUZZI et al. (2004) nach, dass eine Stimulierung mit verschiedenen proinflammatorischen Substanzen wie IL-1 und LPS *in vitro* zu einer Aufregulierung der MMP-Expression auf Transkriptionsebene führte. LEE et al. (2003) konnten nachweisen, dass an der Regulierung der Transkription von MMP-9 die Proteinkinase C beteiligt ist.



Auch in der Frühphase der CDV-Infektion ist *in vitro* in kaninen Gehirnzellkulturen und permanenten Zelllinien eine Aufregulierung von proinflammatorischen Zytokinen beobachtet worden (GRÖNE et al., 2003). Die Vermutung einer durch Zytokine induzierten Aufregulierung der MMPs liegt nahe. In zahlreichen Untersuchungen wurde jedoch nicht nur eine zytokinabhängige Aufregulierung der MMPs beschrieben, sondern im Gegenteil auch eine Induktion der Zytokinexpression durch MMPs (BLACK et al., 1997, CUZNER und OPDENAKKER 1999, HARTUNG und KIESEIER, 2000). Die Aufregulierung von MMPs und Zytokinen steht also in einem komplexen Verhältnis, es scheint offensichtlich keine einseitige Ursache-Folge Beziehung zu bestehen, sondern vielmehr eine wechselseitige Triggerwirkung.

Die *in vitro* Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit den Untersuchungen an Gehirnen von Hunden mit akuten Staupeläsionen. MIAO et al. (2003) zeigten in immunhistologischen Untersuchungen, dass MMP-9 neben anderen MMPs insbesondere in frühen Läsionen aufreguliert war. GRÖNE et al. (2000) und MARKUS et al. (2002), beschrieben eine Aufregulierung von proinflammatorischen Interleukinen (IL6, TNF-alpha).

Die Studien von MIAO et al. (2003) und die vorliegende Arbeit zeigen, dass eine Aufregulierung der Transkription von MMP-9 und der Proteinexpression sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine wichtige Rolle in der Frühphase der Staupevirusinfektion zu spielen scheint. Dieses Phänomen teilt die Staupevirusinfektion mit anderen demyelinisierenden Erkrankungen, insbesondere der MS und dem Tiermodell der Experimentellen Allergischen Enzephalomyelitis (EAE) der Maus. Die MMP-9-Transkription und die Proteinexpression sind sowohl in frühen als auch in späten MS -Läsionen aufreguliert (BEVER und ROSENBERG, 1999; LINDBERG et al., 2001). Dies ist insofern von Bedeutung, als MMP-2 und MMP-9 eine wichtige Rolle bei der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke zugewiesen wird (STUVE et al., 1996, ROSENBERG et al., 2002). So zeigen verschiedene Transmigrationsmodelle mit MMP-Inhibitoren, wie z.B. TIMP-2, einem Inhibitor für MMP-2, eine verminderte Migration von Entzündungszellen ins Gehirn (ROSENBERG et al., 1992).

Kontrovers zu diesen Untersuchungen sind zum Teil die Ergebnisse von GROETERS et al. (2005). Hier wurde mittels *in situ*-Hybridisierung eine Aufregulierung von MMP-9-mRNA vor allem in subakuten und chronischen Läsionen beobachtet, während es in den frühen Läsionen nur zu einer leichten Aufregulierung von MMP-9 kam. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die MMP-Expression zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Virusinokulation untersucht, so dass diese sehr frühe Aufregulierung möglicherweise *in vivo* in den akuten Läsionen nicht mehr beobachtet werden kann. Die erhöhte MMP-9-Expression in chronischen Läsionen ist möglicherweise also eine zweite Aufregulierung der MMP-Expression.

In der vorliegenden Studie fand sich in den Mischkulturen neben einer Aufregulierung von MMP-9 auch eine signifikante Erhöhung der MMP-13-mRNA-Expression 24 Std p.i. MIAO et al. (2003) beschrieben ebenfalls eine erhöhte MMP-13 Expression in Gehirnen mit frühen Staupeläsionen.

Im Gegensatz dazu scheint bei der MS des Menschen und dem Tiermodell EAE MMP-13 keine Rolle im entzündlichen und demyelinisierenden Geschehen einzunehmen. Bei anderen neuropathologischen Krankheitsprozessen wird jedoch in der initialen Phase der Entzündungsprozesse eine Aufregulierung von MMP-13 beschrieben. Bei der bakteriellen Meningitis und bei ischämischen Prozessen wird MMP-13 neben MMP-9 aufreguliert und scheint an den initialen inflammatorischen Prozessen beteiligt zu sein (ROSELL et al., 2005; KIESEIER et al., 1999). MMP-13 ist in der Lage, Kollagen IV, verschiedene andere Kollagene und auch Gelatine zu spalten. Es wird daher angenommen, dass dieses Enzym an der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke bei inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (CAWSTON, 1998, KIESEIER et al., 1999, ROSELL et al., 2005).

Außerdem ist MMP-13 durch Abspalten der Propeptidregion in der Lage, MMP-9 zu aktivieren (OKADA et al., 1992; KNAUPER et al., 1997). Eine gelatinolytische Aktivität von MMP-9 konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Aktivität von MMP-9 unterliegt jedoch noch weiteren Regulationsmechanismen.

Ein Ergebnis der Infektionsversuche war eine Aufregulierung von TIMP-1 in den Mischkulturen 24 Std p.i. TIMP-1 als wichtiger endogener Inhibitor von MMP-9

bindet in nicht -kovalenter Bindung im 1:1 Komplex an MMP-9 und hemmt dadurch die Aktivität der Protease.

In der vorgelegten Studie wurde nach Virusinfektion eine Aufregulierung von pro-MMP-2 und pro-MMP-9 und MMP-13 durch eine erhöhte Transkription nachgewiesen. Neben dieser Regulierung auf mRNA-Ebene erfolgte eine Induktion der gelatinolytischen Aktivität von MMP-2. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in weitgehender Übereinstimmung mit *in vivo*-Protein-Nachweisen an Gehirnen Staupe erkrankter Tiere. Die Staupevirusinfektion der Gehirnzellkulturen zeigte in Übereinstimmung mit anderen demyelinisierenden Erkrankungen wie der MS des Menschen eine frühe Aufregulierung von MMP-2 und MMP-9 (CUZNER et al., 1996; LINDBERG et al., 2001). MMP-2, MMP-9 und MMP-13 sind bekannt für die regulierende Beteiligung an der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke in neuroinflammatorischen und degenerativen Prozessen. Die vorgelegten *in vitro* Studien weisen auf eine initiale Rolle dieser Proteasen im Rahmen der DLE hin.

## **5.7 Nach Infektion in Mischkulturen konstitutiv exprimierte MMPs und TIMPs**

Die Expression von MMP-12 und MMP-14 war weder in den infizierten Mischkulturen noch in den infizierten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen signifikant aufreguliert. Diese Beobachtung ist nicht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der immunhistologischen Studien von MIAO et al. (2003), die eine starke Aufregulierung der MMP-12-Expression bei subakuten Staupelesionen beobachteten.

MMP-12 hat in der Pathogenese der demyelinisierenden Erkrankungen insofern eine Bedeutung, als es in der Lage ist, neben Kollagen, Laminin und Elastin auch *myelin basic protein* zu degradieren (CHANDLER et al., 1997). Durch seine Eigenschaft, ECM zu spalten, ermöglicht es eine Migration von Gehirnzellen *in vivo* und *in vitro* (SHIPLEY et al., 1996). Bei der EAE und der MS wird ebenfalls in aktiv

demyelinisierten Herden eine Aufregulierung von MMP-12 beobachtet. (CHANDLER et al., 1997; VOS et al., 2003).

Eine mögliche Ursache für die Unterschiede zur *in vivo* Situation ist, dass ein sehr frühes Zeitfenster nach Virusinokulation gewählt wurde, so dass MMP-12 möglicherweise in einer späteren Phase auch *in vitro* hochreguliert wird.

MMP-14-RNA wurde nach der Infektion ebenfalls nicht signifikant aufreguliert. Ein wichtiger Regulationsmechanismus für die Aktivität von MMP-14 liegt neben einer Aufregulierung der Transkription in einer Internalisierung der membranständigen MMP (LAFLEUR et al., 2005). Ob eine Regulation der Aktivität durch den beschriebenen Mechanismus erfolgte, kann nicht gesagt werden. TIMP-1 und TIMP-2 zeigten nach Infektion ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Expression. Jedoch war TIMP-1 bei allen 4 Tieren nach 24 Std aufreguliert.

SURYADEVARA et al. (2003) zeigten in *in vitro* Versuchen eine kurzfristige Aufregulierung der TIMP-1-Expression nach Gabe proinflammatorischer Zytokine während eine Langzeitstimulierung zu einer Herabregulierung von TIMP-1 führte. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 in der Lage war, proinflammatorische Effekte von MMP-9 zu hemmen. Dies erklärt möglicherweise, dass lediglich eine gelatinolytische Aktivität von pro-MMP-9 nachgewiesen wurde.

In dieser Studie schien die Staupevirusinfektion im gewählten Zeitraum keinen Einfluß auf die Expression von MMP-12 und MMP-14 zu haben. Die kontroversen Aussagen der *in vitro* Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit und vorangegangener *in vivo* Arbeiten sind zum einen durch den zeitlichen Ablauf zu erklären, sollten aber durch andere Modelle und Methoden näher untersucht werden.

## **5.8 Einfluß der Staupevirusinfektion auf die MMP-Expression der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen (Gruppe B)**

Die Staupevirusinokulation hatte keinen signifikanten Einfluß auf die MMP-Expression der Mikroglia/Makrophagen-Kulturen. Gleichzeitig wurden in dem beobachteten Zeitraum nur maximal 2% der Zellen infiziert. Die Virusinokulation

selbst schien also keine signifikante Aufregulierung der MMPs bei gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen zu induzieren.

Dies steht zunächst im Widerspruch zu der wichtigen Rolle dieser Zellen bei der Zytokinexpression, Antigenpräsentation und Phagozytose von toten Zellen bei neuroinflammatorischen Prozessen, insbesondere bei der MS (Bo et al. 1994; GONZALEZ-SCARANO, 1999) und der Staupe. Auch in der frühen Phase der DLE wurden trotz Immunsuppression eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, eine Aufregulierung von CD44 sowie eine erhöhte MMP-Expression in Mikroglia und Astrozyten, sowie ein Einstrom CD8-positiver Zellen nachgewiesen (ALLDINGER et al., 1999; WÜNSCHMANN et al. 1999; GRÖNE et al., 2000; MIAO et al., 2003).

In zahlreichen Untersuchungen ist jedoch in Mikroglia/Makrophagen eine Aufregulierung *in vitro* vor allem nach Stimulierung mit proinflammatorischen Zytokinen beobachtet worden (LIUZZI et al., 2004). FONFARA et al. (2003) wiesen in kaninen Gehirnexplantatkulturen nach, dass eine CDV-Infektion zu einer Aufregulierung verschiedener proinflammatorischer Zytokine führte.

In der vorliegenden Arbeit war in den Mikroglia/Makrophagen-Kulturen in der frühen Phase nach der Infektion keine signifikante Aufregulierung der MMP-Expression zu beobachten. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Mikroglia/Makrophagen nur in Interaktion mit den anderen Gliazellen MMPs aufregulieren.

Ausgehend von den in dieser Studie gewonnenen Erkenntnissen sollen in weiterführenden Arbeiten Ond-GFP-infizierte Mikroglia-Kulturen im Kokultursystem mit den Mischkulturen untersucht werden.

