

Aus der Klinik für kleine Haustiere  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

# **Charakterisierung von Mikrogliazellen bei Hundestaupe**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Veterinärmedizin

(Dr. med. vet.)

durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
Veronika Maria Stein  
aus Fürstenau

Hannover 2001

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. med. vet. A. Tipold

1. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. A. Tipold

2. Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Hewicker-Trautwein

Tag der mündlichen Prüfung: 23. November 2001

*Meinen lieben Eltern*

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits auf folgender Tagung vorgestellt:

Stein, V., M. Czub, R. Hansen, A. Zurbriggen und A. Tipold  
„Charakterisierung von Mikroglia bei Hundestaupe“

Vortrag auf der 10. Jahrestagung der Fachgruppe  
„Innere Medizin und Klinische Laboratoriumsdiagnostik“,  
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, e. V. (DVG)  
15.-17. Februar 2001 in München

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungen und Termini technici

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>17</b>
2.1	Hundestaupe .....	17
2.1.1	Das Hundestaupevirus (Canine distemper virus, CDV) .....	17
2.1.1.1	Taxonomie .....	17
2.1.1.2	Morphologie .....	18
2.1.1.3	Wirtsspektrum .....	19
2.1.1.4	Epidemiologie .....	19
2.1.2	Pathogenese .....	21
2.1.2.1	Pathogenese der systemischen Hundestaupe .....	21
2.1.2.2	Pathogenese der nervalen Hundestaupe .....	23
2.1.3	Klinisches Bild .....	25
2.1.3.1	Systemische Symptome .....	25
2.1.3.2	Neurologische Symptome .....	27
2.2	Mikroglia .....	29
2.2.1	Terminologie .....	29
2.2.2	Morphologie, Entwicklungs- und Funktionsstadien .....	30
2.2.3	Herkunft .....	32
2.2.4	Ausgewählte Darstellungstechniken .....	34
2.2.4.1	Versilberungstechniken .....	34
2.2.4.2	Ferritin .....	34
2.2.4.3	Histochemische Methoden .....	34
2.2.5	Funktionelle Eigenschaften und deren Regulation .....	35
2.2.5.1	Ruhende Mikroglia .....	36
2.2.5.2	Aktivierte Mikroglia .....	38
2.2.5.3	Phagozytierende Mikroglia .....	43
2.2.6	Die Rolle der Mikroglia bei ausgewählten Krankheitssyndromen .....	45
2.2.6.1	Mikroglia und Epilepsie .....	46
2.2.6.2	Mikroglia und Alzheimer .....	46
2.2.6.3	Mikroglia und AIDS .....	47
2.2.6.4	Mikroglia und Multiple Sklerose .....	48
2.3	Differenzierungsantigene .....	50
2.3.1	CD11 und CD18 .....	50
2.3.2	CD45 .....	51
2.3.3	CD14 .....	51

2.3.4	CD44	52
2.3.5	CD1c	52
2.3.6	1D11	53
2.3.7	ICAM-1	53
2.3.8	B7-1 und B7-2	53
2.3.9	MHC I und MHC II	54
2.3.10	CD3	56
2.3.11	CD4	56
2.3.12	CD8	57
2.3.13	CD21	57
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>60</b>
3.1	Geräte und Materialien	60
3.1.1	Geräte, Klinik- und Laborbedarf, Zentrifugen	60
3.1.2	Medikamente, Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien	63
3.1.3	Puffer, Lösungen und Medien	64
3.1.4	Materialien für die Separation und Differenzierung von Zellen	65
3.1.5	Enzyme	66
3.1.6	Materialien für die indirekte Membranimmunfluoreszenz	66
3.1.7	Materialien für die Bestimmung reaktiver Sauerstoffmetaboliten	68
3.1.8	Materialien für die Bestimmung der Phagozytoseaktivität	69
3.1.9	Materialien für die Durchflusszytometrie	69
3.1.10	Computer-Software	70
3.1.11	Virus	70
3.1.12	Impfstoff	70
3.1.13	Probanden	70
3.2	Methoden	72
3.2.1	Gewinnung und Isolierung von Leukozyten aus Hundeblut	72
3.2.1.1	Blutentnahme	72
3.2.1.2	Separation der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) des Hundes	72
3.2.1.3	Separation von neutrophilen Granulozyten des Hundes	73
3.2.2	Lichtmikroskopische Zellzahlbestimmung	74
3.2.3	Färbung der Zelloberfläche bzw. indirekte Membranimmunfluoreszenz (MIF) der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) des Hundes	74
3.2.4	Untersuchungen zur Zellfunktion	76
3.2.4.1	Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS = reactive oxygen species) durch neutrophile Granulozyten	76

## Inhaltsverzeichnis

---

3.2.4.2	Bestimmung der Phagozytoseaktivität .....	77
3.2.5	Messung in der Durchflusszytometrie .....	78
3.2.6	Test der für die Isolierung der Mikroglia geeigneten Zentrifugen .....	80
3.2.7	Impfung und Infektion mit Staupevirus und klinische Untersuchung der Versuchstiere .....	81
3.2.8	Euthanasie der Versuchstiere .....	81
3.2.9	Histopathologische Untersuchung .....	82
3.2.10	Isolierung von Primärzellen .....	82
3.2.10.1	Entnahme des Gehirns .....	82
3.2.10.2	Isolierung von Mikrogliazellen .....	83
3.2.11	Färbung der Zelloberfläche bzw. indirekte Membranimmunfluoreszenz zur immunphänotypischen Charakterisierung der Mikroglia .....	86
3.2.12	Nachweis des Staupevirus in Mikrogliazellen .....	87
3.2.13	Mikrogliazellen-Funktionstests .....	88
3.2.13.1	Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS = reactive oxygen species) .....	88
3.2.13.2	Phagozytose-Test .....	88
3.2.14	Auswertung der Versuchsergebnisse nach Gruppen .....	89
3.2.15	Statistische Auswertungsverfahren .....	89
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>90</b>
4.1	Methodische Vorarbeiten .....	90
4.1.1	Auswahl der in der Durchflusszytometrie einsetzbaren Antikörper für die immunphänotypische Charakterisierung caniner Mikrogliazellen und Monozyten .....	90
4.1.2	Einstellen der optimalen Verdünnung der Antikörper zur indirekten Membranimmunfluoreszenz an PBMCs und der Mikroglia .....	91
4.1.2.1	Primäre Antikörper .....	91
4.1.2.2	Sekundäre Antikörper .....	91
4.1.3	Test der Doppelfärbungen an PBMCs und Mikroglia .....	91
4.1.4	Vergleich und Auswahl der als Trigger einsetzbaren Agenzien für die Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten an neutrophilen Granulozyten .....	92
4.1.5	Ermittlung der optimalen Konzentration der eingesetzten Trigger an neutrophilen Granulozyten .....	92
4.1.6	Vergleich und Auswahl der als Phagozytosepartikel einsetzbaren Bakterien anhand der Ergebnisse mit neutrophilen Granulozyten .....	93
4.1.7	Ermittlung der optimalen Konzentration der eingesetzten Bakterien .....	94
4.1.8	Auswahl der verwendeten Zentrifugen .....	94

## Charakterisierung von Mikrogliazellen bei Hundestaupe

---

4.1.9	Identifizierung caniner Mikroglia und Ermittlung der zu verwendenden Dichten für die Isolation .....	95
4.1.9.1	Identifizierung der Mikroglia .....	95
4.1.9.2	Modifikationen von Vor- und Hauptgradient und Definition der Dichten, oberhalb derer sich die Mikroglia spezifisch ansammelt .....	98
4.2	Hauptversuch der Charakterisierung der Mikroglia nach Challenge-Infektion/ Test-Infektion mit Staupevirus .....	101
4.2.1	Hunde .....	101
4.2.2	Klinische Symptome .....	101
4.2.3	Histopathologische Untersuchung .....	103
4.2.4	Staupevirusnachweis in der Mikroglia ex vivo .....	104
4.2.5	Immunphänotypische Charakterisierung caniner Mikroglia ex vivo bei Hundestaupe .....	106
4.2.5.1	Identifizierung der Mikroglia .....	106
4.2.5.2	CD1c .....	109
4.2.5.3	1D11 .....	110
4.2.5.4	ICAM-1 .....	110
4.2.5.5	B7-1 und B7-2 .....	111
4.2.5.6	MHC I und II .....	112
4.2.5.7	CD14 .....	113
4.2.5.8	CD44 .....	113
4.2.5.9	CD3, CD8 $\alpha$ , CD21 und CD4 .....	113
4.2.6	Vergleich der Immunphänotypen der Mikroglia ex vivo und der Monozyten am Tag der Euthanasie .....	115
4.2.6.1	CD18, CD11b und CD11c .....	116
4.2.6.2	CD11d .....	117
4.2.6.3	CD45 .....	117
4.2.6.4	CD1c .....	117
4.2.6.5	1D11 .....	118
4.2.6.6	ICAM-1 .....	118
4.2.6.7	B7-1 und B7-2 .....	118
4.2.6.8	MHC I und II .....	119
4.2.6.9	CD14 .....	120
4.2.6.10	CD44 .....	120
4.2.6.11	CD3, CD8 $\alpha$ und CD21 .....	120
4.2.7	Funktionelle Charakterisierung der Mikroglia ex vivo .....	120
4.2.7.1	Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten ROS (reactive oxygen species) .....	120
4.2.7.2	Phagozytose-Test .....	123
4.2.8	Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen auf Monozyten im Verlauf des Challenge-Versuchs (Tag 6 p.i. bis zur Euthanasie) .....	128

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>133</b>
5.1	Methode der Mikrogliaisolierung .....	134
5.2	Immunphänotypische Charakterisierung caniner Mikroglia .....	135
5.3	Staupevirusnachweis in Mikrogliazellen und Histopathologische Untersuchung .....	137
5.4	Immunphänotypische Charakterisierung der Mikroglia ex vivo bei Staupe .....	139
5.5	Funktionelle Charakterisierung der Mikroglia ex vivo bei Staupe .....	145
5.5.1	Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten ROS (reactive oxygen species) .....	146
5.5.2	Phagozytose-Test .....	148
5.6	Vergleich der Immunphänotypen von Mikroglia ex vivo und Monozyten .....	150
5.7	Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen auf Monozyten im Verlauf des Challenge-Versuchs .....	151
5.8	Beeinflussung der Pathogenese von Staupe-Läsionen im ZNS durch die Mikroglia .....	152
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>156</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>159</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>161</b>

**Danksagung**

## Abkürzungen und Termini technici

Abb.	<u>Abbildung</u>
AcPase	<u>acid phosphatase</u> (saure Phosphatase)
AD	<u>Alzheimer Disease</u> , Alzheimer Krankheit
ADC	<u>AIDS dementia complex</u> , AIDS assoziierte Demenz
AIDS	<u>acquired immunodeficiency syndrome</u>
AK	<u>Antikörper</u>
APC	<u>antigen presenting cell</u> ; Antigen präsentierende Zelle
APP	<u>amyloid precursor protein</u> , Amyloidvorläuferprotein
Aqua dest.	<u>Aqua destillata</u>
Aqua tridest.	<u>Aqua tridestillata</u> (dreifach destilliertes Wasser)
ATP	<u>Adenosintriphosphat</u>
ATPase	<u>Adenosintriphosphatase</u>
bFGF	<u>basic Fibroblast Growth Factor</u>
BSA	<u>bovines Serumalbumin</u>
bzw.	<u>beziehungsweise</u>
°C	Grad Celsius
CD	<u>cluster of differentiation</u> (System zur Bezeichnung zellulärer Differenzierungsantigene)
CDV	<u>Canine distemper virus</u>
Challenge-Infektion	Belastungsinfektion/Belastungsversuch/ Testinfektion nach einer Immunisierung
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cm	Zentimeter
CPSR-1	<u>controlled process serum replacement-1</u>
CR3/4	<u>complement receptor 3/4</u> (Komplementrezeptor)
CSF	<u>colony stimulating factor I</u>
CTLA-4	<u>cytolytic T-lymphocyte associated molecule-4</u> (hochaffiner Rezeptor für B7-Moleküle auf T-Zellen)
d.h.	<u>das heisst</u>
DHR 123	<u>Dihydrododamin 123</u>
DMSO	<u>Dimethylsulfoxid</u>

## Abkürzungen und Termini tecnici

---

DMV	<u>D</u> olphin (Fam. <i>Delphinidae</i> ) <u>M</u> orbilliv <u>i</u> rus
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ukle <u>a</u> se
DNS	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ukle <u>i</u> n <u>s</u> äure
EAE	<u>E</u> xperimentelle <u>a</u> llergische <u>E</u> nzephalomyelitis
EEG	<u>E</u> lektro <u>e</u> nzephalo <u>g</u> r <u>a</u> phie
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> cet <u>a</u> t
ELISA	<u>E</u> nzyme-l <u>i</u> nk <u>e</u> d- <u>I</u> mmun <u>o</u> sorbant <u>A</u> ssay
EMV	<u>E</u> quines <u>M</u> orbilliv <u>i</u> rus
engl.	englisch
exkl.	exklusive, ausschließlich
Fa.	Firma
FACS	<u>f</u> luorescence- <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter (Fluoreszenz-aktiviertes Zellanalysegerät und "Zellsortierer", Durchflusszytometer)
Fam.	Familie
Fc	<u>f</u> ragment <u>c</u> ristalline (kristallisierbarer Antikörperteil, carboxy-terminales Fragment von Immunglobulinen nach Papain-Spaltung)
FITC	<u>F</u> luoresze <u>i</u> n- <u>I</u> sothio <u>c</u> yanat
FL 1,2,3	<u>F</u> luoreszenz 1,2,3 (1 = grün/gelb, 2 = gelb/orange, 3 = rot)
F-Protein	<u>F</u> usions-Protein (Bestandteil des Morbillivirions)
FSC	<u>f</u> orward <u>s</u> catter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gravitationsbeschleunigung (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
GABA	$\gamma$ - <u>a</u> mino <u>b</u> utyric <u>a</u> cid, $\gamma$ -Aminobuttersäure
GALT	<u>g</u> ut <u>a</u> ssociated <u>l</u> ymphoid <u>t</u> issue, darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
GFAP	<u>g</u> lial <u>f</u> ibrillary <u>a</u> cidic <u>p</u> rotein, saures Gliafaserprotein
GM-CSF	<u>g</u> ranulocyte- <u>m</u> onocyte <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor
ggr./mgr./hgr.	<u>g</u> ering <u>g</u> radig/ <u>m</u> ittel <u>g</u> radig/ <u>h</u> och <u>g</u> radig
griech.	griechisch
g $\alpha$ m-PE	<u>g</u> oat- <u>a</u> nti- <u>m</u> ouse- <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin (sekundärer Antikörper aus der Ziege, gegen Mausantigene gerichtet und an Phycoerythrin gebunden)
h	Stunde (engl.: <u>h</u> our)
Hd.	<u>H</u> und

## Charakterisierung von Mikrogliazellen bei Hundestaube

---

H-Protein	<u>H</u> aemagglutinin-Protein (Bestandteil des Morbillivirions)
HuIgG	<u>H</u> umanes <u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
ICAM-1	<u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule- <u>1</u> , Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IDPase	<u>I</u> nosind <u>i</u> phosphatase
I.E.	<u>I</u> nternationale <u>E</u> inheit(en)
IFN- $\gamma$	<u>I</u> nterferon- $\gamma$
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IL	<u>I</u> nterleukin
iNOS	<u>i</u> nducible <u>n</u> itric <u>o</u> xide <u>s</u> ynthase
ISH	<u>I</u> n- <u>s</u> itu- <u>H</u> ybridisation
kDa	kilo Dalton
K <sup>+</sup> -Kanal	Kalium-Kanal
l	<u>L</u> iter
lat.	lateinisch
LCA	<u>l</u> eukocyte <u>c</u> ommon <u>a</u> ntigen, = CD45
LFA-1	<u>l</u> ymphocyte <u>f</u> unction-associated <u>a</u> ntigen- <u>1</u> (= CD11a/CD18)
LBP	<u>L</u> ipopolysaccharid- <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
L-Protein	<u>L</u> arge-Protein (Bestandteil des Morbillivirions)
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
m	<u>m</u> illi (x 10 <sup>-3</sup> )
Mac-1	<u>m</u> embrane <u>a</u> ttack <u>c</u> omplex- <u>1</u> (Membranangriffskomplex)
mAk	<u>m</u> onoklonaler <u>A</u> ntikörper
M-CSF	<u>m</u> onocyte <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor
mg	<u>M</u> illigramm
MHC I/II	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex class I/II (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I/II)
MIF	<u>M</u> embran <u>i</u> mmun <u>f</u> luoreszenz
min	<u>M</u> inute/n
ml	<u>M</u> illiliter
mmol	Molarität, <u>m</u> illi <u>m</u> ol/l
M-Protein	<u>M</u> atrix-Protein (Bestandteil des Morbillivirions)
MPS	<u>M</u> ononukleäres <u>P</u> hagozytensystem

## Abkürzungen und Termini technici

---

mRNA	<u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid (Boten-Ribonukleinsäure)
MV	<u>M</u> asern <u>v</u> irus
MS	<u>M</u> ultiple <u>S</u> klerose
NDPase	<u>N</u> ucleotid <u>d</u> iphosphatase
NGF	<u>n</u> erve <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
NK-Zellen	<u>N</u> atürliche <u>K</u> illerzellen, zytotoxische T-Zellen
nm	Nanometer (= 10 <sup>-9</sup> m)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-Protein	<u>N</u> ukleokapsid-Protein (Bestandteil des Morbillivirions)
Nr.	<u>N</u> ummer
NSE	$\alpha$ - <u>N</u> aphtylsäu <u>r</u> e- <u>E</u> sterase
o.b.B.	<u>o</u> hne <u>b</u> esonderen <u>B</u> efund
PAF	<u>P</u> latelet <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor
PBMCs	<u>p</u> eripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes = Monozyten, Lymphozyten)
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDV	<u>P</u> hocine <u>d</u> istemper <u>v</u> irus ( <i>phocid</i> = zu den Robben gehörig)
PE	R- <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
Pellet	durch Zentrifugation gewonnener Bodensatz
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pH	<u>P</u> otentia <u>H</u> ydrogenii (Stärke des Wasserstoffes)
p.i.	<u>p</u> ost <u>i</u> nfectionem (nach Infektion)
PMA	<u>P</u> horbol-12- <u>M</u> yristat-13- <u>A</u> cetat
PMV	<u>P</u> orpoise (Tümmler: Fam. <i>Phocoenidae</i> ) <u>M</u> orbilli <u>v</u> irus
PNPase	<u>P</u> urinnucleotidphosphorylase
P-Protein	<u>P</u> hospho-Protein (Bestandteil des Morbillivirions)
PPRV	<u>P</u> este des <u>P</u> etits <u>R</u> uminants <u>V</u> irus
RNS	<u>R</u> ibonucleinsäure
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xxygen <u>s</u> pecies; reactive Sauerstoffintermediate
RPE	R- <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin
rpm	<u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute (Umdrehungen pro Minute)
RPV	<u>R</u> inderpest <u>v</u> irus

## Charakterisierung von Mikrogliazellen bei Hundestaupe

---

RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RT-PCR	<u>r</u> everse <u>t</u> ranscriptase <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion)
r $\alpha$ -PE	<u>r</u> abbit- <u>a</u> nti- <u>r</u> at- <u>P</u> hyco <u>e</u> rythrin (sekundärer Antikörper aus dem Kaninchen gegen Rattenantigene gerichtet und an Phycoerythrin gebunden)
s.	<u>s</u> iehe
sp.	<u>S</u> pezies
SPF	<u>s</u> pezifisch <u>p</u> athogen <u>f</u> rei
SSC	<u>s</u> ide <u>s</u> catter (Seitwärtsstreulicht)
SSPE	<u>s</u> ubakute <u>s</u> klerosierende <u>P</u> an <u>e</u> n <u>z</u> ephalitis
Tab.	<u>T</u> abelle
TCR	<u>T</u> - <u>c</u> ell- <u>r</u> eceptor (T-Zell-Rezeptor)
TGF- $\beta$	<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor- $\beta$
T <sub>H1</sub>	inflammatorischen T-Zellen
T <sub>H2</sub>	T-Helferzellen
TNF- $\alpha$	<u>T</u> umornekrosefaktor- $\alpha$
TPPase	<u>T</u> hiaminpyrophosphatase
u.	und
u.a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
UTPase	<u>U</u> ridintriphosphatase
verw.	verwendet/e
vgl.	vergleiche
well	Vertiefung in der Mikrotiterplatte
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervensystem
z. T.	<u>z</u> um <u>T</u> eil
$\mu$	mikro (x 10 <sup>-6</sup> )
$\mu$ l	<u>M</u> ikro <u>l</u> iter
$\bar{x}$	arithmetischer Mittelwert

## 1 Einleitung

Bei der Staupe handelt es sich um eine hochinfektiöse Viruserkrankung, die durch ein mit dem menschlichen Masernvirus und dem Rinderpestvirus verwandtes Morbillivirus der Familie Paramyxoviridae verursacht wird (PRINGLE 1991). Sie tritt weltweit sowohl bei Caniden (Hund, Dingo, Fuchs, Kojote, Wolf und Schakal), als auch bei Procyoniden (z. B. Waschbär, Nasenbär, Panda) und Musteliden (Wiesel, Frettchen, Nerz, Skunk, Dachs, Hermelin, Marder und Otter) auf. Seit einiger Zeit wurden auch Infektionen bei Großkatzen (z. B. Löwen, Tiger und Leoparden), Equiden und bei weiteren Spezies der Ordnungen Cetacea, Artiodaktyla und Primates beobachtet (APPEL u. GILLESPIE 1972; APPEL et al. 1994; OSTERHAUS et al. 1995; Literaturübersicht bei VAN MOLL 1994).

Mikrogliazellen sind wichtige Immuneffektorzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) (GIULIAN 1987; GRAEBER u. STREIT 1990). Die Mikroglia scheint bei nahezu jedem pathologischen Zustand des ZNS eine Rolle zu spielen, wie z. B. bei Traumata, Ischämie, Degeneration und neurologischen Krankheitssyndromen wie Epilepsie, Alzheimer Krankheit, Demenz bei AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) und Multiple Sklerose (GIULIAN et al. 1995).

Die Hundestaupe, in deren akuter Form es zur Entmarkung des ZNS und zunächst nicht zu entzündlichen Veränderungen kommt (VANDEVELDE et al. 1982a und b), ist ein etabliertes Modell für Erkrankungen des ZNS, die mit Entmarkungen einhergehen, wie beispielsweise die Multiple Sklerose (MS) des Menschen (APPEL et al. 1981). Die Rolle der Mikroglia bei der Pathogenese von Staupeläsionen im ZNS ist bis dato nicht bekannt. Studien weisen darauf hin, dass die Pathogenese der Demyelinisierung virusinduziert ist (VANDEVELDE et al. 1985; ZURBRIGGEN et al. 1993a), jedoch wurde an humanen Mikrogliazellen beobachtet, dass sie als Effektor und Regulator für die Demyelinisierung von zentraler Wichtigkeit zu sein scheinen (ULVESTAD et al. 1994a). Immunhistochemisch wurde bei der akuten Form der Staupe nach Färbung mit Lektinen, dem Antikörper gegen MHC II bzw. CD18 eine Aufregulation der Mikroglia in den Läsionen vermutet (VANDEVELDE et al. 1982a; ALLDINGER et al. 1996; TIPOLD et al. 1999). Eine frühe T-Zellantwort in dieser Phase der Erkrankung wurde erst kürzlich beschrieben (TIPOLD et al. 1999). In Zellkulturversuchen

konnte gezeigt werden, dass Mikroglia und andere Makrophagen mit Staupevirus infiziert werden und Reaktionsprodukte wie reaktive Sauerstoffintermediate generieren, die Oligodendrozyten schädigen können (GRIOT et al. 1990). Eine Beeinflussung der Pathogenese der Demyelinisierung durch die Mikroglia wäre somit möglich.