Dies würde die Möglichkeit eröffnen, die MMP-Expression der verschiedenen Populationen nach Infektion zumindestens auf RNA-Ebene isoliert zu betrachten und Einblicke in zelluläre Interaktionen zu gewinnen.

Möglicherweise ist dies aber ein weiterer Hinweis darauf, dass die Mikroglia und infiltrierende Makrophagen vor allem im Rahmen der subakuten und chronischen Staupevirusinfektion zur Demyelinisierung im Rahmen der *bystander demyelination* beitragen.



## 6. Zusammenfassung

### **Einfluss einer Staupevirusinfektion auf die *in vitro* Expression von Matrix-Metalloproteinasen in Gehirnzellpopulationen adulter Hunde**

**Christiane Krudewig**

Die Literaturübersicht gibt zu Beginn einen Überblick über den Zelltropismus und zytopathogenen Effekt des Staupevirus in kaninen neonatalen Gehirnzellkulturen. Die demyelinisierende Leukoenzephalitis (DLE) ist eine häufige Folge der Staupevirusinfektion und dient als Modell für andere demyelinisierende Erkrankungen. Im zweiten Abschnitt der Literaturübersicht wird auf die Expression der MMPs und ihrer Inhibitoren der TIMPs in glialen Kulturen der Spezies Mensch, Maus und Ratte eingegangen. MMPs sind Proteasen, die den Umbau der extrazellulären Matrix modulieren, reguliert von ihren endogenen Inhibitoren den TIMPs. Im ZNS wird ihnen daher als kritischen Mediatoren neuroinflammatorischer und neurodegenerativer Prozesse eine große Bedeutung zugesprochen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den frühen Einfluß der Staupevirusinfektion auf die Expression von MMPs und TIMPs in verschiedenen Gehirnzellkulturen des adulten Hundesgehirns qualitativ und quantitativ zu bestimmen.

In einem ersten Schritt wurden zunächst Protokolle zur Kultivierung der empfindlichen adulten kaninen Gehirnzellen entwickelt und die gewonnenen Kulturen anhand zelltypspezifischer Marker charakterisiert. Als Material dienten hierzu die Gehirne von 12 Hunden im Alter von 8 Wochen bis 12 Jahren.

Der qualitative und quantitative Nachweis von fünf MMPs (MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14) sowie zwei Inhibitoren (TIMP-1, TIMP-2) erfolgte auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR. Die proteolytische Aktivität der im Zellkulturüberstand enthaltenden Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) sowie der Kollagen umsetzenden Proteasen (MMP-3, MMP-12 und MMP-13) wurde mittels Zymographie untersucht. Der Western-Blot diente zur Identifikation der Proteine in den konzentrierten Zellkulturüberständen.

Zur Infektion der Gliazellen stand ein zellkulturadaptierter, rekombinanter fluoreszenzmarkierter Staupevirusstamm (Ond-GFP) zur Verfügung. Die

Mischkulturen und die gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen von vier Tieren wurden jeweils in Dreifachansätzen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Die Probenahme für die molekularbiologischen und zymographischen Untersuchungen erfolgte 24 und 72 Std p.i.

Die Isolierung der Gehirnzellen von Hunden unterschiedlichen Alters war bis vier Std post mortem erfolgreich. Es wurden  $0,9 \times 10^6$  Zellen/g Gehirn isoliert. Die gewonnenen Mischkulturen, die nach der ersten Passage für die weiteren Versuche verwendet wurden, enthielten 15,5% A2B5-positive Zellen, interpretiert als Vorläuferzellen, 14,5% Dil-ac-LDL positive Mikroglia/Makrophagen, 4,3% GFAP-positive Astrozyten, 1,4% O4-positive Oligodendrozyten, 18 % schwach Dil-ac-LDL und Vimentin ko-exprimierende Zellen und 71,3% Vimentin-positive Zellen. Weiterhin wurden in serumfreien Kulturen A2B5 und p75<sup>NGFR</sup>-positive Zellen nachgewiesen.

Durch Adaptierung eines in der Literatur für Nagerzellen beschriebenen Protokolls zum mechanischen Ablösen der Zellen gelang es, mehr als 91% reine Mikroglia/Makrophagenkulturen (Iba1/Dil-ac-LDL positive Zellen) des adulten Hundes zu etablieren.

Auf Transkriptionsebene gelang in Mischkulturen und gereinigten Mikroglia/Makrophagenkulturen der Nachweis von MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 und TIMP-2 mRNA. In allen Kulturen waren MMP-12 und MMP-14 hoch- und TIMP-1 und MMP-13 niedrig-exprimierte Gene. Die beiden Kulturarten zeigten jedoch ein unterschiedliches Expressionsmuster. Die Mikroglia/Makrophagen-Kulturen exprimierten konstitutiv signifikant mehr MMP-9, MMP-12 und MMP-14 als die Mischkulturen, in denen neben MMP-12 und MMP-14 vorrangig MMP-2 detektiert wurde. Die Aktivität der Proenzymformen von MMP-2, MMP-9 und MMP-12 wurde mittels Gelatine- bzw. Kasein-Zymographie nachgewiesen. Im Western-Blot wurden die Proteine MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 und MMP-13 identifiziert.

In den Infektionsversuchen waren 72 (24) Std p.i. 15,5% (1,8%) der Zellen in den Mischkulturen und 1,2% (0,17%) der gereinigten Mikroglia/Makrophagen infiziert.



Neben der Infektion von Astrozyten, Mikroglia/Makrophagen und Vimentin-positiven Zellen konnte eine bislang nicht beschriebene Infektion von A2B5/p75<sup>NGFR</sup> positiven Zellen nachgewiesen werden.

In den Mischkulturen induzierte die Virusinokulation 24 Std p.i. auf mRNA-Ebene eine gegenüber den Kontrollkulturen signifikante 7fach erhöhte MMP-9 und 12fach erhöhte MMP-13 Expression und einen geringeren (1,4 bzw. 1,7fachen) Anstieg der MMP-2 und TIMP-1-mRNA-Expression. Auf Proteinebene war nach Infektion eine signifikant gesteigerte gelatinolytische Aktivität der Proenzyme pro-MMP-2 und pro-MMP-9 zu beobachten. Zudem wurde in den infizierten Mischkulturen die aktive Form von MMP-2 mittels Zymographie detektiert. In den gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen wurden p.i. keine signifikanten Unterschiede der MMP- und TIMP-Expression festgestellt.

In der vorliegenden Studie wurde somit nachgewiesen, dass nach Staupevirusinfektion eine Aufregulierung der MMPs in den Mischkulturen sowohl über die erhöhte Transkription, als auch über die Aktivierung der Zymogene erfolgte.

Die Ergebnisse der *in vitro* Studie zeigten nach Virusinfektion eine signifikante Aufregulierung von MMP-2, MMP-9 und MMP-13 sowie ein erweitertes MMP-9/TIMP-1 und MMP-2/TIMP-2 Verhältnis. Dies lässt vermuten, dass diese Regulationen auch *in vivo* zu einer Imbalance des labilen Gleichgewichts zwischen MMPs und ihren Inhibitoren führen und damit möglicherweise zur Pathogenese der Demyelinisierung im Rahmen der DLE beitragen.

Die Staupevirusinfektion schien im gewählten Zeitraum keinen direkten Einfluß auf die MMP-Expression der gereinigten Mikroglia/Makrophagen-Kulturen zu haben. Eine Beteiligung dieser Zellen an der Aufregulierung der MMPs in den Mischkulturen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, sie ist das Thema weitergehender Untersuchungen.



## 7. Summary

### **Influence of canine distemper virus infection on the *in vitro* expression of MMPs and TIMPs in brain cells derived from adult dogs**

**Christiane Krudewig**

In the literature section, the influence of a CDV infection on canine brain cell cultures is reviewed. The natural hosts of CDV are dogs and several other carnivores and a demyelinating leukoencephalitis (DLE) is a frequent sequel of CDV infection. The second chapter of the review gives an overview of the expression of MMPs and their inhibitors (TIMPs) in brain cell cultures of man, mouse and rat. MMPs are proteases, that modulate extracellular matrix turnover. Thus, they are known as critical mediators of neuroinflammatory and neurodegenerative processes in the CNS. TIMPs regulate proteolytic activity to prevent tissue damage.

Therefore, the aim of this study was to determine the early influence of the CDV infection on the qualitative and quantitative MMP- and TIMP-expression in different cell cultures derived from adult canine brain using RT-qPCR and zymography.

In a first step, protocols were established in order to develop cultures of the sensitive canine brain cells and furthermore to characterize them by cell-type specific markers. Brains of 12 dogs, 8 weeks to 12 years old, served as experimental material.

The qualitative and quantitative expression of five MMPs (MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14) and two endogenous inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) was determined on the mRNA level from cell lysates by RT-qPCR. Proteolytic activity of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and collagen degrading proteases in cell culture supernatants, were examined by zymography. Westernblot was used to identify proteins in concentrated supernatants.

An attenuated recombinant green fluorescent protein-expressing CDV strain (Ond-GFP) was used for the infection of brain cell cultures. Mixed cultures and purified microglia/macrophage cultures of four animals were infected with a MOI of 0.1 in triplicates. Samples for molecular and zymographic analysis were taken at 24 and 72 hours p.i.

The isolation of brain cells from dogs of different ages was successful up to four hours post mortem.  $0.9 \times 10^6$  cells/g brain were isolated. Mixed cultures, used for further investigations after the first passage, contained 15.5% A2B5 positive cells, interpreted as progenitor cells, 14.5% Dil-ac-LDL positive microglia/macrophages, 4.3% GFAP-positive astrocytes, 1.4% O4-positive oligodendrocytes, 18% weakly Dil-ac-LDL and Vimentin expressing cells and also 71.3% flat, vimentin-positive cells. Furthermore, A2B5 and p75<sup>NGFR</sup> expressing cells were detected in serumfree cultures.

A purity of more than 91% of Iba1 and Dil-ac-LDL labeled cells was reached in microglia/macrophages cultures through successful adaptation of a protocol described in literature for mechanical separation of rodent cells.

On the transcriptional level, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, TIMP-1 and TIMP-2 were expressed in mixed cultures and purified microglia/macrophages cultures. In all cultures, MMP-12 and MMP-14 were expressed on a high, and MMP-13 and TIMP-1 on a low level. However, cultures displayed a different pattern of expression. Microglia/macrophages expressed constitutively significantly more MMP-9, MMP-12 and MMP-14 than mixed cultures, where next to MMP-14 and MMP-12 predominantly MMP-2 was found. Using zymography in both culture systems pro-MMP-2 and pro-MMP-9 activity was constitutively and MMP-12 activity was irregularly detected. By western blot the proteins MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 and MMP-13 were confirmed.

Virus inoculation resulted in infection of 15.5% (1.8%) in mixed cultures and 1.2% (0.17%) in purified microglia/macrophages after 72 (24) hours. In addition to the expected infection of astrocytes, microglia/macrophages and vimentin positive cells, an infection of A2B5/p75<sup>NGFR</sup> positive cells was observed.

In mixed cultures, the inoculation of the virus induced 24 hours p.i. a significantly higher mRNA-expression of MMP-9 (7fold) and MMP-13 (12fold) and a lower rise of MMP-2 (1.4fold) and TIMP-1 (1.7fold) -mRNA-expression. On the protein level, there was a significantly increased gelatinolytic activity of pro-MMP-2 and pro-MMP-9. Moreover, activity of MMP-2 was induced in infected mixed cultures. There

were no significant changes in MMP- and TIMP-expression in purified microglia/macrophage cultures after virus inoculation.

In summary, there was an up-regulation of MMPs in mixed cultures after an infection with CDV. It was demonstrated by an increased transcription as well as by activation of the zymogenes.