Forschungsmethodisch beschränken sich die Erkenntnisse über die Funktionen der Mikroglia weitestgehend auf in vitro durchgeführte Experimente (HEIN et al. 1995). Ergebnisse auf der Grundlage von Ex-vivo-Studien, um Rückschlüsse auf die Funktionen der Mikroglia in vivo und ihren Beitrag zur Pathogenese der Demyelinisierung bei Hundestaupe ziehen zu können, fehlen bisher.

Das Ziel dieser Arbeit war zunächst die Adaptierung einer für andere Spezies (Ratte, Maus, Affe, Mensch) etablierten Methode zur Gewinnung und Aufreinigung von Mikrogliazellen für den Hund. Mittels dieser Methode sollte die Grundlage zur immunphänotypischen und funktionellen Untersuchung caniner Mikroglia ex vivo geschaffen werden.

Im Anschluss an die Etablierung der Methode der Isolierung sollte die Mikroglia ex vivo bei Hunden, die nach Staupevirusinfektion typische ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung aufwiesen, untersucht werden. Diese Untersuchung war im Rahmen eines Impfstoffversuchs mit Challenge-Infektion geplant. Dabei sollten immunphänotypische und funktionelle Unterschiede der Mikroglia bei Hunden mit staupeartigen ZNS-Läsionen im Vergleich zur Mikroglia bei gesunden Hunden herausgestellt und mit den gewonnenen Ergebnissen Rückschlüsse auf den Beitrag der Mikroglia zur Pathogenese der Hundestaupe gezogen werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Hundestaupe

Die Staupe (Canine distemper, auch: Carrésche Krankheit) ist eine seit Jahrhunderten bekannte infektiöse Erkrankung (FANKHAUSER 1982; APPEL 1991). Eine der ersten zuverlässigen Beschreibungen der Krankheit aus dem Jahre 1809 stammt von Jenner, dem Erfinder der Kuhpockenvakzinierung (FANKHAUSER 1982). Der Begriff „Staupe“ umschrieb zu der damaligen Zeit unterschiedlichste Krankheiten bei Mensch und Tier. Die Virusätiologie wurde 1905 durch M. H. Carré bewiesen (FANKHAUSER 1982).

Etymologisch betrachtet ist die deutsche Bezeichnung „Staupe“ auf das altfriesische „Stupa“, das „Züchtigung“ oder „göttliche Strafe“ bedeutete zurückzuführen, während das englische Verb „to distemper“ mit „krank stimmen“, „verrückt machen“ oder „vergiften“ übersetzt werden kann (FANKHAUSER 1982).

#### 2.1.1 Das Hundestaupevirus (Canine distemper virus, CDV)

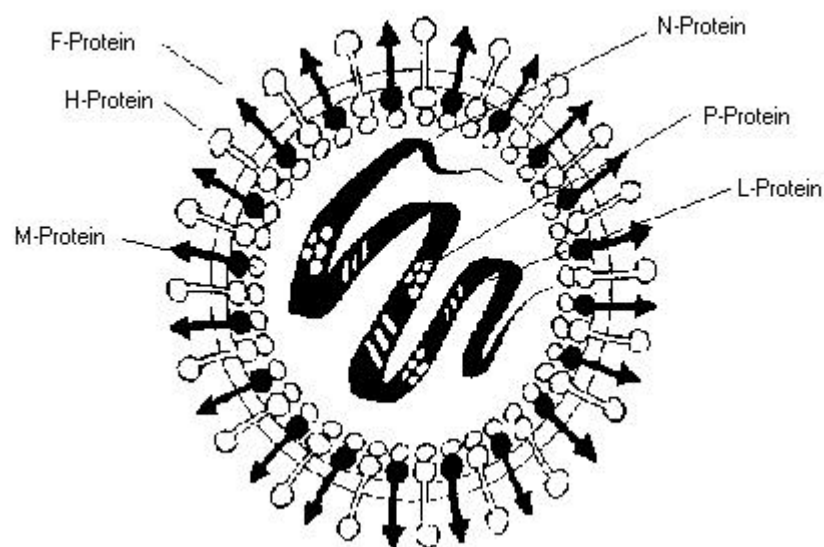
##### 2.1.1.1 Taxonomie

Taxonomisch gehört das Staupevirus zum Genus *Morbillivirus*, das zusammen mit den Genera *Paramyxovirus*, *Rubulavirus* und *Pneumovirus* die Familie der *Paramyxoviridae* bildet (PRINGLE 1991). Zu den Morbilliviren zählen neben dem Staupevirus (CDV) das humanpathogene Masernvirus (MV), das Rinderpestvirus (RPV) und der Erreger der Peste des Petits Ruminants (PPRV) (APPEL u. GILLESPIE 1972). In den letzten Jahren wurden zudem für marine Säuger pathogene Viren entdeckt, die ebenfalls den Morbilliviren zugeordnet wurden, wie das „Phocine distemper virus“ (PDV), „Dolphin distemper virus“ (DMV) und „Porpoise distemper virus“ (PMV) sowie ein Equines Morbillivirus (EMV; APPEL 1991; OSTERHAUS et al. 1995; MURPHY et al. 1999). Das Staupevirus ist antigenetisch einheitlich, die Virulenz und Gewebsaffinität von Stämmen und Isolaten kann jedoch beträchtlich variieren (GREENE u. APPEL 1998; SHELL 1990; SUMMERS et al. 1994).

### 2.1.1.2 Morphologie

Bei Morbilliviren handelt es sich um sphärische bis pleomorphe, behüllte RNA-Viren mit einem Durchmesser von 150 bis 250 nm (GREENE u. APPEL 1998). Das helikal-symmetrische Nukleokapsid weist einen Durchmesser von 13 bis 18 nm und eine Länge von bis zu 1 µm auf und umgibt den negativ polarisierten, nicht-segmentierten RNA-Einzelstrang (PRINGLE 1991). Es besitzt seinerseits eine Lipidhülle (MURPHY et al. 1999). Am Aufbau des Virions sind sechs Strukturproteine und zwei Nicht-Strukturproteine beteiligt.

Als Unterscheidungsmerkmal des Genus Morbillivirus zum Paramyxovirus diente lange Zeit das Fehlen des Enzyms Neuraminidase. Jüngere Untersuchungen ergaben jedoch, dass bei RPV und PPRV eine Neuraminidase-Aktivität vorhanden ist, während CDV diese Eigenschaft nicht besitzt (LANGEDIJK et al. 1997).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung eines Morbillivirions

Dargestellt ist die Lage der sechs Strukturproteine: Matrix-, Haemagglutinin-, Fusions-, Nukleokapsid-, Phospho- und Large-Protein

Morbilliviren besitzen sechs Strukturproteine und zwei Nicht-Strukturproteine. Am Aufbau des Nukleokapsids sind drei der sechs Strukturproteine beteiligt: das Nukleokapsid- (N-), das Phospho- (P-) und das Large-Protein (L-Protein) (PRINGLE 1991). Das Nukleokapsid wird von einer Lipiddoppelmembran umschlossen, die die restlichen drei Strukturproteine beinhaltet: Auf der Innenseite der Membran befindet sich das Matrix-Protein (M-Protein), auf

der Außenseite sind zwei Arten transmembranöser Glykoproteine (F- und H-Protein) eingelagert (APPEL 1987). Sie ragen als regelmäßige „Spikes“ von 8 bis 12 nm Länge über die Hüllenoberfläche hinaus.

### 2.1.1.3 Wirtsspektrum

Das Staupevirus hat ein sehr weites Wirtsspektrum und ist bis auf heiße und aride Regionen weltweit verbreitet (APPEL 1987; APPEL 1991). Zu den empfänglichen Tieren gehören acht Familien der Ordnung Carnivora. Dies sind von der Unterordnung Fissipedia (Landraubtiere) die Familien Canidae, Hyaenidae, Mustelidae, Procyonidae, Ailuridae, Viverridae und Felidae sowie von der Unterordnung der Pinnipedia (Wasserraubtiere) die Familie Phocidae. Weiterhin sind Schweinswale und Delphine (Ordnung: Cetacea), sowie Pekaris (Ordnung: Artiodaktyla) und Makaken (Ordnung: Primates) empfänglich (Literaturübersicht bei VAN MOLL 1994).

Beim Menschen (Familie: Hominidae) wird die Beteiligung des Hundestaupevirus an der chronisch-progressiven Osteodystrophia deformans (Morbus Paget) als Zoonoseerreger diskutiert, da Morbillivirustranskripte in Knochenläsionen von Patienten mit Morbus Paget gefunden wurden (GORDON et al. 1991; GREENE u. APPEL 1998). Zudem wurden Staupeepidemien mit einem verstärkten Auftreten von Multiple Sklerose-Fällen (MS) in Verbindung gebracht. Trotz dieser Beobachtung kann ein ursächlicher Zusammenhang jedoch nicht bestätigt werden (VOLLMER u. WAXMAN 1991; VANDEVELDE u. MEIER 1980).

Experimentell können Mäuse, Ratten, Hamster und Kaninchen infiziert werden. Die Erkrankung verläuft bei parenteraler Gabe des CDV jedoch meist klinisch inapparent (APPEL u. GILLESPIE 1972; GREENE u. APPEL 1998). Intrazerebral infizierte Primaten erkranken an einer akuten Enzephalitis (APPEL u. GILLESPIE 1972).

### 2.1.1.4 Epidemiologie

Hundestaupe tritt weltweit auf und bereitet trotz der Anwendung von Impfstoffen seit 40-50 Jahren immer wieder Probleme in der Kleintierpraxis (WRIGHT et al. 1974; TIPOLD 1997). Anhand der Daten einer retrospektiven Studie war sie im Patientenmaterial des Instituts für

Tierneurologie der Universität Bern die am häufigsten auftretende entzündliche Erkrankung des ZNS des Hundes (TIPOLD 1995).

Unter den empfänglichen Hunden kann die Staupe Hunde aller Altersklassen befallen (APPEL 1987, GREENE u. APPEL 1998). Seit dem Einsatz modifizierter Lebendvakzine in den 50er Jahren ist das Auftreten der Erkrankung sehr stark zurückgegangen (SUMMERS et al. 1994), weil die meisten erwachsenen Hunde geimpft sind. Vor dem Einsatz von Impfstoffen war jedoch eine hohe Inzidenz von Staupe bei jungen Hunden im Alter zwischen 2 Monaten und 2 Jahren zu verzeichnen (APPEL 1987; TIPOLD 1995). In geimpften Populationen sind die Welpen durch maternale Antikörper zunächst bis zu einem Alter von 6 bis 12 Wochen geschützt. Sie sind danach empfänglich für virulentes Virus bis sie durch eine Vakzination geschützt sind (APPEL 1987).

Eine transplazentare Infektion von Feten ist möglich und kann bei Welpen nach Verschwinden der maternalen Antikörper zu klinischen Symptomen der Staupe führen (APPEL 1987). Überleben die Tiere diese Erkrankung kann eine permanente Immundefizienz resultieren (GREENE u. APPEL 1987).

Akut infizierte Hunde scheiden das Virus unabhängig vom Vorhandensein klinischer Symptome mit allen Se- und Exkreten, einschließlich Urin, aus (APPEL 1987). Die Virusausscheidung beginnt circa 7 Tage nach Virusexposition und kann bis zu 60-90 Tage post infectionem (p.i.) andauern, wobei die durchschnittliche Dauer meist geringer ist (APPEL 1987; GREENE u. APPEL 1998). CDV wird vor allem durch Aerosole von Hund zu Hund verbreitet (APPEL 1987; GREENE u. APPEL 1998). Da das Virus in der Außenwelt nur kurz lebensfähig ist, ist die Ansteckungsgefahr umso höher, je dichter die Hundepopulation in einer bestimmten Umgebung ist. Die Inkubationszeit liegt zwischen einer bis vier Wochen und mehr (APPEL 1987).

Nach Erholung von natürlicher Erkrankung bzw. nach Booster-Immunsierung resultiert eine jahre- bis lebenslange Immunität (GREENE u. APPEL 1998; NIEMAND u. SUTER 2001). Diese ist jedoch nicht notwendigerweise ein ausreichender und lebenslänglicher Schutz vor Infektion. Sie kann verloren gehen, wenn die Impfung nicht regelmäßig wiederholt wird, wenn Stress, andere Krankheiten oder Medikamente zu einer Immunsuppression geführt

haben und Kontakt mit erkrankten Tieren oder Virus in hohen Dosen besteht (PARKER 1978; GREENE u. APPEL 1998).