The results of the *in vitro* study showed a significant up-regulation of MMP-2, MMP-9 and MMP-13 as well as an extended MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 relation. Presumably, these regulations also result *in vivo* to an imbalance of the delicate relationship between MMPs and their natural inhibitors TIMPs and consequently might play a role in the pathogenesis of demyelination in DLE.

The inoculation of CDV did not seem to have an influence on the MMP-expression in purified microglia/macrophages cultures. A participation of these cells in the up-regulation of MMPs due to interaction of cells in mixed cultures can not be excluded, and will be the focus of further studies.



## 8. Literaturverzeichnis

AGREN M.S. (1994)

Gelatinase activity during wound healing.

Br. J. Dermatol. 131: 634-40

ANTHONY D.C., FERGUSON B., MATYZAK M.K. (1997)

Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 23: 406-415

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

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

Acta Neuropathol. 92: 273-280

ALLDINGER S., BAUMGÄRTNER W., KREMMER E., FONFARA S. (1999)

Characterisation of a canine CD44 specific monoclonal antibody.

Zentralbl. Veterinärmed. A. 46: 19-32

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

Up-regulation of the hyaluronate receptor CD 44 in canine distemper demyelinated plaques.

Acta Neuropathol. 99: 138-46

APODACA G., RUTKA J., BOUHANA K., BERENS M.E., GIBLIN J.R. (1990)

Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitors by fetal astrocytes and glioma cells.

Cancer Res. 50: 2322-2329

ARAI K., LEE S.R., LO E.H. (2003)

Essential role for ERK mitogen-activated protein kinase in matrix metalloproteinase-9 regulation in rat cortical astrocytes.

Glia 43: 254-64

APPEL M.J.G. und GILLESPIE J.H. (1972)

Canine distemper virus.

In: Gard S., Hallauer C., Meyer K.F. (eds),

Virol. Monogr. 11: 1-96

BAKER A.H., EDWARDS D.R., MURPHY G. (2002)

Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.

J. Cell Sci. 115: 3719-3727

- BARBER S.C. (1982)  
Neurogenesis and regeneration in the primary olfactory pathway of mammals.  
Bibl.Anat.23:12-25
- BARNES A., BEE A., BELL S., GILMORE W., MEE A., MORRIS R., CARTER S.D.  
(2000)  
Immunological and inflammatory characterisation of three canine cell lines: K1, K6 and DH82.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 75: 9-25.
- BASZLER T.V., HARWOOD W.G., LESTER K.L., DAVIS W.C., KNOWLES D.P.  
(1994)  
Characterization of caprine microglial cells and in vitro infection with caprine arthritis and encephalitis virus.  
Lab. Invest. 70: 933-43
- BAUMGÄRTNER W., ALLDINGER S.(2005)  
The pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination: a biphasic process.  
In: Experimental Models of Multiple sclerosis. Lavi Ehud und Constantinescu Chris (eds.), Springer-Verlag, 2005
- BAUMGÄRTNER W., ÖRVELL C., REINACHER M. (1989)  
Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues.  
Acta Neuropathol. 78: 504-512
- BAUMGÄRTNER W.K., METZLER A.E., KRAKOWKA S., KOESTNER A. (1981)  
In vitro identification and characterization of a virus isolated from a dog with neurological dysfunction.  
Infect. Immun. 31:1177-83
- BERGMANN R.L., INZANA K.D., INZANA T.J. (2002)  
Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs.  
Am. J. Vet. Res. 63: 1359-1362
- BEVER C.T. Jr, ROSENBERG G.A. (1999)  
Matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: targets of therapy or markers of injury?  
Neurology 53: 1380-1381
- BIGNAMI A., ENG L.F., DAHL D., UYEDA C.T. (1972)  
Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence.  
Brain Res. 43: 429-435



- BIRKEDAL-HANSEN H., TAYLOR R.E. (1982)  
Detergent activation of latent collagenase and resolution of its component molecules.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1173-1178
- BIRKEDAHN-HANSEN H., MOORE W.G., BODDEN M.K. (1993)  
Matrix metalloproteinases: a review.  
*Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4: 197-250
- BO L., MORK S., KONG P.A., NYLAND H., PARDO C.A., TRAPP B.D. (1994)  
Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions.  
*J. Neuroimmunol.* 51: 135-146
- BOTTENSTEIN J.E. und SATO G.H.(1974)  
Growth of a neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 514-517
- BOTTERON C., ZURBRIGGEN A., GRIOT C., VANDEVELDE M. (1992)  
Canine distemper virus-immune complexes induce bystander degeneration of oligodendrocytes.  
*Acta Neuropathol.* 83: 402-407
- BÜRGE T., GRIOT C., VANDEVELDE M., PETERHANS E. (1989)  
Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus.  
*J. Virol.* 63: 2790-2797
- CALZA L., GIARDINO L., POZZA M., BETTELLI C., MICERA A., ALOE L. (1998)  
Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 3209-3214
- CAMMER W., BLOOM B.R., NORTON W.T., GORDON S. (1978)  
Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 1554-1558
- CANETE-SOLER R., GUI Y.H., LINASK K.K., MUSCHEL R.J. (1995)  
Developmental expression of MMP-9 (gelatinase B) mRNA in mouse embryos.  
*Dev. Dyn.* 204: 30-40

CHANDLER S., MILLER K.M., CLEMENTS J.M., LURY J., CORKILL D., ANTHONY D.C., ADAMS S.E., GEARING A.J. (1997)  
Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview.  
J. Neuroimmunol. 72: 155-161

CHERIAN M.G. (1994)  
The significance of the nuclear and cytoplasmic localization of metallothionein human liver and tumor cells.  
Environ. Health. Perspect. 102: 257-263

COSTA S., PLANCHENAUT T., CHARRIERE-BERTRAND C., MOUCHEL Y., FAGES C., JULIANO S., LEFRANCOIS T., BARLOVATZ-MEIMON G., TARDY M. (2002)  
Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability.  
Glia 37: 105-113

CROSS A.K., WOODROOFE M.N. (1999)  
Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro.  
Glia 28: 183-189

CUZNER M.L., GVERIC D., STRAND C., LOUGHLIN A.J., PAEMEN L., OPDENAKKER G., NEWCOMBE J. (1996)  
The expression of tissue type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 55: 1194-1204

CUZNER M. L., OPDENAKKER G. (1999)  
Plasminogen activators and matrix metalloproteinases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system.  
J. Neuroimmunol. 94: 1-14

DEBUS E., WEBER K., OSBORN M. (1983)  
Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides.  
Differentiation 25: 193-203

DE GROOT C.J., LANGEVELD C.H., JONGELEN C.A., MONTAGNE L., VAN DER VALK P., DIJKSTRA C.D. (1997)  
Establishment of human adult astrocyte cultures derived from postmortem multiple sclerosis and control brain and spinal cord regions: immunophenotypical and functional characterization.  
J. Neurosci. Res. 49: 342-354

- DE GROOT C.J., HULSHOF S., HOOZEMANS J.J., VEERHUIS R. (2001)  
Establishment of microglial cell cultures derived from postmortem human adult brain tissue: immunophenotypical and functional characterization.  
*Microsc. Res. Tech.* 54: 34-39
- DEL RIO-HORTEGA P. (1932)  
Microglia.  
In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, Penfield W. (ed), pp 482-534, New York: Hoeber
- EGEBLAD M., WERB Z. (2002)  
New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.  
*Nat. Rev. Cancer* 2: 161-174
- FINI M.E., COOK J.R., MOHAN R., BRINCKERHOFF C.E. (1998)  
Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.  
In: *Matrix Metalloproteinases*. Parks W.C., MECHAM R.P. (eds.), New York, Academic Press, pp. 299-356
- FROYSTAD M. K., RODE M., BERG T., GJOEN T. (1998)  
A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages.  
*Dev. Comp. Immunol.* 22: 533-549
- GAEDKE K., ZURBRIGGEN A., BAUMGÄRTNER W. (1997)  
In vivo and in vitro detection of canine distemper virus nucleoprotein gene with digoxigenin-labelled RNA, double-stranded DNA probes and oligonucleotides by in situ hybridization.  
*Zentralbl. Veterinärmed. B* 44: 329-340.
- GEHRMANN J, MATSUMOTO Y., KREUTZBERG G.W. (1995)  
Microglia: intrinsic immuneeffector cell of the brain.  
*Brain Res. Rev.* 20: 269-287
- GENSERT J.M., GOLDMANN J.E. (2001)  
Heterogeneity of cycling glial progenitors in the adult mammalian cortex and white matter.  
*J. Neurobiol.* 48: 75-86
- GHORPADE A., PERSIDSKAIA R., SURYADEVARA R., CHE M., LIU X.J., PERSIDSKY Y., GENDELMAN H.E. (2001)  
Mononuclear phagocyte differentiation, activation and viral infection regulate matrix metalloproteinase expression: implications for human immunodeficiency virus type 1-associated dementia.  
*J. Virol.* 75: 6572-6583

- GIFFARD R.G., SWANSON R.A. (2005)  
Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes.  
*Glia* 50: 299-306
- GIJBELS K., MASURE S., CARTON H. (1992)  
Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders.  
*J. Neuroimmunol.* 41: 29-34
- GISSELSSON L., SMITH M.L., SIESJO B.K. (1999)  
Hyperglycemia and focal brain ischemia.  
*J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19: 288-97
- GIULIAN D und BAKER, T.J. (1986)  
Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain.  
*J. Neurosci.* 6: 2163-2178
- GIULIAN D. und LACHMAN L.B. (1985)  
Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury.  
*Science* 228: 497-499
- GONZALEZ-SCARANO F., BALTUCH G.(1999)  
Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases.  
*Annu. Rev. Neurosci.* 22: 219-240
- GOTTSCHELL P.E., DEB S. (1996)  
Regulation of matrix metalloproteinase expression in astrocytes, microglia and neurons.  
*Neuroimmunomodulation* 3: 69-75
- GOTTSCHELL P.E. and YU X. (1995)  
Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes.  
*J. Neurochem.* 64: 1513-1520
- GOTTSCHELL P.E., YU X., BING B. (1995)  
Increased production of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture.  
*J. Neurosci. Res.* 42: 335-342
- GRABER, H.U., MÜLLER C.F., VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A. (1995)  
Restricted infection with canine distemper virus leads to down regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes.  
*Acta Neuropathol.* 90: 312-318

- GREWAL R.P., YOSHIDA T., FINCH C.E., MORGAN T.E. (1997)  
Scavenger receptor mRNAs in rat brain microglia are induced by kainic acid lesioning and by cytokines.  
*Neuroreport.* 24: 1077-1081
- GRIOT C., BÜRGE T., VANDEVELDE M., PETERHANS E. (1989)  
Antibody-induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine distemper encephalitis: a mechanism for bystander demyelination.  
*Acta Neuropathol.* 78: 396-403
- GRIOT C., VANDEVELDE M., RICHARD A., PETERHANS E., STOCKER R. (1990)  
Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species.  
*Free Radic. Res. Commun.* 11: 181-93
- GRÖNE A., ALLDINGER S., BAUMGÄRTNER W. (2000)  
Interleukin-1beta, -6, -12 and tumor necrosis factor-alpha expression in brains of dogs with canine distemper virus infection.  
*J. Neuroimmunol.* 110: 20-30
- GRÖNE A., FONFARA S., BAUMGÄRTNER W. (2002)  
Cell type-dependent cytokine expression after canine distemper virus infection.  
*Viral Immunol.* 15: 493-505
- GROSS J., LAPIERE C.M. (1962)  
Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48: 1014-1022
- GROSS J., NAGAI Y. (1965)  
Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54: 1197-1204
- GRÖTERS S., ALLDINGER S., BAUMGÄRTNER W. (2005)  
Up-regulation of MMP-9 and MMP-14 mRNA in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis.  
*Acta Neuropathol.* 110: 369-382
- HARTUNG H.P., KIESEIER B.C. (2000)  
The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system.  
*J. Neuroimmunol.* 107: 140-147
- HARVEY A. R. (1994)  
Expression of low affinity NGF (p75) receptors in rat superior colliculus: studies in vivo, in vitro, and in fetal tectal grafts.  
*Exp. Neurol.* 130: 237-249

- HERNANDEZ-BARRANTES S., TOTH M., BENARDO M.M., YURKOVA M., GERVASI D.C., RAZ Y., SANG Q.A., FRIDMAN R. (2000)  
Binding of active (57kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) regulates MT-MMP processing and pro-MMP-2 activation.  
J. Biol. Chem. 275: 1280-1289
- HSIEH H.L., YEN M.H., JOU M.J., YANG C.M. (2004)  
Intracellular signalings underlying bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocyte-1.  
Cell Signal 16: 1163-1176
- HUMMEL V., KALLMANN B. A., WAGNER S., FULLER T., BAYAS A., TONN J. C., BENVENISTE E. N., TOYKA K.V., RIECKMANN P. (2001)  
Production of MMPs in human cerebral endothelial cells and their role in shedding adhesion molecules.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 60: 320-327
- HUSEMANN J. und SILVERSTEIN S.C. (2001)  
Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adulte mouse and human brain and in Alzheimer disease brain.  
Am. J. Pathol. 158: 825-832
- HUSEMANN J., LOIKE J.D., ANANKOV R., FEBBRAIO M., SILVERSTEIN S.C. (2002)  
Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system.  
Glia 40: 195-205
- IIMAI Y., IBATA I., ITO D., OHSAWA K., KOHSAKA S. (1996)  
A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 224: 855-862
- JEFFERY N.D., LAKATOS A., FRANKLIN R.J. (2005)  
Autologous olfactory glial cell transplantation is reliable and safe in naturally occurring canine spinal cord injury.  
J. Neurotrauma 22: 1282-1293
- KIESEIER B.C., PAUL R., KOEDEL U., SEIFERT T., CLEMENTS J.M., GEARING A.J., PFISTER H.W., HARTUNG H.P. (1999)  
Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis.  
Brain 122: 1579-1587

- KLEINER D.E., STETLER-STEVENSON W.G. (1994)  
Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases.  
*Anal. Biochem.* 218: 325-329
- KNAUPER V., LOPEZ-OTIN B., SMITH B., KNIGHT G., MURPHY G. (1996)  
Biochemical characterization of human collagenase-3.  
*Biol. Chem.* 271: 1544-1500
- KNAUPER V., SMITH B., LOPEZ-OTIN C., MURPHY G. (1997)  
Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13).  
*Eur. J. Biochem.* 248: 369-373.
- KONAT G.W., WIGGINS R.C. (1985)  
Effect of reactive oxygen species on myelin membrane proteins.  
*J. Neurochem.* 45: 1113-1118.
- LARSEN P. H., YONG V. W. (2004)  
The expression of matrix metalloproteinase-12 by oligodendrocytes regulates their maturation and morphological differentiation.  
*J. Neurosci.* 24: 7597-7603
- LAFLEUR M.A., MERCURI F.A., RUANGPANIT N., SEIKI M., SATO H., THOMPSON E.W. (2005)  
Type-I collagen abrogates the clathrin-mediated internalization of membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) via the MT1-MMP hemopexin domain.  
*J. Biol. Chem.* [Epub ahead of print]
- LATT S.A. und STETTET G. (1976)  
Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis.  
*J. Histochem. And Cytochem.* 24: 24-33
- LAZARUS G.S., BROWN R.S., DANIELS J.R., FULLMER H.M. (1968)  
Human granulocyte collagenase.  
*Science.* 159:1483-1485
- LEAKE A., MORRIS C.M., WHATELEY J. (2000)  
Brain matrix metalloproteinase 1 levels are elevated in Alzheimer's disease.  
*Neurosci. Lett.* 291: 201-203
- LEE W.J., SHIN C.Y., YOO B.K., RYU J.R., CHOI E.Y., CHEONG J.H., RYU J.H., KO K.H. (2003)  
Induction of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) in lipopolysaccharide-stimulated primary astrocytes is mediated by extracellular signal-regulated protein kinase1/2 (ERK 1/2).  
*Glia* 41: 15-24

LEONHARDT H. (1990)

Neuroglia des ZNS.

In: LEONHARDT H., Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, S. 231-238

LEPPERT D., WAUBANT E., GALARDY R., BUNNETT N.W., HAUSER S.L. (1995)

T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro.

J. Immunol. 154:4379-4389

LEPPERT D., FORD J., STABLER G. (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, LEIB SL, GRYGAR C, et al (2000)

Matrix metralloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae.

Clin infect Dis 31: 80-84

LEPPERT D., WAUBANT E., GALARDY R. (1995)

T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro.

J. Immunol. 154: 4379-4389

LIM G.P., RUSSELL M.J., CULLEN M.J., TOKES Z.A. (1997)

Matrix metalloproteinases in dog brains exhibiting Alzheimer-like characteristics.

J. Neurochem. 68: 1606-1611

LINDBERG R. L., DE GROOT C. J., MONTAGNE L., FREITAG P., VAN DER VALK P., KAPPOS L., LEPPERT D. (2001)

The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis.

Brain 124: 1743-1753

LIUZZI G.M., SANTACROCE M.P., PEUMANS W.J., VAN DAMME E.J., DUBOIS B., OPDENAKKER G., RICCIO P. (1999)

Regulation of gelatinases in microglia and astrocyte cell cultures by plant lectins.

Glia 27: 53-61

LIUZZI G.M., LATRONICO T., FASABO A., CARLONE G., RICCIO P. (2004a)

Interferon-beta inhibits the expression of metalloproteinases in rat glial cell cultures: implications for multiple sclerosis pathogenesis and treatment.

Mult. Scler. 10: 290-297



LIUZZI G. M., MASTROIANNI C. M., LATRONICO T., MENGONI F., FASANO A., LICHTNER M., VULLO V., RICCIO P. (2004b)

Anti-HIV drugs decrease the expression of matrix metalloproteinases in astrocytes and microglia.

Brain. 127:398-407

MAGNUS T., CHAN A., LINKER R.A., TOYKA K.V., GOLD R. (2002)

Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial cells in the inflamed central nervous system.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 61:760-766.

MARKUS S., FAILING K., BAUMGÄRTNER W. (2002)

Increased expression of proinflammatory cytokines and lack of up-regulation of anti-inflammatory cytokines in early distemper CNS lesions.

J. Neuroimmunol. 125: 30-41

MASSENGALE J.L., GASCHÉ Y., CHAN P.H. (2002)

Carbohydrate source influences gelatinase production by mouse astrocytes in vitro. Glia. 38:240-245

MATO M., OKAWARA S., SAKAMOTO A., AIKAWA E., OGAWA T., MITSUHASHI U., MASUZAWA T., SUZUKI H., HONDA M., YAZAKI Y., WATANABE E., LUOMA J., YLA-HERTTUALA S., FRASER I., GORDON S., KODAMA T. (1996)

Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 16; 93: 3269-3274

MATRISIAN L.M. (1994)

Matrix metalloproteinase gene expression.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 732:42-50

MAYR A., BACHMANN P.A., BIBRACK B., WITTMANN G.(1977)

Viologische Arbeitsmethoden.

Band II, Jena:Gustav Fischer

MCCAWLEY L.J., MATRISIAN L.M. (2001)

Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!

Curr. Opin. Cell. Biol. 13: 534-540

MIAO Q., BAUMGÄRTNER W., FAILING K., ALLDINGER S. (2003)

Phase-dependent expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in demyelinating canine distemper encephalitis.

Acta Neuropathol. 106: 486-494

MILWARD E.A., LUNDBERG C.G., GE B., LIPSITZ D., ZHAO M., DUNCAN I.D. (1997)

Isolation and transplantation of multipotential populations of epidermal growth factor-responsive, neural progenitor cells from the canine brain.

J. Neurosci. Res. 50: 862-871

MUIR E.M., ADCKOCK K.H., MORGENSTERN D.A., CLAYTON R., VON STILLFRIED N., RHODES K., ELLIS C., FAWCETT J.W., ROGERS J.H. (2002)  
Matrix metalloproteinases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes.

Brain Res. Mol. Brain Res. 100: 103-117

MUN-BRYCE S., ROSENBERG G.A. (1998)

Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease.

J. Cereb. Blood Flow Metab. 18: 1163-1172

MUTINELLI F., VANDEVELDE M., GRIOT C., RICHARD A. (1989)

Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination.

Acta Neuropathol. 77: 333-335

NEWCOMBE J., NAIK N., CUZNER M.L. (1992)

Monoclonal antibody 14E recognizes an antigen common to human oligodendrocytes, Schwann cells, Bergmann glia, and a subpopulation of reactive glia.

Neurochem. Res. 17:933-938

OH L.Y., LARSEN P.H., KREKOSKI C.A., EDWARDS D.R., DONOVAN F., WERB Z., YONG V.W. (1999)

Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes.

J. Neurosci. 19: 8464-8475

OH J., TAKAHASHI R., KONDO S., MIZOGUCHI A., ADACHI E., SASAHARA R.M., NISHIMURA S., IMAMURA Y., KITAYAMA H., ALEXANDER D.B., IDE C., HORAN T.P., ARAKAWA T., YOSHIDA H., NISHIKAWA S., ITOH Y., SEIKI M., ITOHARA S., TAKAHASHI C., NODA M. (2001)

The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis.

Cell 107: 789-800

OKADA Y., SHINMEI M., TANAKA O., NAKA K., KIMURA A., NAKANISHI I., BAYLISS M.T., IWATA K., NAGASE H. (1992)

Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium.

Lab. Invest. 66: 680-690.