Eine Rassedisposition für erhöhte CDV-Empfänglichkeit wird vermutet. SHELL (1990) stellte eine geringere Prävalenz brachiocephaler Rassen in Bezug auf Erkrankung, Mortalität und Entwicklung einer Enzephalitis als bei dolichocephalen Rassen fest. Empfänglichere Rassen sind nach GREENE u. APPEL (1998) Greyhounds, Sibirische Huskies, Weimaraner, Samoyeden und Alaska Malamute. Insgesamt gilt eine Rassedisposition allerdings nicht als bestätigt (TIPOLD 1997).

Zudem ist die Virulenz und der Tropismus des Staupevirusstamms wichtig für Schwere und Art der klinischen Erkrankung. Hochvirulente und neuropathogene Stämme sind beispielsweise „A75/17“ und „Rockborn 252“, die eine subakute bis chronische ZNS-Erkrankung mit Degeneration und Entzündung der weißen Substanz hervorrufen (GREENE u. APPEL 1998).

Eine saisonale Prävalenz mit verstärktem Auftreten in der kalten Jahreszeit verzeichnet APPEL (1987), wobei nicht bekannt ist, ob dies mit einer höheren Infektions-Inzidenz korreliert. Andere Autoren haben keine saisonale Häufung beobachtet.

## **2.1.2 Pathogenese**

### **2.1.2.1 Pathogenese der systemischen Hundestaupe**

Der natürliche Infektionsweg bei der Hundestaupe verläuft über die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes nach einer Tröpfchen-Inhalation von Virus (APPEL 1970). Eine initiale Virusvermehrung findet innerhalb der ersten *24 Stunden* im lymphatischen Gewebe des Rachenrings und bronchialen Lymphknoten statt.

Im Rahmen einer ersten Virämie *2-5 Tage p.i.* gelangen die Viren mittels infizierter Lymphozyten und Makrophagen zu den meisten lymphoretikulären Organen – einschließlich Milz, Thymus, cervikale und mesenteriale Lymphknoten, Knochenmark, Makrophagen in Lamina propria der Schleimhäute des Magens und Darms (APPEL 1970; WRIGHT et al. 1974) und Kupffer' Sternzellen der Leber (APPEL 1987) – wo es zu einer massiven Replikation mit einhergehender Immunsuppression (CERRUTI-SOLA et al. 1983) kommt. Klinisch äußert sich diese Phase in einem ersten Fieberschub *3-6 Tage p.i.*, der oft unbemerkt bleibt (APPEL

1987; GREENE u. APPEL 1998), und einer ausgedehnten Leukopenie, die sich primär als Lymphopenie äußert (GREENE u. APPEL 1998). Als Ausdruck der Schädigung lymphatischer Organe zeigt sich in der Sektion eine Thymusatrophie und histologisch eine Lymphozytendepletion (WRIGHT et al. 1974; KRAKOWKA et al. 1980).

Ab Tag 8 und 9 *p.i.* findet von diesen Geweben ausgehend im Zuge einer zweiten Virämie die hämatogene Infektion epithelialer Gewebe statt. Mit der Besiedelung der Epithelien erfolgt die Initiation der Virusausscheidung über sämtliche Körperexkrete (APPEL 1970).

In Abhängigkeit vom infizierenden Virusstamm und der individuellen Fähigkeit des einzelnen Hundes zur Entwicklung einer spezifischen Immunantwort nimmt die Erkrankung vom 7.-14. Tag *p.i.* einen unterschiedlichen Verlauf (APPEL 1970; APPEL u. GILLESPIE 1972; SUMMERS et al. 1984; APPEL 1987).

Hunde, die eine massive zelluläre und humorale Immunantwort bilden, erholen sich nach mildem oder sogar subklinischem Krankheitsverlauf schnell (APPEL 1970; VANDEVELDE u. ZURBRIGGEN 1995). Das Virus wird mit Hilfe der spezifischen Antikörper neutralisiert und aus dem Körper eliminiert, bevor eine Infektion epithelialer und mesenchymaler Gewebe stattfindet.

Fehlt eine zellvermittelte und humorale Immunantwort, sterben die Hunde nach kurzem und schwerem Krankheitsverlauf (VANDEVELDE u. ZURBRIGGEN 1995; GREENE u. APPEL 1998).

Bei unzureichender zellulärer und humoraler Immunantwort kommt es zunächst im Rahmen einer zweiten Virämie zur hämatogenen Virusausbreitung via infizierter Lymphozyten, Makrophagen und eventuell Thrombozyten (APPEL 1987) in die Epithelien des Digestions-, Atmungs- und Urogenitaltraktes, in die Haut, in exokrine und in endokrine Drüsen (APPEL 1987). In das ZNS gelangt das Virus über den Liquor cerebrospinalis bzw. infizierte lymphoide Zellen (HIGGINS et al. 1982) und ist erstmals ab dem 8.-10. Tag *p.i.* in perivaskulären Lymphozyten, dann in Meningealmakrophagen und Ependymzellen, später in Gliazellen und Neuronen nachweisbar (BOENIG et al. 1974; APPEL 1987). Mit steigendem Antikörpertiter können die Krankheitssymptome nachlassen und die Tiere langsam oder partiell gesunden. Sie zeigen jedoch oftmals die Tendenz, einen chronischen Krankheitsverlauf mit Progression der demyelinisierenden Läsionen als Resultat immunpathologischer

Reaktionen zu entwickeln (VANDEVELDE et al. 1982b; VANDEVELDE u. ZURBRIGGEN 1995). Die gesteigerte Antikörperproduktion kann zur Eliminierung von Virus führen. Nicht selten persistiert das Virus jedoch in bestimmten Geweben, wie Uvea, Neuronen, Pfotenballen, Lunge und ZNS (APPEL 1970; APPEL 1987; ZURBRIGGEN et al. 1995; GREENE u. APPEL 1998).

Insgesamt lässt sich eine inverse Beziehung zwischen Virus- und Antikörperpräsenz konstatieren (APPEL 1970), von der die Schwere der Erkrankung abhängt (GREENE u. APPEL 1998).

### 2.1.2.2 Pathogenese der nervalen Hundestaupe

Die Virusausbreitung in das ZNS beginnt etwa ab *Tag 10-14 p.i.* parallel mit der Ausbreitung in epitheliales Gewebe. Histopathologisch dominiert bei der **akuten Form** der nervalen Hundestaupe eine multifokale Demyelinisierung mit selektivem Verlust von Myelinscheiden, die sich in einer Phase mit massiver Immunsuppression und daher ohne entzündliche Zellinfiltration entwickelt (VANDEVELDE et al. 1982a). Im Gegensatz zur bisherigen Annahme, dass in den betroffenen Bereichen als Zeichen der Immunsuppression eine lokale Immunantwort fehlt, wurde in neueren Untersuchungen eine Einwanderung von T-Zellen während der frühen Phase der Demyelinisierung beobachtet (TIPOLD et al. 1999).

Die Mehrzahl der infizierten Zellen der weißen Substanz sind Astrozyten (MUTINELLI et al. 1989), aber auch Mikrogliazellen sind Zielzellen des Virus und eine restriktive Infektion der Oligodendrozyten konnte ebenfalls nachgewiesen werden (HIGGINS et al. 1982; VANDEVELDE et al. 1985; ZURBRIGGEN et al. 1993b). In den infizierten Zellen kommt es zunächst zur Virusreplikation, die ca. *drei Wochen p.i.* zu Läsionen (VANDEVELDE u. ZURBRIGGEN 1995; BAUMGARTNER et al. 1999) in den Prädilektionsstellen Tractus opticus, Kleinhirn und Rückenmark führt (WRIGHT et al. 1974; TIPOLD 1995; TIPOLD 1996) und durch ihre Nähe zum Liquor cerebrospinalis zu erklären ist (SUMMERS et al. 1994). Die Demyelinisierung wird als Resultat der Virusreplikation und der Abregulation der Myeligen-Transkription angesehen (VANDEVELDE et al. 1985; ZURBRIGGEN et al. 1993b; GREENE u. APPEL 1998; ZURBRIGGEN et al. 1998).

Die pathogenetischen Vorgänge, die zur Demyelinisierung führen, sind noch weitestgehend unbekannt (VANDEVELDE u. ZURBRIGGEN 1995). Als Erklärungsansätze werden u. a. folgende Mechanismen diskutiert: Zum einen können infizierte Zellen toxische Faktoren produzieren, die Oligodendrozyten oder die von ihnen formierten Myelinscheiden schädigen. Des Weiteren können die Astrozyten als Folge ihrer Infektion die nutritiven und trophischen Faktoren für Oligodendrozyten nicht mehr produzieren. Überdies werden Makrophagen als Antwort auf die Virusinfektion aktiviert, die daraufhin Zytokine und andere toxische Stoffe (z. B. ROS = reactive oxygen species) generieren (SUMMERS et al. 1994).

ALLDINGER et al. (2000) wiesen eine aufregulierte Expression von CD44 in staupe-assoziierten ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung nach. Als exprimierende Zellen wurden Astrozyten bestimmt. Eine Beteiligung an der Pathogenese wird aufgrund der Induktion von Chemokinen und Zytokinen vermutet. Zudem wird eine Aufregulation von MHC II in der weißen Substanz beschrieben (ALLDINGER et al. 1996).

Der **chronische Status** der neurologischen Form der Hundestaupe entsteht durch eine späte oder unvollständige Immunantwort nach Abnahme der Immunsuppression (SUMMERS et al. 1994; VANDEVELDE u. ZURBRIGGEN 1995). Neben einer Demyelinisierung fällt bei der in diesem Stadium auftretenden CDV-Enzephalitis histologisch eine massive perivaskuläre Infiltration mit Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen („perivaskuläres cuffing“) auf (BOLLO et al. 1986; SUMMERS et al. 1994; TIPOLD 1997). Ziel der Invasion von Entzündungszellen ist die Viruseliminierung, wozu von den infiltrierenden Plasmazellen intrathekal Antikörper produziert werden (VANDEVELDE et al. 1986).

Diese Immunantwort kann jedoch zu einer weiteren Progression des Gewebsschadens führen (VANDEVELDE et al. 1982b). Die CDV-Antikörper-Komplexe scheinen mit infizierten Makrophagen in ZNS-Läsionen zu interagieren und diese Zellen zu aktivieren. Als Folge davon kommt es zu einer Freisetzung von ROS, die zur Zerstörung der Oligodendrozyten („innocent bystander“) und des Myelins führt und somit als „Bystander-Mechanismus“ zur Demyelinisierung beiträgt (GRIOT et al. 1990; BOTTERON et al. 1992; GREENE u. APPEL 1998). Des Weiteren entlassen Makrophagen Lymphokine und Monokine, die den Charakter der Läsionen von demyelinisierend zu nekrotisierend umwandeln können (SUMMERS et al. 1994). Die zytotoxische Immunantwort gegen virusinfizierte Zellen kann darüber hinaus die

Bildung von Autoantikörpern gegen Myelin provozieren (VANDEVELDE et al. 1982b). Die durch Makrophagen vermittelte Entzündungsreaktion ist demnach kritisch zu beurteilen (SUMMERS et al. 1994).

Trotz der erfolgten Immunantwort kann das Virus im ZNS persistent vorhanden bleiben. Das führt zu einer nicht versiegenden Quelle von Antigen, die die Gewebsschädigung aufrechterhält (ZURBRIGGEN et al. 1995; TIPOLD 1997).

Ein besseres Verständnis der Pathogenese der Demyelinisierung ist nicht nur für die Staupe des Hundes von Interesse, sondern ebenso für ZNS-Erkrankungen des Menschen, wie MS und die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Bei beiden Krankheiten wird eine Virus-ätiologie mit großer Ähnlichkeit zu CDV vermutet (BOENIG et al. 1974). Daher kommt der Hundestaupe als Tiermodell für demyelinisierende Erkrankungen und Pathogenesestudien große Bedeutung zu (BOENIG et al. 1974; APPEL et al. 1981).