OSBORN M., DEBUS E., WEBER K. (1984)  
Monoclonal antibodies specific for vimentin.  
*Eur. J. Cell. Biol.* 34:137-143

O'SHEA H., CRANG J., TONKS P., NASH A.A., FAZAKERLEY J.K. (1997)  
The PI capsid region of Theiler's virus controls replication in mouse glial cell cultures  
*Arch. Virol.* 142:1521-35

PARESCHE D.M., GHOSH R., MAXFIELD F.R. (1996)  
Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor.  
*Neuron* 17: 553-565

PEARCE-KELLING S., MITCHELL W.J., SUMNERS B.A., APPEL M.J.G. (1990)  
Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes:relationship to in vivo persistence and disease.  
*Microb.Pathog.*9:71-82

PEARCE-KELLING S., MITCHELL W.J., SUMMERS B.A., APPEL M.J.G. (1991)  
Virulent and attenuated canine distemper virus infects multiple dog brain cell types in vitro.  
*Glia* 4: 408-416

PERESS N., PERILLO E., ZUCKER S. (1995)  
Localization of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in Alzheimer's disease and normal brain.  
*J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54: 16-22

PETRATOS S., GONZALES M.F., AZARI M.F., MARRIOTT M., MINICHELLO R.A., SHIPHAM K.A., PROFYRIS C., NICOLAOU A., BOYLE K., CHEEMA S.S., KILPATRICK T.J. (2004)  
Expression of the low-affinity neurotrophin receptor, p75(NTR), is upregulated by oligodendroglial progenitors adjacent to the subventricular zone in response to demyelination.  
*Glia* 48: 64-75

POLETTE M., GILLES C., MARCHAND V., SEIKI M., TOURNIER J.M., BIREMBAUT P. (1997)  
Induction of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) expression in human fibroblasts by breast adenocarcinoma cells.  
*Clin. Exp. Metastasis.* 15:157-63

RAISMAN G. (1985)  
Spezialized neuroglial arrangement may explain the capacity of vomeronsal axons to reinnervate central neurons.  
*Neuroscience* 14: 237-254

- ROSELL A., ALVAREZ-SABIN J., ARENILLAS J.F., ROVIRA A., DELGADO P., FERNANDEZ-CADENAS I., PENALBA A., MOLINA C.A., MONTANER J. (2005)  
A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke.  
*Stroke* 36:1415-1420
- ROSENBERG G.A., KORNFELD M., ESTRADA E., KELLEY R.O., LIOTTA L.A., STETLER-STEVENSON W.G. (1992)  
TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase.  
*Brain Res.* 576: 203-207
- ROSENBERG G.A., CUNNINGHAM L.A., WALLACE J. (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
- ROSS A.H., GROB P., BOTHWELL M., ELDER D.E., ERNST C.S., MARANO N., GHRIST B.F., SLEMP C.C., HERLYN M., ATKINSON B. (1984)  
Characterization of nerve growth factor receptor in neural crest tumors using monoclonal antibodies.  
*Proc. Natl., Sci., U.S.A.* 81:6681-5
- RUFFINI F., ARBOUR N., BLAIN M., OLIVIER A., ANTEL J.P. (2004)  
Distinctive properties of human adult brain-derived myelin progenitor cells.  
*Am. J. Pathol.* 165:2167-2175
- SCHACHNER, M., KIM, S.K. and ZEHNLE, R. (1981)  
Developmental expression in central and peripheral nervous system of oligodendrocyte cell surface antigens (O antigens) recognized by monoclonal antibodies.  
*Develop. Biol.* 83: 328-338
- SCHOBESBERGER M., ZURBRIGGEN A., SUMMERFIELD A., VANDEVELDE M., GRIOT C. (1999)  
Oligodendroglial degeneration in distemper: apoptosis or necrosis?  
*Acta Neuropathol. (Berl).* 97:279-287
- SCHOBESBERGER M., ZURBRIGGEN A., GASSEN U., RIMA B., TER MEULEN V., SCHNEIDER-SCHAULIES J. (2000)  
Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion.  
*J Virol* 74: 7554-7561

- SCHULZ L.-C. (1991)  
Pathologie der Haustiere. Bd. II. Krankheiten und Syndrome.  
Fischer Verlag, Jena, S. 146
- SCOLDING N.J., RAYNER P.J., COMPSTON D.A. (1999)  
Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in adult human white matter.  
Neuroscience. 89: 1-4
- SELVEY S., HAUPT L.M., THOMPSON E.W., MATTHAEI K.I., IRVING M.G., GRIFFITHS L.R. (2004)  
Stimulation of MMP-11 (stromelysin-3) expression in mouse fibroblasts by cytokines, collagen and co-culture with human breast cancer cell lines.  
B.M.C. Cancer. 4: 40
- SHIPLEY J.M., WESSELSCHMIDT R.L., KOBAYASHI D.K., LEY T.J., SHAPIRO S.D. (1996)  
Metalloelastase is required for macrophage-mediated proteolysis and matrix invasion in mice.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93: 3942-3946
- SMITH P.M., LAKATOS A., BARNETT S.C., JEFFERY N.D., FRANKLIN R.J. (2002)  
Cryopreserved cells isolated from the adult canine olfactory bulb are capable of extensive remyelination following transplantation into the adult rat CNS.  
Exp. Neurol. 176: 402-406
- SNOEK-VAN BEURDEN P.A., VON DEN HOFF J.W. (2005)  
Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors.  
Biotechniques. 38: 73-83
- SOMERVILLE R.P., OBLANDER S.A., APTE S.S. (2003)  
Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks.  
Genome Biol. 4: 216
- SPIEGEL S., FOSTER D., KOLESNICK R. (1996)  
Signal transduction through lipid second messengers.  
Curr. Opin. Cell Biol. 8: 159-167
- STAMENKOVIC I. (2003)  
Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases.  
J. Pathol. 200: 448-464

STEIN V.M., CZUB M., HANSEN R., LEIBOLD W., MOORE P.-F. ZURBRIGGEN A., TIPOLD A. (2004a)

Characterization of canine microglial cells isolated ex vivo.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 99: 73-85

STEIN V.M., CZUB M., SCHREINER N., MOORE P.-F., VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A., TIPOLD A. (2004 b)

Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions.  
J. Neuroimmunol. 153: 122-131

STERNLICHT M.D., WERB Z. (2001)

How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour.  
Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 17: 463-516

STREIT W.J., KINCAID-COLTON C.A. (1995)

The brain's immune system.  
Sci. Am. 273: 54-55; 58-61

STREIT W.J. (2002)

Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS.  
Glia 40: 133-139

STUVE O., DOOLEY N.P., UHM J.H., ANTEL J.P., FRANCIS G.S., WILLIAMS G., YONG V.W. (1996)

Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9.  
Ann. Neurol. 40: 853-863

STORTS R.W., KOESTNER A., DENNIS R.A. (1968)

The effects of canine distemper virus on explant tissue cultures of canine cerebellum.  
Acta Neuropathol. 11:1-14

SUMMERS B., APPEL M. J.G. (1987)

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

SURYADEVARA R., HOLTER S., BORGMANN K., PERSIDSKY R., LABENZ-ZINK C., PERSIDSKY Y., GENDELMANN H. E., WU L., GHORPADE A. (2003)

Regulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 by Astrocytes: Links to HIV-1 Dementia. Glia 44: 47-56

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

*In vitro* canine distemper virus infection of canine lymphoid cells: a prelude to oncolytic therapy for lymphoma.  
Clin. Cancer Res. 11:1579-87

SUZUMURA A, SAWADA M, YAMAMOTO H, MARUNOUCHI T. (1990)

Effects of colony stimulating factors on isolated microglia in vitro.

J. Neuroimmunol. 30:111-20

TOFT-HANSEN H., NUTTALL R.K., EDWARDS D.R., OWENS T. (2004)

Key metalloproteinases are expressed by specific cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis.

J. Immunol. 173: 5209-5218

TSAFRIRI, A. (1995)

Ovulation as a tissue remodelling process. Proteolysis and cumulus expansion.

Adv. Exp. Med. Biol.377: 121-140

UHM J.H., DOOLEY N.P., OH L.Y., YONG V.W. (1998)

Oligodendrocytes utilize a matrix metalloproteinase, MMP-9, to extend processes along an astrocyte extracellular matrix.

Glia 22:53-63

ULRICH R., GERHAUSER I., SEELIGER F., BAUMGÄRTNER W., ALLDINGER S. (2005)

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study.

Dev. Neurosci. 27: 408-418

VAILLANT C., MEISSIREL C., MUTIN M., BELIN M.F., LUND L.R., THOMASSET N. (2003)

MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum.

Mol. Cell. Neurosci. 24: 395-408.

VANDEVELDE M., BICHSEL P., CERRUTI-SOLA S., STECK A., KRISTENSEN F., HIGGINS R.J. (1983)

Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. A sequential immunocytochemical study.

Acta Neuropathol. (Berl.) 59:269-276.

VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A., HIGGINS R. J., PALMER D. (1985 a)

Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper.

Acta Neuropathol. 67: 211-218

VANDEVELDE M., ZURBRIGGEN A., DUMAS M., PALMER D. (1985 b)

Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro.

J. Neuro. Sci. 69: 133-137

VECIL G.G., LARSEN P.H., CORLEY S.M., HERX L.M., BESSON A., GOODYER C.G., YONG V.W. (2000)

Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo.

J. Neurosci. Res. 61: 212-224

VON VISGER J.R., YEON D.S., OH T.H., MARKELONIS G.J. (1994)

Differentiation and maturation of astrocytes derived from neuroepithelial progenitor cells in culture.

Exp. Neurol. 128: 34-40

VOS CM, GARTNER S, RANSOHOFF RM, MCARTHUR JC, WAHL L, SJULSON L, HUNTER E, CONANT K. (2000)

Matrix metalloprotease-9 release from monocytes increases as a function of differentiation: implications for neuroinflammation and neurodegeneration.

J. Neuroimmunol. 22: 221-227

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

Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytic macrophages in active multiple sclerosis lesions.

J. Neuroimmunol. 138: 106-114

VU T.H., SHIPLEY J.M., BERGERS G., BERGER J.E., HELMS J.A., HANAHAN D., SHAPIRO S.D., SENIOR R.M., WERB Z. (1998)

MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes.

Cell. 93: 411-422

WAGNER S., FUELLER T., HUMMEL V., RIECKMANN P., TONN J.C. (2003)

Influence of VEGF-R2 inhibition on MMP secretion and motility of microvascular human cerebral endothelial cells (HCEC).

J. Neurooncol. 62:221-231

WALKER D.G., LINK J., LUE L.F., DALSING-HERNANDEZ J.E., BOYES B.E. (2005)

Gene expression changes by amyloid {beta} peptide-stimulated human postmortem brain microglia identify activation of multiple inflammatory processes.

J. Leukoc. Biol. 79:596-610

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

A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis.

In vitro Cell. Dev. Biol. 24: 223-229

WITEK-ZAWADA B., KOI A. (2003)

Regulation of expression of stromelysin-1 by proinflammatory cytokines in mouse brain astrocytes.

J. Phys. Pharmacol. 54: 489-496



WÜNSCHMANN A., ALLDINGER S., KREMMER E., BAUMGÄRTNER W. (1999)  
Identification of CD4+ and CD8+ cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* 67: 101-116

YONG V.W., KIM S., PLEASURE D.E. (1988)  
Growth factors for fetal and adult human astrocytes in culture.  
*Brain Res.* 444: 59-66

YONG V.W., ANTEL J.P. (1992)  
Culture of glial cells from human brain biopsies.  
In: Fedoroff S., Richardson A. (eds), *Protocols for Neural Cell Culture*. St. Louis, The Humana Press Inc.: 81-96

YONG V.W., KREKOSKI C.A., FORSYTH P.A., BELL R., EDWARDS D.R. (1998)  
Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS.  
*Trends Neurosci.* 21: 75-80

YONG V.W., POWER C., FORSYTH P., EDWARDS D.R. (2001)  
Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system.  
*Nat. Rev. Neurosci.* 2: 502-511

YUSHCHENKO M., WEBER F., MADER M. (2000)  
Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human cerebrospinal fluid.  
*J. Neuroimmunol.* 110: 244-251

ZHOU Y.F., GUETTA E., YU Z.X., FINKEL T., EPSTEIN S.E. (1996)  
Human cytomegalovirus increases modified low density lipoprotein uptake and scavenger receptor mRNA expression in vascular smooth muscle cells.  
*J. Clin. Invest.* 98: 2129-2138

ZURBRIGGEN A., VANDEVELDE M. (1983)  
Canine distemper virus-induced glial cell changes in vitro.  
*Acta Neuropathol.* 62: 51-58

ZURBRIGGEN A., VANDEVELDE M., DUMAS M. (1986)  
Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro.  
*Lab. Invest.* 54: 424-431

ZURBRIGGEN A., VANDEVELDE M., DUMAS M., GRIOT C., BOLLO E. (1987 a)  
Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection in vitro.  
*Acta Neuropathol.* 74: 366-373

ZURBRIGGEN A., VANDEVELDE M., BOLLO E. (1987 b)  
Demyelinating, non-demyelinating and attenuated canine distemper virus strains induce oligodendroglial cytolysis in vitro.

J. Neurol. Sci. 79: 33-41

ZURBRIGGEN A., YAMAWAKI M., VANDEVELDE M. (1993)  
Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes.  
Lab. Invest. 68: 277-84

ZURBRIGGEN A., GRABER H. U., WAGNER A., VANDEVELDE M. (1995)  
Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with  
noncytolytic selective virus spread.  
J. Virol. 69: 1678-1686

ZURBRIGGEN A., SCHMID I., GRABER H.U., VANDEVELDE M. (1998)  
Oligodendroglial pathology in canine distemper.  
Acta Neuropathol. 95: 71-77

## 9. Anhang

### 9.1 Tabellen

#### 9.1.1 Hunde

Tiernr.	Tagebuchnr.	Alter	Gehirngewicht	Rasse	Geschl.	Todesursache
1	V2409/02	8 Wochen	*	Rauhaardackel	M	Glasknochenkrankheit Euth.
2	V891/04	Adult o.A.	*	Yorkshire-terrier	Mk	Hepatozelluläres Karzinom Euth.
3	V914/04	Adult o.A.	*	Mischling	Mk	o.A. Euth.
4	V1595/04	12 Jahre	*	Irish-Setter	Wk	o.A. Euth.
5	V238/05	20 Monate	73	Beagle	M	Euth.
6	V239/05	19 Monate	72	Beagle	M	Euth.
7	V255/05	20 Monate	87	Beagle	M	Euth.
8	V256/05	17 Monate	81	Beagle	W	Euth.
9	V258/05	17 Monate	78.5	Beagle	W	Euth.
10	V259/05	17 Monate	86	Beagle	W	Euth.
11	V272/05	19 Monate	76.5	Beagle	M	Euth.
12	V273/05	19 Monate	79	Beagle	M	Euth.

Geschl.= Geschlecht, M = männlich, W = weiblich; k= kastriert; \*= nicht erhoben;  
o.A. ohne weitere Angaben, Euth.=Euthanasie.

## 9.1.2 p-Werte

### 9.1.2.1 p-Werte von MMP-2

Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR 24 Std	A <sub>ohne</sub>	A <sub>Kokkultur</sub>	B <sub>ohne</sub>	B <sub>Kokkultur</sub>	B <sub>Kond</sub>
A <sub>ohne</sub>	-	0,364	0,465	0,786	0,765
A <sub>Kokkultur</sub>		-	0,576	0,723	0,365
B <sub>ohne</sub>	-	-	-	0,638	0,900
B <sub>Kokkultur</sub>	-	-	-	-	0,150
B <sub>Kond</sub>	-	-	-	-	-

Statistische Auswertung der Expression innerhalb einer Gruppe (A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub>)  
über drei Zeitpunkte mittels Wilcoxon-Test

qPCR zeitl. Verlauf	48 Std	96 Std
24 Std A <sub>ohne</sub>	0,486	0,379
24 Std B <sub>ohne</sub>	0,658	0,628

Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten  
Kulturen der Gruppe A mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR Gruppe A	24 Std A <sub>Virus</sub>	72 Std A <sub>Virus</sub>
24 Std A <sub>ohne</sub>	0,58	
72 Std A <sub>ohne</sub>		0,436

Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten  
Kulturen der Gruppe B mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR Gruppe B	24 Std B <sub>Virus</sub>	72 Std B <sub>Virus</sub>
24 Std B <sub>ohne</sub>	0,65	
72 Std B <sub>ohne</sub>		0,441

Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten  
Kulturen der Gruppe A mittels Mann-Whitney-U-Test

Gelatinolytische Aktivität, pro-MMP-2	24 Std A <sub>Virus</sub>	72 Std A <sub>Virus</sub>
24 Std A <sub>ohne</sub>	0,037	
72 Std A <sub>ohne</sub>		0,954

### 9.1.2.2 p-Werte von MMP-9

#### Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR 24 Std	A <sub>ohne</sub>	A <sub>Kokultur</sub>	B <sub>ohne</sub>	B <sub>Kokultur</sub>	B <sub>Kond</sub>
A <sub>ohne</sub>	-	0,9	<b>0,02</b>	<b>0,001</b>	<b>0,013</b>
A <sub>Kokultur</sub>		-	0,12	<b>0,013</b>	<b>0,012</b>
B <sub>ohne</sub>	-	-	-	0,203	0,805
B <sub>Kokultur</sub>	-	-	-	-	0,540
B <sub>Kond</sub>	-	-	-	-	-

#### Statistische Auswertung der Expression innerhalb einer Gruppe (A<sub>ohne</sub> und B<sub>ohne</sub>) über drei Zeitpunkte mittels Wilcoxon-Test

qPCR Zeitl. Verlauf	48 Std	96 Std
24 Std A <sub>ohne</sub>	0,32	<b>0,03</b>
24 Std B <sub>ohne</sub>	0,68	0,40

#### Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppe A mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR Gruppe A	24 Std A <sub>Virus</sub>	72 Std A <sub>Virus</sub>
24 Std A <sub>ohne</sub>	0,0017	
72 Std A <sub>ohne</sub>		0,732

#### Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppe B mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR Gruppe B	24 Std B <sub>Virus</sub>	72 Std B <sub>Virus</sub>
24 Std B <sub>ohne</sub>	0,98	
72 Std B <sub>ohne</sub>		0,65

Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppe A mittels Mann-Whitney-U-Test

<b>Gelatinolytische Aktivität, pro-MMP-9</b>	24 Std A <sub>Virus</sub>	72 Std A <sub>Virus</sub>
24 Std A <sub>ohne</sub>	<b>0,23</b>	
72 Std A <sub>ohne</sub>		<b>0,029</b>

### 9.1.2.3 p-Werte von MMP-12

Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test, zu 4.2.13

<b>qPCR 24 Std</b>	A <sub>ohne</sub>	A <sub>Kokultur</sub>	B <sub>ohne</sub>	B <sub>Kokultur</sub>	B <sub>Kond</sub>
A <sub>ohne</sub>	-	1	<b>0,001</b>	0,32	<b>0,033</b>
A <sub>Kokultur</sub>		-	<b>0,012</b>	0,38	0,059
B <sub>ohne</sub>			-	<b>0,006</b>	0,703
B <sub>Kokultur</sub>				-	0,914
B <sub>Kond</sub>					-

Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Test

<b>qPCR Zeitl Verlauf</b>	48 Std	96 Std
24 Std A <sub>ohne</sub>	0,78	0,43
24 Std B <sub>ohne</sub>	0,864	1

Kruskal-Wallis-Test als Globalvergleich der infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppen A und B: p=0,932

#### 9.1.2.4 p-Werte von MMP-13

Kruskal-Wallis-Test als Globalvergleich:  $p=0,580$

Statistische Auswertung der Expression innerhalb einer Gruppe ( $A_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{ohne}}$ ) über drei Zeitpunkte mittels Wilcoxon-Test

qPCR Zeitl Verlauf	48 Std	96 Std
$A_{\text{ohne}}$	0,38	0,43
$B_{\text{ohne}}$	0,95	0,76

Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppe A mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR Gruppe A	24 Std $A_{\text{Virus}}$	72 Std $A_{\text{Virus}}$
24 Std $A_{\text{ohne}}$	0,0017	
72 Std $A_{\text{ohne}}$		0,644

Statistische Auswertung der Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppe B mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR Gruppe B	24 Std $B_{\text{Virus}}$	72 Std $B_{\text{Virus}}$
24 Std $B_{\text{ohne}}$	0,94	
72 Std $B_{\text{ohne}}$		0,147

#### 9.1.2.5 p-Werte von MMP-14

Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR 24 Std	$A_{\text{ohne}}$	$A_{\text{Kokultur}}$	$B_{\text{ohne}}$	$B_{\text{Kokultur}}$	$B_{\text{Kond}}$
$A_{\text{ohne}}$	-	0,90	<b>0,004</b>	0,63	<b>0,012</b>
$A_{\text{Kokultur}}$	-	-	<b>0,006</b>	0,15	<b>0,015</b>
$B_{\text{ohne}}$			-	0,64	0,32
$B_{\text{Kokultur}}$				-	0,22
$B_{\text{Kond}}$					-

Statistische Auswertung der Expression innerhalb einer Gruppe ( $A_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{ohne}}$ ) über drei Zeitpunkte mittels Wilcoxon-Test

qPCR zeitl Verlauf	48 Std	96 Std
$A_{\text{ohne}}$	0,98	0,43
$B_{\text{ohne}}$	1	0,64

Kruskal-Wallis-Test als Globalvergleich der infizierten und nicht infizierten Kulturen:  $p=0,512$

### 9.1.2.6 p-Werte von TIMP-1

Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test

qPCR 24 Std	$A_{\text{ohne}}$	$A_{\text{Kokultur}}$	$B_{\text{ohne}}$	$B_{\text{Kokultur}}$	$B_{\text{Kond}}$
$A_{\text{ohne}}$	-	0,55	0,93	0,12	0,76
$A_{\text{Kokultur}}$		-	0,412	0,21	0,63
$B_{\text{ohne}}$				0,92	<b>0,048</b>
$B_{\text{Kokultur}}$				-	
$B_{\text{Kond}}$					-

Statistische Auswertung der Expression innerhalb einer Gruppe ( $A_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{ohne}}$ ) über drei Zeitpunkte mittels Wilcoxon-Test

qPCR Zeitl Verlauf	48 Std	96 Std
24 Std $A_{\text{ohne}}$	0,84	0,33
24 Std $B_{\text{ohne}}$	0,81	0,29

Kruskal-Wallis-Test als Globalvergleich der infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppen A und B:  $p=0,932$



### 9.1.2.7 p-Werte von TIMP-2

Kruskal-Wallis-Test als Globalvergleich:  $p=0,48$

Statistische Auswertung der Expression innerhalb einer Gruppe ( $A_{\text{ohne}}$  und  $B_{\text{ohne}}$ ) über drei Zeitpunkte mittels Wilcoxon-Test

qPCR zeitl Verlauf	48 Std	96 Std
$A_{\text{ohne}}$	0,35	0,47
$B_{\text{ohne}}$	0,83	0,91

Kruskal-Wallis-Test als Globalvergleich der infizierten und nicht infizierten Kulturen der Gruppen A und B,  $p=0,430$ .

## 9.2 Medien und Puffer in der Zellkultur

### 9.2.1 Sato's Medium

#### Für 1 Liter Medium:

Ham's F12 Nutrient-Mix	5,32 g
Hepes	2,38 g
DMEM Pulver	6,68 g
Brenztraubensäure	0,055 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,438 g
Transferrin	0,005 g
Insulin (5mg/ml)	1,0 ml
Aqua tridest.	1000,0 ml
Glukose	6,000 g
L-Glutamin	0,0292 g
Penizillin-Streptomycin	1,250 ml
Putreszin	0,100 ml
Progesteron	0,020 ml
Selen	0,010 ml
vor Gebrauch :	
(Phenolrot)	3,18 ml
Gentamycin	1,20 ml

pH-Wert auf 7,2 einstellen, in sterile Flaschen filtrieren, und beschriften.

Für die zymographischen Untersuchungen wurde der pH-Indikator Phenolrot weggelassen, da dieser zu Störbanden in der Zymographie führte. Der pH-Wert des Mediums wurde mittels Indikatorpapier überprüft.

### 9.2.2 Präkonditioniertes Medium

Sato's Medium ohne FKS wurde für 24 Std auf primäre Mischkulturen gegeben und im Brutschrank mit den Zellen bei 5 %CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert, anschließend mit

der Pipette abgenommen und abzentrifugiert, um Debris zu entfernen. Das Medium wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 9.2.3 Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

#### Lösung A: PBS -

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,15 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,20 g
Aqua tridest	0,9 Liter

Den pH-Wert auf 7,2 einstellen.