### **2.1.3 Klinisches Bild**

Dauer und Schweregrad des klinischen Bildes der Hundestaupe variieren sehr stark in Abhängigkeit von Alter und Immunkompetenz des Individuums, des Virusstamms und der Art der beteiligten Sekundärerreger (APPEL 1970; SHELL 1990; SUMMERS et al. 1994). Mehr als 50-70 % der natürlichen CDV-Infektionen verlaufen wahrscheinlich subklinisch (GREENE u. APPEL 1987). Die Inkubationszeit reicht von vier Tagen (PARKER 1978) bis zu vier Wochen und mehr (APPEL 1987).

#### **2.1.3.1 Systemische Symptome**

Milde systemische Formen äußern sich meist in eher unspezifischen Symptomen, wie dem ersten Fieberschub während der virämischen Phase, begleitet von Teilnahmslosigkeit, Dehydratation, Anorexie und Gewichtsverlust (WRIGHT et al. 1974). Spezifischere Symptome nach anfänglicher Organbesiedelung sind Augen- und Nasenausfluss, Husten, Dyspnoe, Diarrhoe und Erbrechen (SHELL 1990). Hunde mit diesen Symptomen können sich nach Ausbildung einer effizienten zellulären und humoralen Immunantwort erholen; das Virus wird aus den Geweben entfernt. In bestimmten Regionen kann sich jedoch eine Persistenz entwickeln und ZNS-Symptome können sich manifestieren (SHELL 1990;

GREENE u. APPEL 1998). Bei mangelnder Immunantwort ist eine schwere klinische multisystemische Erkrankung zu beobachten, oft begleitet von neurologischen Ausfallserscheinungen (VANDEVELDE u. ZURBRIGGEN 1995).

Im Bereich des **Respirationsapparates** entstehen Rhinitis mit serösem Nasenausfluss, der bei bakteriellen Sekundärinfektionen einen mukopurulenten Charakter annimmt. Die Tiere zeigen vermehrt Husten. Eine Röntgenaufnahme des Thorax bestätigt das Vorhandensein einer interstitiellen Pneumonie, der durch bakterielle Sekundärinfektion eine Bronchopneumonie folgen kann. In klassischen Fällen werden die respiratorischen Symptome durch unterschiedlich schwere klinische Symptome im Bereich des **Gastro-Intestinaltraktes** begleitet. Sie äußern sich als Erbrechen und Durchfall. Daraus resultieren schwere Dehydratation und rasche Abmagerung bis Kachexie (SHELL 1990; GREENE u. APPEL 1998). Respiratorische und gastrointestinale Manifestationen werden mitunter als „katarrhalische Form“ zusammengefasst.

Bei natürlicher Infektion wird ein sogenanntes „Staupeexanthem“, eine pustuläre Dermatitis an der **Haut** von Unterbauch, Schenkel- und Ohrinnenflächen, beschrieben, die bei experimentell infizierten Hunden nicht beobachtet wird. Eine Hyperkeratose an Fußballen und Nasenspiegel wird heute nur noch in Ausnahmefällen diagnostiziert (APPEL 1987), ist jedoch ein typisches Symptom für Staupe (TIPOLD 1995).

Neben einer serösen bis mukopurulenten Konjunktivitis, einer Uveitis und Hornhautulzera bis hin zu Hornhautperforationen können bei Fundus-Untersuchungen der **Augen** Läsionen der Retina beobachtet werden. Zudem kann eine Opticus-Neuritis mit oder ohne Demyelinisierung vorliegen (SCHULZ 1991), die in Erblindung resultieren kann (SHELL 1990).

Erkranken die Tiere als Welpen während der permanenten Zahnentwicklung können **Zahnschmelz**-Hypoplasien mit Zahnverfärbungen beobachtet werden (SHELL 1990; PARKER 1978). Es resultiert ein sogenanntes „Staupegebiss“ (NIEMAND u. SUTER 2001), das relativ pathognomonisch für eine stattgefundene Infektion mit CDV ist (GREENE u. APPEL 1998).

BAUMGARTNER et al. (1995) beschreiben eine Osteosklerose der Metaphysen langer **Röhrenknochen** bei CDV-Infektion junger, wachsender Hunde.

Eine virusinduzierte **Kardiomyopathie** wurde bei experimentell infizierten neonatalen gnotobiotischen Hunden gefunden (HIGGINS et al. 1981).

Die aus der CDV-Infektion resultierende Immunsuppression kann zu **opportunistischen Infektionen** mit Bakterien (z. B. Salmonellen), Protozoen (z. B. Toxoplasma gondii) oder Viren führen, die als Komplikationen den Verlauf der Erkrankung wesentlich beeinflussen können (GREENE u. APPEL 1998).

Mit Ausnahme der Hyperkeratose an Nasenspiegel und Sohlenballen und der sich rasch entwickelnden Kachexie kann keines der oben genannten extraneuralen Symptome als charakteristisch für Staupe angesehen werden. Sie werden auch bei anderen entzündlich-infektiösen ZNS-Erkrankungen des Hundes gefunden (TIPOLD 1995; TIPOLD 1997).

### 2.1.3.2 Neurologische Symptome

Neben diesen extraneuralen Symptomen manifestieren sich zudem neurologische Symptome, die den systemischen folgen, gleichzeitig mit ihnen oder de novo auftreten können (PARKER 1978; SUMMERS et al. 1994; TIPOLD et al. 1994; GREENE u. APPEL 1998). Die Ausprägung der Symptome ist von Tier zu Tier sehr unterschiedlich und spiegelt nicht immer das Vorhandensein der histologisch nachweisbaren, vorwiegend multifokalen Läsionen wider. Eine klinisch-histopathologische Korrelation bei der neurologischen Form der Hundestaupe fehlt somit meistens (TIPOLD 1996).

Unabhängig davon, ob eine akute oder chronische CDV-Infektion des ZNS vorliegt, ist ihr Verlauf typischerweise progressiv (BOENIG et al. 1974; PARKER 1978; GREENE u. APPEL 1998). Die neurologischen Symptome sind sehr vielfältig. Sie können den Symptomen einer Großhirnläsion (Anfallsleiden, verzögerte Propriozeption, fehlender Drohreflex), Hirnstammläsion (Gangstörung, gestörte Propriozeption, Kopfnervenausfälle, Bewusstseinsstörungen) oder Kleinhirnläsion (Tremor, Ataxie, Hypermetrie) entsprechen (BOENIG et al. 1974; APPEL 1987; TIPOLD 1996; GREENE u. APPEL 1998). Zentral vestibuläre Störungen (vestibuläre Ataxie, Nystagmus, Kopfschiefhaltung, Propriozeptionsstörungen und Kopfnervenausfälle) sind häufig zu diagnostizieren, wohingegen solitäre Schädigungen des Nervus opticus (Blindheit, dilatierete Pupillen) seltener beobachtet werden können (GREENE u. APPEL 1998). Das Auftreten eines Myoklonus (unwillkürliche Muskel-

kontraktionen vor allem an Extremitäten und Kopfmuskeln) wurde früher als pathognomonisch für Staupe angesehen (TIPOLD 1995; GREENE u. APPEL 1998). Diese Ausfallserscheinung kann jedoch auch bei anderen entzündlich-infektiösen Erkrankungen des ZNS festgestellt werden (TIPOLD 1997).

## 2.2 Mikroglia

### 2.2.1 Terminologie

Bereits die bedeutenden Neurologen des vorigen Jahrhunderts Nissl und Alzheimer diskutierten die Möglichkeit, dass Zellen nicht-neuroektodermalen Ursprungs in das sich entwickelnde ZNS einwandern. Ramón y Cajal (1913) sprach vom „el tercer elemento“, dem dritten Element des ZNS, womit er Zellen meinte, die morphologisch von den Neuronen und astrozytärer Neuroglia (erstes und zweites Element) zu differenzieren waren (zusammengefasst durch STREIT 1995).

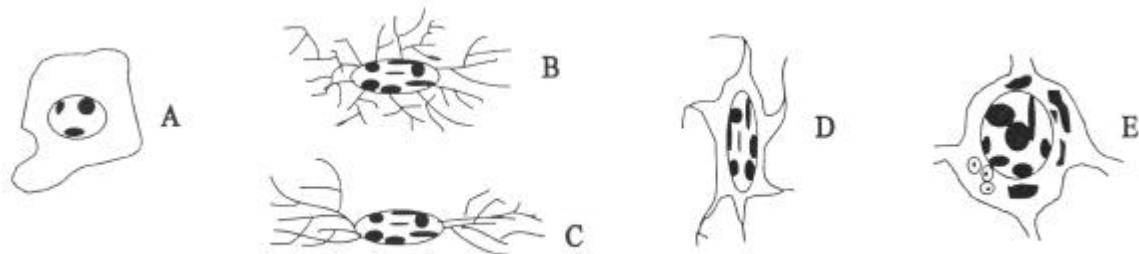
Die Entdeckung der Mikrogliazellen wird jedoch dem Neurophysiologen DEL RIO-HORTEGA zugeschrieben, von dem die erstmalige Beschreibung der Zellen in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts stammt (1932). Mittels Silberimprägnierung kam er zu der Erkenntnis, dass am Aufbau des zentralen Nervensystems neben den bereits bekannten Nervenzellen und Astrozyten zwei weitere Zellformen beteiligt sind. Zellen ektodermaler Herkunft mit kleinem, rundem Kern, schmalem Zytoplasmasaum und drei bis vier kurzen, spießartigen Fortsätzen bezeichnete er als Oligodendrozyten, die er mit den Astrozyten als „Makroglia“ zusammenfasste. Ihnen stellte er die „Mikroglia“ gegenüber, die seiner Meinung nach mesodermaler Herkunft war. Am Aufbau des zentralen und peripheren Nervensystems ist neben den Nervenzellen als zweites Gewebeelement also die „Neuroglia“ beteiligt, mit der Makro- und Mikroglia bezeichnet werden (LEONHARDT 1990). Die mit zahlreichen Fortsätzen ausgestatteten Neurogliazellen bilden im ZNS das interstitielle Gewebe (SCHULZ 1991). Die Mikroglia wird zu den Gehirnmakrophagen gerechnet (JORDAN u. THOMAS 1988). VAN FURTH (1989) ordnet sie den Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) zu.

Die Mikroglia wird in der Literatur mit den verschiedensten Namen bezeichnet, da sowohl Entwicklungs- und Funktionsstadien als auch die anatomische Lokalisation als Kriterien zur Benennung herangezogen werden (DICKSON et al. 1991). Nach ihrem Entdecker werden die Mikrogliazellen „Hortegazellen“ genannt. Nach Inkorporation von Detritus oder Fettpartikeln werden sie unter anderem als „Gitterzellen“, „Fettkörnchenzellen“ („fat granular cells“), „Lipidphagozyten“ oder „Schaumzellen“ („foamy cells“) bezeichnet. „Stäbchenzellen“ („rod

cells“) (NISSL 1899; zusammengefasst durch STREIT 1995), „M-Zellen“, „Reiszellen“, „zusammengesetzte granuläre Korpuskeln“ oder „Körnerzellen“, „Entzündungskugeln“ („inflammation globules“) oder – nach ihrer vermuteten Abstammung – „Mesoglia“ sind weitere in der Literatur vorkommende Ausdrücke für Mikrogliazellen (JORDAN u. THOMAS 1988; LEONHARDT 1990; GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995).