#### Lösung B: Kalzium- und Magnesium-Lösung

$\text{CaCl}_2$	0,10 g
$\text{MgCl}_2$	0,10 g

Aqua tridest. 100 ml

#### Herstellung von PBS +

Die Lösung A mit der Lösung B kombinieren, den pH-Wert auf 7,2 einstellen und in sterile Flaschen filtrieren.

### 9.2.4 *Dulbecco's modified Earle Medium (DMEM)*

400 ml Aqua bidest zu 5,344 g DMEM-Pulver geben. Dazu 1,48 g  $\text{NaHCO}_3$  und 500  $\mu\text{l}$  Penicillin/Streptomycin, den pH auf 7,2 einstellen. Mit diesem Medium werden folgende Lösungen hergestellt:

1. In eine sterile 500 ml Flasche 198 ml filtrieren. Vor Gebrauch 22ml FKS und 264  $\mu\text{l}$  Gentamycin hinzufügen.
2. Zu dem Rest der oben angesetzten Lösung 115,5 g Saccharose dazugeben und auf dem Magnetrührer mischen. Die dickflüssige Lösung in eine 500 ml Flasche filtrieren und vor Gebrauch 66 ml FKS und 396  $\mu\text{l}$  Gentamycin hinzufügen.

### 9.2.5 Poly-L-Lysin 10 mg/Liter (PLL)

Sigma P-1274

MW 128,100

Grad der Polymerisation: 593

1. 6.18 g Borsäure mit 1000 ml Wasser mischen und einen pH von 8,4 einstellen.
2. Dazu 10 mg Poly-L-Lysin geben und über Nacht bei 4°C rühren.
3. Die Lösung durch einen 22µm Filter filtrieren und die Lösung bei 4 °C aufbewahren.

### 9.3 Fluoreszenzfärbung

Herstellung des Paraformaldehyds zur Zellfixierung

Material

Lösung A: 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (24 g in 1000 ml Aqua bidest.)

Lösung B: 0,2 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (28,4 g in 1000 ml Aqua bidest.)

Paraformaldehyd, reinst

Saccharose (für eine bessere Zellerhaltung)

Herstellung

Aqua bidest (60 °C) 25 ml

Paraformaldehyd 2 g

NaOH (1N) 1-2 Tropfen

auf einem heizbaren Rührer mischen bis Lösung klar

Lösung B 20 ml

Lösung A 5 ml

Saccharose 2 g

pH Wert überprüfen (7,4)

vor Anwendung auf 37° C erhitzen.

Lagerung: bei 4 °C bis eine Woche zu lagern, bei kritischen Anwendungen frisch (direkt vor Gebrauch) zubereiten!

## 9.4 qPCR

### Aqua bidest. Diethylpyrokarbonat (DEPC)-behandelt

Diethylpyrokarbonat (DEPC) Reinsubstanz 1 ml  
Aqua bidest. 1000 ml

Unter dem Abzug rühren (Magnetrührer) bis gelöst (über Nacht), danach autoklavieren.

## 9.5 Zymographie, Lösungen und Puffer

### Allgemein zu beachtende Maßnahmen bei der Durchführung der Zymographie

Die Zymographie beruht auf einer reversiblen Inaktivierung der Enzyme durch Denaturierung in dem SDS-Gel. Um eine Aktivität der Enzyme während der Inkubation im Entwicklungspuffer zu ermöglichen, ist es wichtig, reduzierende Substanzen wie EDTA und  $\beta$ -Mercaptoethanol in den verwendeten Zellkulturmedien und Puffern auszuschließen.

Da MMPs kalziumabhängige Proteasen sind ist es wichtig, die Inkubation in einem  $\text{CaCl}_2$ haltigen Entwicklungspuffer durchzuführen.

Hohe Proteinkonzentrationen in den Proben führen zu Störbanden in der Zymographie. Daher wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen (PBS für jeweils 5 Min) für 24 Std ohne FKS inkubiert.

Zur Vermeidung von unspezifischen Banden und einer inhomogenen Färbung der Gele, sind diese ausschließlich mit Instrumenten wie z.B. einem Kunststoffspatel zu manipulieren.

Trenngele (10 %ig), Substrat: Gelatine

für ein (zwei) Minigele von 1 mm Dicke:

Acrylamid- 37,5 bis 30% 4°C	3,000 (4,6) ml
Tris- HCL 1,5 M, 4 % SDS pH 8,8	1,750 (3,5) ml
Gelatine	3 mg/ ml
(in der Mikrowelle erhitzen)	2,300 (4,6) ml
Aqua bidest.	0,502 (1,004) ml
TEMED (Katalysator, 4°C)	3,5 (7) µl
Ammoniumpersulfat (APS), 10 %	70,00 (140) µl

(0,05 g) Portion mit 500 µl Aqua bidest.

Durch leichtes Schwenken mischen und ohne Blasenbildung in die Giesskammer geben, mit Isopropanol überschichten, Gel polymerisieren lassen ca 15- 30 Min; Isopropanol abgiessen und mit Sammelgel-Puffer gut spülen.

#### Substrat: Kasein

Auflösen des Kaseins:

Kasein 150 mg

in 30 ml Aqua dest mit max 2 ml 1M NaOH auflösen (in der Mikrowelle erhitzen).

Zugabe von 20 ml Aqua dest, auf einem Magnetrührer mischen und evtl grobe Bestandteile abfiltrieren.

pH-Wert 8,8

#### Sammelgele

Acrylamid- 37,5 bis 30% 4°C	0,500 (1,0) ml
Tris HCL 0,5 M, 0,4 % SDS, pH- 6,8	0,625 (1,25) ml
Aqua dest.	1,025 (2,050) ml
Bromphenolblau	25,00 (50) µl
TEMED	1,25 (2,5) µl
APS, 10%	25,00 (50) µl

Sammelgel-Lösung über das polymerisierte Trenngel schichten, den Kamm einsetzen und das Gel erhärten lassen. Reinigen der Glasplatten und Plastikboxen, Entsorgung der Gelreste:

In Spülmittel und warmem Wasser gründlich reinigen, mit klarem Wasser und Aqua dest. abspülen und an der Luft trocknen lassen. Anschließend in verschlossenen Plastiktüten im Schrank aufbewahren. Polymerisierte Gele können in den Abfall geworfen werden. Polymerisiert ein Gel nicht, APS (Radikalbildner) und TEMED (Katalysator) dazugeben, polymerisieren lassen und im Müll entsorgen. Sollte ein Ansatz nicht polymerisieren, ist der acrylamidhaltige Abfall gesondert zu sammeln und zu entsorgen.

## 9.6 Western-Blot, Lösungen und Puffer

### Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-)

Natriumchlorid	40,0 g
Kaliumchlorid	1,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	3,823 g

Mit Aqua dest auf 5000 ml auffüllen

pH-Wert: 7,22

Steril filtrieren

### Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Magnesium und Calcium (PBS+)

$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0,66 g
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 g

Zu PBS- dazugeben

pH-Wert: 7,22

Steril filtrieren

### Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) mit 0,05% Tween und 1% Magermilch

Natriumchlorid	40,0 g
Kaliumchlorid	1,0 g

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,00 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	3,823 g
Tween	2,5 ml
Magermilchpulver	50,0 g
Mit Aqua dest auf 5000 ml auffüllen	

#### Nonidet P40 Lysispuffer

Tris (pH 7,5)	10,0 mM
EDTA	1,0 mM
NaCl	400,0 mM
Glycerol	10,00%
Nonidet P40	0,50%
DTT	1,0 mM
Natriumfluorid	10,0 mM
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1,0 mM
$\beta$ -glycerolphosphat	17,5 mM
Proteaseinhibitor	15,00%
PMSF	1,0 mM

#### Harvest Puffer

HEPES	10,0 mM
Natriumchlorid	50,0 mM
Saccharose	0,5 M
EDTA	0,1 mM
TritonX-100	0,5%
DTT	1 mM
Natriumfluorid	10 mM
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mM
$\beta$ -Glycerolphosphat	17,5 mM
Protease Inhibitor	4%
PMSF	1 mM
Tetranatriumpyrophosphat	10 mM



Puffer A

HEPES	10 mM
Kaliumchlorid	10 mM
EDTA	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
DTT	1 mM
Natriumfluorid	10 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
Protease Inhibitor	4%
PMSF	1 mM

Puffer C

HEPES	10 mM
NaCl	500 mM
EDTA	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
NP-400	1%
DTT	1 mM
Natriumfluorid	10 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 mM
Protease-Inhibitor	4%
PMSF	1 mM

4x Tris/SDS, pH 6,8 für das Sammelgel

Tris Base 6,05 g

mit Aqua dest. auf 40 ml auffüllen

pH-Wert auf 6,8 einstellen

mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und filtrieren

10%iges SDS 4 ml

Bei 4°C aufbewahren

4x Tris/SDS, pH 8,8 für das Trenngel

Tris Base	91,00 g
-----------	---------

mit Aqua dest. auf 300 ml auffüllen und filtrieren  
pH-Wert auf 8,8 einstellen

10%iges SDS	20 ml
-------------	-------

Bei 4°C aufbewahren

Laufpuffer 10x

Tris Base	30,2 g
Glycine	144,0 g
10%iges SDS	100 ml

mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen  
bei 4°C aufbewahren  
für den Gebrauch 1:10 verdünnen

Transfer Puffer 10x

Tris Base	30,3 g
Glycine	144,0 g

mit Aqua dest. auf 300 ml auffüllen und filtrieren  
Für den Gebrauch 100 ml Transfer Puffer 10x mit 200 ml Methanol und 700 ml  
Aqua dest. Vermischen

Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS)

Tris pH 7,5	100 mM
Natriumchlorid	0,9%

Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween (TBST)

Tris pH 7,5	100 mM
Natriumchlorid	0,9%
Tween	0,05%

Probenpuffer

4x Tris/Cl/SDS pH 6,8	300 mM
2-Mercaptoethanol	25%
Bromphenolblau	0,015%
Glycerol	50%
Natriumdocecdylsulfat	5 mM

## 9.7 Bezugsquellen für Chemikalien und Antikörper

### ATCC, American Tissue Culture Collection, USA

A2B5-Antikörper, Klon 1520 Hybridom-Zelllinie, Maus, HB-29,  
Anti-humaner-p75- Antikörper, Hybridom-Zelllinie, Maus HB-8737

### BIO-RAD, Hamburg

30% Acrylamide/Bis Solution 37.5:1 (2,6% C), 161-0156  
Ammoniumpersulfat, 161-0700  
Bromphenol Blue 10 g (161-0404)  
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution 1L (161-0436)  
Coomassie Brilliant Blue R-250 Destaining Solution 1L (161-0438)  
SDS (Natriumdocedylsulfat) 25 g (161-0300)  
TEMED, N; N, N', N'-Tetramethyldiamine, 161-0801  
Trans Blot® Transfer medium pure nitrocellulose membrane, 162-0115  
Tris/Glycine/SDS Buffer 1l (161-0732)  
Tris-HCl pH 6,8, 0,5 M, 1L (161-0799)  
Tris-HCl, pH 8,8, 1,5 M, 1l (161-0798)

### Chemicon, USA

Humaner MMP-2 und MMP-9 Standard, CC073

### Cell Signaling, Beverly, USA

Anti-rabbit IgG, HRP-linked, #7074

### DakoCytomation GmbH (ehemals Dako® Diagnostika GmbH), Hamburg

AEC + Substrate-Chromogen, K3469  
Anti-Vimentin-Antikörper-Klon V9, Maus M0725  
Dako® Fluorescent Mounting Medium, S3023  
Polyclonal rabbit anti-mouse Ig/HRP, P 0161  
Streptavidin-HRP for LSAB® 2 System HRP, K0675

Deutsche Dynal GmbH, Hamburg

CELLlection Pan Mouse IgG, 115.19

EDEKA

Sucofin® Magermilchpulver

GIBCO BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg MD, USA

DMEM, 41965-039

Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe

RnaseOUT (40U/μl), 10777-019

See Blue Plus® Prestained Standard, LC 5925

TRIZOL-Reagenz, 15596-026

Jackson ImmunoResearch Laboratories, Hamburg

Cy<sup>TM</sup>3-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L), 115-165-166

Fluorescein (FITC)-conjugated Goat anti-Mouse IgG (H+L), 115095-146

Fluorescein (FITC)-conjugated Goat anti-Rat IgG (H+L), 112-095-143

Rhodamine Red<sup>TM</sup>-X-conjugated Goat anti Rabbit IgG (H+L), 111-295-144

NeoMarkers, Fremont, CA, USA, über Dunn Labortechnik GmbH, Asbach

Anti-humaner MMP-2-Antikörper aus der Maus, Ab-1, Klon CA-4001, MS-567-P0

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

peqGOLD Proteinmarker II, 27-2010

Perbio, Frankfurt

Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate for HRP Detection (Pierce 34080)

PAESEL + LOREI, Hanau

Dil-ac-LDL, BT-902

Peprotec Inc., Tebu, Frankfurt

Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-2),  
Ziliärer Nervenwachstumsfaktor (CNTF)

Promega, Madison, WI, USA,

TaqDNA Polymerase, 1661  
Random Primers C1181

Qiagen, Hilden

RNeasy-Mini-Kit, 74106  
RNase free DNase Kit, 79254

Riedel de Haen

EDTA, 3454

Roth C. GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Ethanol, vergällt, K928.2  
Methanol, Rotipuran<sup>®</sup>, 99,9%, p.a., 4627.6  
Natriumchlorid (NaCl), P029.2  
2-Propanol (Isopropanol), Rotipuran<sup>®</sup>, Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe.  
Rotiprotect<sup>®</sup>-Nitrilhandschuhe, P777.1  
Salzsäure Rotipuran<sup>®</sup> 25% p.a., 6331.3  
TEMED, 2367.3

Serva Feinbiochemica GmbH und Co Kg, Heidelberg

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat  $\geq$  99%, 11280  
Natriumcarbonat p.a., 30181  
Tween<sup>®</sup> 20 pure; 37470  
Zitronensäure Na<sub>3</sub>-Salz, reinst, 38642

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Anti-GFAP-Antikörper, monoklonal Klon G-A-5, G3893  
Bisbenzimid H 33258, B2883

Bovines Serumalbumin (BSA), A3059  
Chloroform, 99+%, stabilisiert mit Amylen C2432  
Gentamycin, F1397  
HEPES, H3375  
Ham's F-12 Nutrients-Mix, N6760-10L  
Insulin, I-4011  
Kaninchenserum, R4505  
Kodak®, X-Omat AR Film, XAR-5, Size: 8 in. x 10 in., F5513-50EA  
L-Glutamin, G-8540  
Poly-L-Lysin, P-1274  
Progesterone, P8783  
Putrescine, P-5780  
Selenium (Sodium selenite), S-5261  
Transferrin, T-8158  
Trypsin-EDTA PBS 10x 1:250 (0,5%/0,2%), 5-51K00-H  
Foetal Calf Serum, 2-01F00-I  
Penicillin-Streptomycin, 4-02F00-I  
Saccharose, Sucrose minimum 99,5%, S-9378

Stratagene (LaJolla, USA )

Brilliant Quantitative PCR Core Reagent Kit, 600530

Triple Point Biologics Inc., Portland, OR, USA über Acris Antibodies GmbH,  
Hiddenhausen

Anti-humaner MMP-3-Antikörper aus dem Kaninchen, RHMMP-3  
Anti-muriner MMP-9-Antikörper aus dem Kaninchen, RM105MMP-9  
Anti-humaner MMP-12-Antikörper aus dem Kaninchen, RP1MMP-12  
Anti-humaner MMP-13-Antikörper aus dem Kaninchen, RP1MMP-13

Tierärztliche Hochschule Hannover, Klinik für kleine Klauentiere, Hannover  
Ziegenserum

VWR <sup>TM</sup> International GmbH, Darmstadt (ehemals Merck KG, Darmstadt)

1,4-Dithiothreitol, 1.11474.0005

2-Mercaptoethanol pA-Qualität 99%, 1.15433

Calciumchlorid-2-hydrat krist., 2382

Gelatine, reinst

Glycerol, etwa 87%, K304023912121

Glycine pro analysis, 1.04201.1000

Paraformaldehydlösung, mind. 37%., 1.03999.2500

Kaliumkarbonat p.a., 4928

Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH) p.a., 1.06498.1000

Salzsäure (HCl) 1N, 1.09057.1000

Salzsäure (HCl) 2N, 1.09063.1000

Wako Chemicals GmbH, Neuss

Anti-Iba1, 019-19741

## **9.8 Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel**

GE Healthcare Life Sciences (ehemals Amersham pharmacia biotech), München

Gene Quant pro, 974213

Biometra biomedizinische Analytik GmbH

BioDocAnalyze System

BIO-RAD Laboratories GmbH, München

Elektrophoresekammer und Zubehör: Mini-Protean-II-Cell, 165-2940

Xcluda<sup>®</sup> Aerosol Barrier Pipet Tips Style G, 211-2031

CORNING Life Sciences, München

24 Well Zellkulturplatten Costar<sup>®</sup>, 3524

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

50 ml Röhrchen, 160203



Heraeus Sepatech GmbH, Osterode

Zentrifuge Labofuge®A, 2500

Begasungsbrutschrank, Typ B5060 EK CO

New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen

Plattformschüttler

Nunc™ GmbH und Co. KG, Wiesbaden

Petrischalen 8,8 cm, 150318

Zellkulturflaschen, 25 cm<sup>2</sup>: 156367; 75 cm<sup>2</sup>: 156499

Zellkultureinsatz für Transwellsystem, 7342015

Omnilab, Hamburg

Zellkulturplatten 96 Vertiefungen, FALCON 353007

Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Netzmikrometerplatte U-OCMSQ 10/10, 034077

Mikroskop IX 70

Roth, Karlsruhe

Glasplatten, 0513.1

Ohrenglasplatten, 0520.1

Spacer (0,75 mm Breite), N624.1

Kämme (0,75 mm Dicke, 12 Taschen), N640.1

MINI-Blottingmodul, 0666.1

MINI-Vertikal-Doppel-Elektrophorese-Kammer, Y001.1

Elektrophorese-Netzgerät Typ 143, P004.1

Laufmodul, Y007.1

Gelgießmodul, Y008.1

Sartorius AG, Göttingen

Elektronische Präzisionswaage L310, WL-6006-m88091

Papierfaltenfilter 270 mm Durchmesser, FT-4-303-270

Vivaspin, Konzentratoren, VS02K-1

Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen

Parafilm M, P-7543

Zelldissoziationssieb, S0895

Zellschaber, C2802

Stratagene, USA

MX3005 Multiplex QPCR System

Optical Cap 8 x Strip, 401425

Strip Tube 8x0.2ml, 401428

## 9.9 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Aqua dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
DLE	<i>distemper leukoencephalitis</i>
CDV	<i>canine distemper virus</i> , Staupevirus
CDV-OND	Onderstepoort-Staupevirusstamm
CNTF	Ziliärer Nervenwachstumsfaktor
DEPC	Diethylpyrokarbonat
Dil-ac-LDL	azetyliertes Low-Density-Lipoprotein konjugiert mit 1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindo-carbocyanine perchlorate
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Earle Medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N', N'-tetraacetat
entf.	entfällt
FGF-2	Fibroblastenwachstumsfaktor
x g	Gravitation
GAPDH	Glyzeraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GFAP	Saures Gliafaserprotein,
HCl	Salzsäure
FKS	Fötales Kälberserum
Foto	Fotographische Abbildung

Iba1	Ionisiertes, Kalzium-bindendes Adapter Molekül 1
kDa	Kilodalton
M	männlich
Min	Minuten
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger RNA, Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
n.d.	nicht durchgeführt
n.e.	nicht erhoben
Nr.	Nummer
NTC	<i>no template control</i> , Negativkontrolle
OND-GFP	rekombinanter green fluorescent protein exprimierender Onderstepoort-Staupevirusstamm
p75 <sup>NGFR</sup>	niedrig affiner Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor
PBS	<i>phosphat buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PS	Pferde-Normalserum
p.i.	post infectionem
p.m.	post mortem
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, quantitative Echtzeit-PCR
RT	reverse Transkription
s	sense
SDS	Natriumdocedylsulfat
Std	Stunden
Tab.	Tabelle
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infecting dose
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinasen
W	weiblich

Wk	weiblich-kastriert
z.B.	zum Beispiel
ZS	Ziegen-Normal-Serum
ZNS	Zentrales Nervensystem



---

### **Mein besonderer Dank gilt...**

... Herrn Prof. Dr. W. Baumgärtner, PhD für die Überlassung des interessanten, facettenreichen Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die konstruktive Zusammenarbeit und die zügige und kritische Durchsicht des Manuskripts. Danke für die guten Möglichkeiten, in diesem Institut theoretische und praktische Kenntnisse auf dem Gebiet der Pathologie zu erlangen.

... Frau Dr. S. Alldinger für die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit, die konstruktive Kritik und zahlreichen Ideen, die freundliche Unterstützung, die zügige und genaue Durchsicht des Manuskripts.

... Herrn PD Dr. K. Wewetzer für die tatkräftigen Hilfestellungen, zahlreiche Anregungen und Diskussionen zur Problemlösung in der Zellkultur, für die Einführung der Methoden-Seminare, ein vergrößertes Zellkulturlabor und nicht zuletzt für ein funktionstüchtiges Mikroskop.

... Christina Puff für die Etablierung der qPCR und die sorgfältige Einweisung in die Geheimnisse des „MX“.

... Magdala Köchling für die gute und freundschaftliche Einweisung in den Western- Blot.

... Danuta Waschke für die geduldige, kompetente und gründliche Einführung in alle Arbeiten der Zellkultur, die unersetzliche Unterstützung und große Hilfsbereitschaft.

... Marion Schröder für die tatkräftige, unerlässliche Hilfe bei der Durchführung der Zymographie

... allen „Zellkulturlern“ für die gute Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

... Andrea Bathen, Katharina Kramer, Pirko Kuttler, Vanja Paltjan und Annette Voßmann und für die freundschaftliche seelische und leibliche Unterstützung, die kritische Durchsicht des Manuskripts, guten Rat und stete Tat.

... Christiane Herden für freundschaftliche und tatkräftige Hilfestellung in fachlicher und persönlicher Hinsicht und viele Tafeln Schokolade; Gina und Streif für die schöne Zeit im gemeinsamen Büro.

... Jirawat Kumnok (Bo) für seine Lebensweisheiten und eine warme Jacke.

... Ines, Annika und Dirk für die aufbauenden und konstruktiven Gespräche und Oly für die Erstellung eines realistischen Zeitplanes.

... Wiebke und Jenny, die sich so liebevoll und zuverlässig um Saumur gekümmert haben.

... meinen Eltern und meinen Geschwistern Heike und Ollie für die stets gewährte Unterstützung, den verlässlichen Rückhalt, die Zuversicht, die zahlreichen Carepakete und zwei Laptops in Zeiten des Notstandes.

...der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG für die Gewährung eines Doktorandenstipendiums.



**ISBN 3-938026-84-7**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH  
35392 Gießen · Frankfurter Str. 89 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375  
e-mail: [Geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:Geschaeftsstelle@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.net>**