## 2.2.2 Morphologie, Entwicklungs- und Funktionsstadien

Morphologisch werden bei den Mikrogliazellen im *adulten ZNS* mindestens drei eindeutig differenzierbare Isoformen unterschieden, die mit unterschiedlichen Aktivierungs- und Entwicklungsstufen korrelieren (DAVIS et al. 1994; STREIT 1995; s. Abb. 2):



**Abb. 2:** Isoformen der Mikroglia, modifiziert nach KETTENMANN (1995)

A: amöboide Mikroglia

B: ramifizierte Mikroglia (graue Substanz)

C: ramifizierte Mikroglia (weiße Substanz)

D: aktivierte, nicht phagozytierende Mikroglia

E: aktivierte, phagozytierende Mikroglia

Für das unveränderte adulte Gehirn ist *ruhende* oder *ramifizierte Mikroglia* charakteristisch (DEL RIO-HORTEGA 1932; GIULIAN u. BAKER 1986). Die Zellen präsentieren sich als 5 bis 10 µm große, hochgradig verästelte, spindelförmige, farbdichte Gliazellen mit kleinem, ovalem, heterochromatischem Kern und spärlichem Zytoplasma (STREIT 1995). Dabei bestehen Unterschiede im Verteilungsmuster der Fortsätze in Abhängigkeit von ihrer Umgebung. Während die Fortsätze in der weißen Substanz bipolar auslaufen, dominiert in der grauen Substanz ein sternförmiges Verteilungsmuster (STREIT 1995; KETTENMANN u. RANSOM 1995; GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995) (vgl. Abb. 2 B u. C). Durch ihre gleichmäßige und nicht-überlappende Verteilung im Neuropil unterscheiden sich die ruhenden Mikrogliazellen von den Astrozyten und Oligodendrozyten (LEONHARDT 1990; JORDAN u. THOMAS 1988).

In pathologisch alteriertem Gewebe wird *aktivierte* oder *reaktive Mikroglia* angetroffen, die jedoch keine Phagozytoseaktivität entfaltet (STREIT 1995). Sie ist morphologisch durch eine runde bis reiskornförmige hypertrophe Gestalt mit zunehmender Reduzierung der Fortsätze charakterisiert (JORDAN u. THOMAS 1988). Die Zellen besitzen die Fähigkeit zur Proliferation (vgl. Abb. 2 D).

Als dritte Isoform wird *phagozytierende Mikroglia* beschrieben. Die Zellen sind deutlich abgerundet und fallen besonders durch ihren Gehalt an Lysosomen und Phagosomen auf (LEONHARDT 1990; SCHULZ 1991) (vgl. Abb. 2 E).

Im *fetalen und frühen postnatalen Gehirn* wird zudem eine weitere Isoform, die *amöboide Mikroglia* beschrieben (DEL RIO-HORTEGA 1932; GIULIAN u. BAKER 1986). Die großen makrophagenartigen Zellen sind abgerundet und besitzen nur wenige, kurze Ausläufer (vgl. Abb. 2 A). Sie werden nicht durch einen Gewebsschaden hervorgerufen, sondern scheinen eine normale und weitverbreitete Form in der Entwicklung des Gehirngewebes zu sein (LING et al. 1980; JORDAN u. THOMAS 1988; PERRY et al. 1995). Die amöboide Mikroglia zeigt Eigenschaften, die charakteristisch sind für Gewebsmakrophagen (Expression von Oberflächenmolekülen, Migration, Zytotoxin- und Zytokin-Produktion), aber zudem auch Merkmale von Knochenmarksvorläuferzellen (Fähigkeit zur Proliferation, Antwort auf Koloniestimulierende-Faktoren, Ähnlichkeiten in Membranflusseigenschaften; GIULIAN 1995). Ihre Funktion besteht in der Eliminierung des während natürlicher Degenerations- und Umbauprozesse in der postnatalen Entwicklungsphase anfallenden überschüssigen Zellmaterials durch Phagozytose (STREIT et al. 1988; PERRY et al. 1995; PERRY 1998). Forschungen von NAKAJIMA et al. (1992) zeigen, dass amöboide Mikrogliazellen durch die Enzyme Elastase, Plasminogenaktivator und Plasmin den Abbau des fetalen Interzellularraums während der Ontogenese regulieren, was die Voraussetzung für die Ausbreitung der Neuriten ist. Die Mikroglia ist also wichtig für die Modellierung des Gehirnparenchyms (PERRY u. GORDON 1988). Während der Gehirnreifung nimmt sie eine hochgradig differenzierte Morphologie an (PERRY et al. 1995).

Die Mikroglia erscheint nicht als einheitliche Zellpopulation, sondern zeigt eine ausgeprägte phänotypische Heterogenität (SMINIA et al. 1987; DEGROOT et al. 1992; STREIT u. GRAEBER 1993; DAVIS et al. 1994). Über die Beziehung der einzelnen Erscheinungs-

formen zueinander existieren verschiedene Hypothesen. Nach JORDAN und THOMAS (1988) ist eine Kombination dieser Hypothesen am wahrscheinlichsten, derzufolge verzweigte und aktivierte Mikrogliazellen konvertierbar sind. Demnach proliferiert ramifizierte, ruhende Mikroglia nach Gewebsschäden, die Fortsätze werden retrahiert, die Zellkörper runden sich ab und sie wird so zu reaktiver und nach letalen Insulten zu phagozytischer Mikroglia (STREIT et al. 1988; GEHRMANN et al. 1991; GIULIAN 1995; STOLL u. JANDER 1999), was auch in Zellkultursystemen (GIULIAN u. BAKER 1986; SUZUMURA et al. 1990) und mit Langzeitvideomikroskopie gezeigt werden konnte (THOMAS 1992). Dieser morphologische Polymorphismus (GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999) ist zugleich verbunden mit einer Veränderung des Immunphänotyps, wobei die Expression von Oberflächenmolekülen, wie z. B. CR3 (complement receptor 3, CD11b/CD18), aufreguliert (STOLL u. JANDER 1999) oder eine De-novo-Expression beobachtet werden kann (GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995). Nach beendeter Phagozytose erfolgt eine Rückwandlung ins ruhende Stadium (JORDAN u. THOMAS 1988). Diese morphologische und funktionelle Plastizität wird ebenfalls im gesunden Gehirn während der embryonalen Entwicklung deutlich (STREIT 1995).

### 2.2.3 Herkunft

Die Frage der Herkunft der Mikrogliazellen bietet nach wie vor die Grundlage zu kontroverser Diskussion (THOMAS 1992; LING u. WONG 1993). Dabei herrschen grundsätzlich zwei theoretische Hauptrichtungen vor: Vertreter der einen Richtung sind der Ansicht, die Mikroglia sei *mesodermalen Ursprungs* (DEL RIO-HORTEGA 1932). Diese gegenwärtig vorherrschende Meinung beinhaltet, dass Mikrogliazellen ebenso wie Makrophagen von monozytären Vorläuferzellen aus dem Knochenmark abstammen (STREIT et al. 1988; THOMAS 1992), die im Laufe der Embryonalentwicklung durch die noch nicht geschlossene Blut-Hirn-Schranke in das ZNS einwandern und sich dort ausdifferenzieren (PERRY u. GORDON 1991; LING u. WONG 1993).

Das Vorhandensein gemeinsamer funktioneller Eigenschaften und großer Übereinstimmung der exprimierten Antigene mit der Monozyten-Makrophagen-Linie (DIJKSTRA et al. 1985; PERRY u. GORDON 1991; FLARIS et al. 1993; FEDOROFF 1995; STOLL u. JANDER 1999) bestärkt hierbei die Annahme eines gemeinsamen ontogenetischen Ursprungs und legt

eine Herkunft von hämatopoetischen Stammzellen nahe (STREIT 1995). Der präzise Ablauf der Invasion und die Identifikation der Knochenmarkvorläuferzellen ist nach wie vor Gegenstand intensiver Untersuchungen (STREIT 1996).

Vertreter des zweiten Ansatzes sehen Mikrogliazellen als *neuroektodermale Abkömmlinge* an. Versuche, die diese These erhärten, stammen z. B. von MATSUMOTO und FUJIWARA (1987), die zerstörte Knochenmarkszellen bei Lewisratten durch mit OX-27 (Antikörper gegen den Haplotyp C des MHC I) markierte Zellen ersetzen. In den Rattenchimären war jedoch keine OX-27-positive Mikroglia nachweisbar. Gleiche Resultate erbrachte die Isotopen-Inkorporation in Knochenmarkszell-DNA. Als weiterer Ansatz wurden Versuche mit embryonalen Neuroektoderm-Kulturen vor Vaskularisation und nach Entfernung mesodermaler Zellen vorgenommen. In diesen Kulturen entwickelten sich Mikrogliazellen (FEDOROFF 1995). Die Resultate dieser Versuche machen die Herkunft der Mikroglia von hämatopoetischen Vorläuferzellen unwahrscheinlich. Daher wird gemäß dieser Hypothese eine gemeinsame Abstammung der Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia von neuroektodermalen Matrixzellen, den sogenannten Glioblasten, postuliert.

Nach wie vor ist eine endgültige Identifizierung der Herkunft nicht möglich. Es gibt für beide Hypothesen plausible Hinweise. Allgemein wird jedoch die zuerst genannte Hypothese favorisiert.

Verbunden mit der Frage der Herkunft ist das Problem des Turnovers, d. h. des Ersetzens intrinsischer Mikroglia durch Zellen von außerhalb des ZNS. Ramifizierte Mikrogliazellen sind eine relativ permanente Population (PERRY u. GORDON 1988), die postnatal nahezu konstant bleibt (LORD u. DUNCAN 1987) und eine sehr geringe Turnover-Rate im adulten ZNS (PERRY u. GORDON 1991; LAWSON et al. 1992) aufweist. In Experimenten mit Knochenmarkchimären von Ratten wurde eine Turnover-Rate der Mikroglia von ca. 1 % festgestellt, während für leptomeningeale (60 %) und perivaskuläre (30 %) Makrophagen deutlich höhere Raten ermittelt wurden (HICKEY et al. 1992).

## **2.2.4 Ausgewählte Darstellungstechniken**

### **2.2.4.1 Versilberungstechniken**

Die wohl älteste Methode zur Identifizierung von Mikrogliazellen ist die Silbercarbonat-Imprägnierung nach DEL RIO-HORTEGA (1932). Sie erlaubte erstmals eine exakte lichtmikroskopische Darstellung der Mikroglia bei Maus, Ratte, Kaninchen und Katze und war die einzige gebräuchliche histochemische Färbung für mindestens 50 Jahre (STREIT 1995).

### **2.2.4.2 Ferritin**

Ferritin ist ein intrazelluläres Eisen-Speicher-Protein, das in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommt. In Monozyten ist die mittlere Ferritin-Konzentration jedoch 7,5 mal höher als in anderen Zellen. Wie bei den Monozyten ist das Ferritin im Gehirn in Mikrogliazellen in größerem Ausmaß vorhanden als in den anderen Gehirnzellen (KANEKO et al. 1989). Mit Antiferritin lässt sich das Ferritin anfärben und so die Mikroglia markieren (STREIT 1995).

Die Anwesenheit von Ferritin, das eine zentrale Rolle beim Recycling des Eisens für die Synthese von Häm und anderen Proteinen spielt, legt die Vermutung nahe, dass Mikrogliazellen aktiv am Eisen-Metabolismus beteiligt sind (STREIT 1995).

### **2.2.4.3 Histochemische Methoden**

Mikrogliazellen haben eine Vielfalt von Enzymen, die sich unter Ausnutzung ihrer katalytischen Aktivität nachweisen lassen. Dazu gehören die saure Phosphatase (AcPase), Adenosintriphosphatase (ATPase), Inosindiphosphatase (IDPase), Thiaminpyrophosphatase (TPPase),  $\alpha$ -Naphthylsäure-Esterase (NSE), Nucleotiddiphosphatase (NDPase), Purinnucleotidphosphorylase (PNPase) und Uridinphosphatase (UTPase) (NOVIKOFF u. GOLDFISCHER 1961; OEHMICHEN 1980; MURABE u. SANO 1982; CASTELLANO et al. 1990; SAWADA et al. 1990; NAKAJIMA et al. 1992; BANATI et al. 1993a; STREIT 1995). Einige dieser Enzyme entfalten ihre Aktivität jedoch ausschließlich bei einer bestimmten Isoform der Mikrogliazellen. Da sie zudem auch in anderen Gliazellarten gefunden werden können, sind sie als selektive Marker für Mikrogliazellen nicht geeignet (STREIT 1995).

Lektine sind pflanzliche Eiweißextrakte, die spezifisch mit bestimmten Polysacchariden reagieren. Diese Reaktion weist Parallelen zur Präzipitationsreaktion zwischen Antikörper und Antigen auf, ist jedoch nicht direkt mit ihr vergleichbar. Lektine, die zum histochemischen Nachweis von Mikrogliazellen verwendet wurden sind z.B. *Griffonia simplicifolia* (B4-Isolektin), *Ricinus communis* (agglutinin-120) und *Viscum album* (mistletoe lectin-1) (STREIT u. KREUTZBERG 1987; STREIT 1995).

Die Plasmamembran der Mikrogliazellen ist komplex aufgebaut und enthält neben Enzymen eine große Anzahl von Rezeptor- und Adhäsionsmolekülen (STREIT 1995). Diese Multi-antigenizität ermöglicht den Einsatz verschiedenster Antikörper, um Mikrogliazellen zu charakterisieren (DIJKSTRA et al. 1985; PERRY u. GORDON 1988; GEHRMANN u. KREUTZBERG 1991; FLARIS et al. 1993; PERRY et al. 1995; STREIT 1995). Dabei ist eine Unterscheidung zwischen ramifizierter und aktivierter Mikroglia zum Teil möglich, da es in aktivierter Mikroglia zu einer veränderten, z.B. erhöhten oder De-novo-Expression von Oberflächenantigenen und Rezeptoren kommt (STREIT 1995). Interessanterweise können diese Rezeptoren auch auf Makrophagen in nicht-neuralem Gewebe gefunden werden (STREIT 1995; STOLL u. JANDER 1999), was als Beweis für die enge verwandtschaftliche Beziehung zur myelo-monozytären Zelllinie herangezogen wird.

Bis heute ist die Gesamtheit der Oberflächenantigene der Mikrogliazellen noch nicht identifiziert. Zudem fehlt ein spezifischer Differenzierungsantikörper, der nicht mit Antigenstrukturen der Makrophagen in extrazerebralen Geweben kreuzreagiert (STREIT 1995; GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999).

In der Literatur wird die Expression von CD11b/c<sup>+</sup> und CD45<sup>low</sup> zur Identifizierung der Mikroglia herangezogen (FORD et al. 1995). Aber auch der immunhistochemische Nachweis der konstitutiven Expression von CD18 kann in Kombination mit der morphologischen Untersuchung zur Identifizierung herangezogen werden.

### 2.2.5 Funktionelle Eigenschaften und deren Regulation

Mikrogliazellen machen, folgt man den schwankenden Angaben in der Literatur, 5 bis 15% der gesamten Gliazellpopulation des ZNS aus (KREUTZBERG 1987; PERRY u. GORDON 1988; LAWSON et al. 1990; FEDOROFF 1995; GIULIAN 1995; STREIT 1995;

GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999; REZAIE u. MALE 1999; STOLL u. JANDER 1999). Außer im Gehirn und Rückenmark treten sie auch in der Retina auf. Sie sind im Nervengewebe und dem retinalen Ganglion gleichmäßig verteilt und ihre Zytoplasmaausläufer zeigen keine Überlappungen (STREIT 1995). In der grauen Substanz befinden sie sich in unmittelbarer Nähe der Neuronen und in der weißen Substanz zwischen den Nervenfaserversträngen (LAWSON et al. 1993). Im normalen adulten murinen ZNS z. B. befinden sich schätzungsweise  $3,5 \times 10^6$  Mikrogliazellen (LAWSON et al. 1993).

Die Mikroglia wurde vor allem bei Nagern und Menschen untersucht. Von Primaten und den meisten anderen Säugetierspezies weiß man jedoch, dass sie ebenfalls Mikroglia besitzen (STREIT 1995). Da speziesspezifische Antikörper zur Lokalisierung der Mikroglia für Katze, Hund und Primaten nur in sehr geringem Umfang erhältlich sind, kommen alternativ enzym- und lektin histochemische Nachweismethoden zum Einsatz (STREIT 1995).

Mikrogliazellen wurden zudem bei Intervertebraten (z. B. Bluteigel) und Nicht-Säugetern, wie Huhn (FUJIMOTO et al. 1987), Eidechse und Fischen, identifiziert (CASTELLANO et al. 1991).

Unter morphologischen und histochemischen Kriterien lässt sich die Aktivität und somit die Entfaltung der Funktion der Mikroglia in drei Stadien unterteilen: ruhend, aktiviert und phagozytierend. Dies wurde als „funktionelle Plastizität“ der Mikroglia bezeichnet (STREIT et al. 1988), um die enorme Veränderlichkeit in Bezug auf Aussehen und Immunphänotyp als Antwort auf pathologische Bedingungen zu betonen.

### **2.2.5.1 Ruhende Mikroglia**

Über die Funktion der *ruhenden, ramifizierten Mikroglia* und die Faktoren, die die Zellen in diesem Zustand halten, ist noch wenig bekannt (DEL RIO-HORTEGA 1932; GEHRMANN et al. 1992; GIULIAN 1992; THOMAS 1992). Durch ihre gleichmäßige Verteilung im Gehirngewebe und die zahlreichen langen Zellausläufer ist sie prädestiniert, die Umgebung auf pathologische Veränderungen zu überwachen (ULVESTAD et al. 1994a).

Langzeitvideomikroskopie an lebenden Zellkulturen zeigt, dass ramifizierte Mikrogliazellen aus dem Gehirn innerhalb weniger Minuten ihre Morphologie ändern. Dabei variieren Gestalt und Größe des Zytoplasmas. Es kommt zur Motilität granulärer und vesikulärer Strukturen

sowie zum Zurückziehen und Ausstrecken der Fortsätze. Zusammen mit einer ungerichteten Bewegung spiegeln diese Eigenschaften den dynamischen Charakter dieser Zellform wider (THOMAS 1992), während zuvor das Prinzip einer ruhenden, „schlafenden“ Zelle postuliert wurde (DEL RIO-HORTEGA 1932).

Im Gegensatz zur amöboiden ist die ramifizierte Mikrogliazelle nicht zur Phagozytose befähigt (GIULIAN u. BAKER 1986). Dagegen kann eine hoch effiziente Pinozytose z. B. anhand der Aufnahme von Meerrettichperoxidase, Tinte oder Lucifergelb beobachtet werden. Diese Eigenschaft lässt zusammen mit der raschen Motilität auf eine Reinigungsfunktion der Mikroglia („fluid cleansing“) schließen (RANSOM u. THOMAS 1991). Die Reinigungsfunktion betrifft nicht nur im Rahmen physiologischer Vorgänge anfallende Stoffwechselendprodukte, sondern auch potentiell krankheitserregende Agenzien geschädigter Zellen. Damit kommt den Zellen vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase und Gewebsintegrität im ZNS („steady-state“-Kondition) (GRAEBER u. STREIT 1990) zu.

Eine Rolle in der physiologischen Signalübertragung wurde nicht bestimmt (BRUCE-KELLER 1999). Die ruhende Mikroglia hat eine weniger deutlich ausgeprägte Expression von Oberflächenmarkern (PERRY u. GORDON 1991; KREUTZBERG 1996; REZAIE u. MALE 1999). Das Netzwerk ruhender Zellen kann durch pathologische, entzündliche oder traumatische Stimuli aktiviert werden (STREIT et al. 1988), wobei die ubiquitäre Verteilung ein schnelles Reagieren nach pathologischen Insulten ermöglicht (GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995).

Zusätzlich zu ihren langen und zahlreichen Zellausläufern besitzen die Mikrogliazellen eine weitere morphologische und elektrophysikalische Besonderheit, die sie besonders sensitiv für pathophysiologische Veränderungen in ihrer Umgebung macht (KETTENMANN et al. 1990). Sie exprimieren einen zelleinwärts gerichteten Kalium-Kanal ( $K^+$ -Kanal) (KETTENMANN et al. 1990; BANATI et al. 1991; MCLARNON et al. 1997). Dieses einmalige Kalium-Kanal-Muster unterscheidet sie von peritonealen und gewebespezifischen Makrophagen wie auch von anderen Gliazellen, die einen nach außen gerichteten Kalium-Kanal aufweisen (REZAIE u. MALE 1999). Das Fehlen auswärts gerichteter Flüsse macht die Zellen sehr empfindlich gegenüber neuronaler Depolarisation und damit verbundener Kalium-Freisetzung in den

Extrazellularraum (GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995). Die funktionelle Konsequenz ist, dass selbst geringste Kalium-Einwärtsströme zu einer ausgeprägten Membrandepolarisation der Mikrogliazellen selbst führen, was Voraussetzung für die schnelle Antwort in Form von Aktivierung und Mobilisation der Zellen ist.

### 2.2.5.2 Aktivierte Mikroglia

Die Mikroglia wird durch eine Vielzahl von Stimuli *aktiviert*. Dabei kann die Mikrogliaaktivierung im Gehirn auch ohne offensichtliche neuropathologische Veränderungen auftreten, was darauf hindeutet, dass sie sowohl durch physiologische als auch durch pathophysiologische Signale hervorgerufen werden kann (BRUCE-KELLER 1999). Wie dieser Aktivierungsmechanismus in vivo reguliert wird und welche Faktoren dazu benötigt werden ist jedoch noch nicht eindeutig definiert (GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995). Als Auslöser kommen eine große Vielzahl von Stimuli in Frage, wie Nervendebriis, Blutgerinnsel und tote Zellen (DEL RIO-HORTEGA 1932), aber auch Zytokine, Immunaktivatoren und Rezeptor-Liganden (GIULIAN et al. 1991). In vitro wurde gezeigt, dass Mikroglia durch Faktoren stimuliert wird, die auch Makrophagen beeinflussen und aktivieren können, wie die koloniestimulierenden Faktoren GM-CSF (granulocyte-monocyte colony stimulating factor), M-CSF (monocyte colony stimulating factor) und CSF-1 (colony stimulating factor 1) (GIULIAN u. INGEMAN 1988; SAWADA et al. 1990; SUZUMURA et al. 1990; LEE et al. 1992; LEE et al. 1994; LIU et al. 1994; RAIVICH et al. 1994; SIEVERS et al. 1994; BLEVINS u. FEDOROFF 1995; STREIT 1995), Lipopolysaccharid (HETIER et al. 1988; SUZUMURA et al. 1991) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (FREI et al. 1987; SUZUMURA et al. 1990). Die genannten Faktoren werden zum Teil von Astrozyten produziert, was ein Zeichen für ihre enge funktionelle Verbindung mit der Mikroglia ist (FEDOROFF et al. 1993). Zudem können Neurotransmitter als Signalsubstanzen ebenfalls die Mikroglia aktivieren. Während die klassischen Neurotransmitter wie  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) oder Glutamat keinen offensichtlichen Effekt haben, können Azetylcholin, Purine und Adenosintriphosphat (ATP) involviert sein, wie In-vitro-Studien mit elektrophysiologischen Messungen zeigten (GERHRMANN u. KREUTZBERG 1995).

ATP kann die Mikroglia-Proliferation und nachfolgende Interleukin-1- (IL-1) Freisetzung induzieren (FERRARI et al. 1996), die K<sup>+</sup>-Kanal-Expression verändern und so die

Empfänglichkeit für neuronale Depolarisation vergrößern (KETTENMANN et al. 1993; NORENBORG et al. 1994). Aktivierte Mikroglia kann ihrerseits ATP entlassen, was das Vorhandensein einer purinogenen autokrinen/parakrinen Schleife der Mikrogliaaktivierung nahe legt (FERRARI et al. 1997). Mikrogliazellen exprimieren einen bestimmten Purinrezeptor, der im aktivierten Zustand den apoptotischen Zelltod der Mikroglia triggern kann (FERRARI et al. 1997).

Die Aktivierung läuft ungeachtet ihrer Ursache gemäß einem stereotypen mehrstufigen Reaktionsmuster ab (STOLL u. JANDER 1999). Zunächst äußert sie sich in einer Proliferation (GRAEBER et al. 1988b), auch wenn der Insult einige hundert Mikrometer entfernt ist (MOORE u. THANOS 1996). Die Proliferation der Mikroglia steht im Gegensatz zur Aktivierung der Astrozyten, die als Folge ihrer Aktivierung eine Hypertrophie zeigen (GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995). Anschließend folgt die Mikroglia der Rekrutierung durch Migration an den Ort der pathologischen Veränderung, wo sie morphologische, immunphänotypische und funktionelle Veränderungen durchläuft, ohne dabei phagozytierend zu werden (GEHRMANN et al. 1992; GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995).

Als Ausdruck der *morphologischen Transformation* retrahiert aktivierte Mikroglia ihre Fortsätze und rundet ihren Zellkörper ab (STOLL u. JANDER 1999).

*Immunphänotypische Veränderungen* beinhalten eine verstärkte oder De-novo-Expression von Oberflächenantigenen (GRAEBER et al. 1988a), die immunmodulatorisch wirksam sein können, wie die Aufregulation der Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I und II (MHC I und II) und Komplementrezeptoren, z. B. Komplementrezeptor 3 (CR3 = CD11b/CD18) (STREIT et al. 1988). Die verstärkte Expression von MHC I und II (THOMAS 1992; DAVIS et al. 1994; GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995) ermöglicht den Mikrogliazellen internalisiertes Antigen zu prozessieren, zu präsentieren und mit immunkompetenten Zellen wie den T-Zellen zu interagieren (HICKEY u. KIMURA 1988 zusammengefasst von KREUTZBERG 1996). Bei einigen Spezies wird auch CD4 exprimiert, (PERRY u. GORDON 1988), das ein akzessorisches Molekül der T-Helfer-Lymphozyten ist (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Neben diesen CD4-positiven Mikrogliazellen wurde auch eine Subpopulation nachgewiesen, die CD8 $\alpha$ / $\beta$ -Heterodimer positiv ist, was bisher nur für zytotoxische/Suppressor-T-Zellen beschrieben wurde (LAWETZKY et al. 1990). Ihre

Funktion ist bis dato unbekannt (STOLL u. JANDER 1999). Mikroglia kann auch wichtige costimulatorische Moleküle exprimieren, wie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) (WILLIAMS et al. 1994a und b), und in vitro T-Zell-Proliferation induzieren (FREI et al. 1987). Sämtliche vorhandene Moleküle sind auch bei aktivierten Makrophagen nachweisbar (DIJKSTRA et al. 1985).

Diese immunphänotypischen Veränderungen im Rahmen der Aktivierung der Mikrogliazellen spiegeln ihr Bild als eine Klasse von mononukleären Phagozyten des ZNS wider und legen nahe, dass sie die grundsätzlichen Immuneffektor-Elemente des Gehirns darstellen (GIULIAN 1987). Resultate aus In-vitro- und In-vivo-Versuchen münden in einem Konzept, das Mikroglia heutzutage als lokales Immunsystem des Gehirns ansieht (GRAEBER u. STREIT 1990).

Die *funktionellen Veränderungen* beinhalten die Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren (s. Tab. 1). In zahlreichen Studien wurde eine Bandbreite sekretorischer Produkte der Mikroglia entdeckt, die zur Superfamilie der Zytokine und Wachstumsfaktoren gehören (GIULIAN et al. 1994; FREI et al. 1987; STREIT et al. 1988; BANATI et al. 1993a; FLARIS et al. 1993). Dies sind unter anderem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-3, IL-6, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), nerve growth factor (NGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), Prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (REZAIIE u. MALE 1999). Durch die Produktion dieser Mediatoren übernimmt die Mikroglia wichtige Effektorfunktionen im Rahmen von Entzündungsreaktionen und offenbart ihre immunmodulatorische Kapazität (FREI et al. 1987).

Chronische oder wiederholte pathogene Stimuli, die auf die Neuronen wirken, sowie die darauf folgenden Reaktionen der aktivierten Mikroglia und anderer Gliazellen können zu massivem Verlust von synaptischen Verbindungen führen (BANATI u. BEYREUTHER 1995). Ein weiteres Charakteristikum der Funktion aktivierter Mikroglia ist die Unterbrechung der neuronalen Erregungsleitung, die als „synaptic stripping“ bezeichnet wird (BLINZINGER u. KREUTZBERG 1968). Dieses Entfernen der Boutons von Soma und proximalen Dendriten entfaltet sich bereits bei minimaler Verletzung der Neuronen und stellt einen wichtigen Prozess in der synaptischen Reorganisation nach schädigenden Insulten dar.

Die Mikroglia kann zudem neuroprotektive Faktoren produzieren, wie bFGF und NGF (zusammengefasst durch REZAIE u. MALE 1999). Beide Substanzen sind potente neurotrophe Faktoren (CHENG u. MATTSON 1991). Aktivierte Mikroglia können neben Plasminogen und IL-3 auch IL-1 $\beta$  produzieren (GIULIAN et al. 1994), ein Zytokin, das unter anderem das Überleben von Neuronen in Kultur unterstützt und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch Astrozyten verstärkt. Mikroglia ist als physiologische und pathologische Effektorpopulation für neuronales Wachstum, Funktion und Regeneration zu betrachten.

Obwohl die Resultate verschiedenster experimenteller Studien die Hypothese erhärten, dass aktivierte Mikroglia eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase, der Antwort auf pathologische Veränderungen und der Unterstützung der funktionellen Rekonstitution im ZNS spielen, so kann sie dennoch an der Pathogenese unterschiedlicher Erkrankungen entscheidend beteiligt sein (GRIOT et al. 1989; BRUCE-KELLER 1999; GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999).

Ähnlich wie Makrophagen können aktivierte Mikrogliazellen eine Vielzahl potentiell schädlicher Faktoren synthetisieren (NATHAN 1987). Das sind unter anderem reaktive Sauerstoffintermediate (ROS) und Stickstoffverbindungen, proteolytische Enzyme (z. B. Cathepsin B und L, Lysozym, Säurehydrolasen), Arachidonsäuremetaboliten, Exzitotoxine (z. B. Quinolinsäure) (ESPEY et al. 1997), Komplement-Proteine und proinflammatorische, zytotoxische Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ , die auch negative Effekte zur Folge haben können) (FREI et al. 1987; GIULIAN et al. 1990; BANATI et al. 1993b; GIULIAN 1995; KREUTZBERG 1996; CHABOT et al. 1997; WESSELINGH et al. 1997)

Biologische Komponente	Literatur
<b>Potentiell zytotoxische Faktoren</b>	
Stickstoffmonoxid (NO)	DING et al. 1997; DING u. MERRILL 1997
Quinolinsäure	ESPEY et al. 1997
<b>Zytokine und Wachstumsfaktoren</b>	
platelet activating factor (PAF)	JARANOWSKA et al. 1995
basic fibroblast growth factor (bFGF)	PRESTA et al. 1995
Tumornekrosefaktor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	CHAO et al. 1995; LEE et al. 1993
Interleukin-1 (IL-1/IL-1 $\alpha$ )	LIU et al. 1998; LEE et al. 1994
Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra)	LIU et al. 1998
Interleukin-6 (IL-6)	CHAO et al. 1994; LEE et al. 1994
Interleukin-8 (IL-8)	EHRlich et al. 1998
Interleukin-5 (IL-15)	LEE et al. 1993
transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	DA CUNHA et al. 1997
granulocyte-monocyte colony stimulating factor (GM-CSF)	LEE et al. 1994
<b>Enzyme</b>	
inducible nitric oxide synthase (iNOS)	DING et al. 1997; DING u. MERRILL 1997
unspezifische Esterase	WILLIAMS et al. 1992
saure Phosphatase	ULVESTAD et al. 1994b
Urokinase Plasminogen-Aktivator Rezeptor	WASHINGTON et al. 1996
<b>Rezeptoren</b>	
bFGF Rezeptoren (1, 2, 3, 4)	PRESTA et al. 1995
C5a-Rezeptor (CD88)	GASQUE et al. 1997
$\kappa$ -Opioid-Rezeptor	CHAO et al. 1996
$\mu$ -Opioid-Rezeptor	CHAO et al. 1997
CD14-Rezeptor	PETERSON et al. 1995
<b>Verschiedenes</b>	
costimulierende Moleküle für T-Zellen	SATOH et al. 1995
B7-1 (CD80), B7-2 (CD86)	DANGOND et al. 1997
B7 (costimulierende Moleküle)	DE SIMONE et al. 1995
B7/BB-1	WILLIAMS et al. 1994a
ICAM-1, LFA-1, LFA-3	DE SIMONE et al. 1995
Komplement C1 Inhibitor	WALKER et al. 1995

**Tab. 1: Funktionelle Biochemie kultivierter humaner Mikroglia**  
(zusammengefasst nach REZAIE u. MALE 1999)  
Biologische Komponente = biologische Komponente von Mikrogliazellen in vitro produziert.

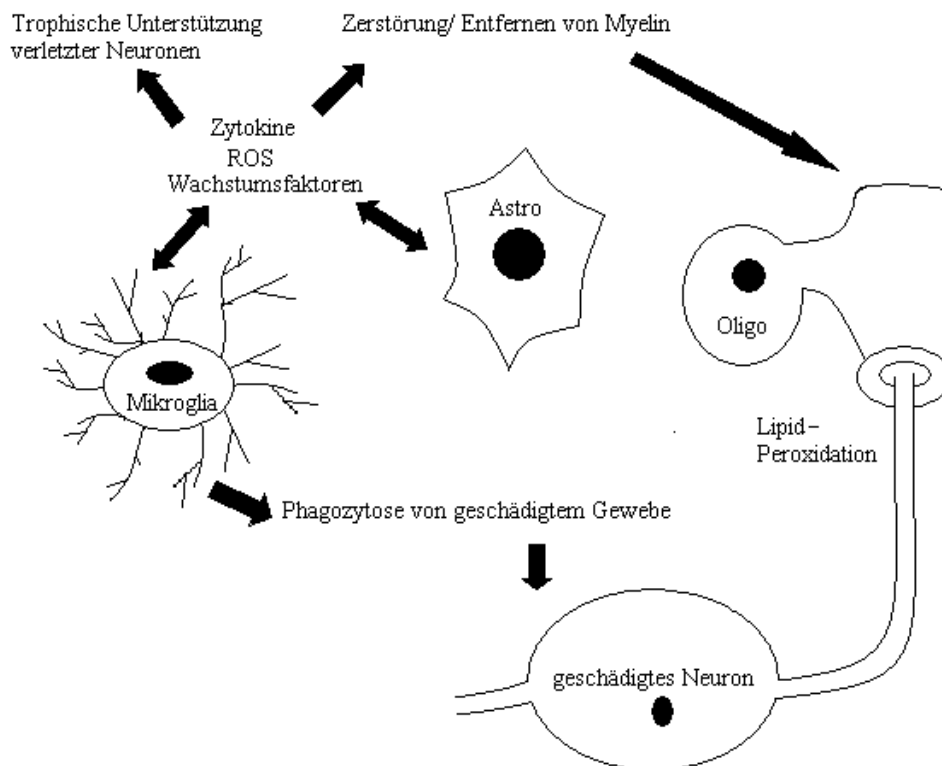
Mikrogliavermittelte Zytotoxizität ist entscheidend involviert in Gewebsschäden und Funktionsverlust in klinischen Fällen von MS (Übersicht bei SMITH 1999). Dabei kann die Sekretion von TNF- $\alpha$ , die durch aktivierte T-Zellen induziert wird (CHABOT et al. 1997), einen wesentlichen Beitrag leisten. In vitro wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  einen zytotoxischen Effekt auf Myelin und Oligodendrozyten, die myelinformierenden Zellen, ausübt (SELMAJ u. RAINE 1988).

Die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sind kurzlebige zytotoxische Faktoren, die die synaptische Übertragung exzitatorisch verstärken und eine Schädigung gesunder Neuronen zur Folge haben können (GIULIAN et al. 1995). Getriggert durch die hohen Werte an reaktiven Sauerstoffverbindungen werden zusätzlich in vitro große Mengen an Glutamat und Aspartat generiert (PIANI et al. 1991). Die Freisetzung dieser exzitatorischen Aminosäuren tragen ihrerseits zu NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat) vermittelter Neurotoxizität bei (BANATI et al. 1993b). Oligodendrozyten sind selektiv verletzbar durch mikrogliale Sekretionsprodukte (Zytokine, ROS, exzitatorische Aminosäuren) (GRIOT et al. 1990). Intakte Oligodendrozyten und die von ihnen formierten Myelinscheiden sind wichtige Regulatoren für die Impulsweiterleitung (BRUCE-KELLER 1999). Aktivierte Mikroglia zeigt in Zellkulturversuchen eine Sekretion neurotoxischer Substanzen ins Medium, die das Überleben von Neuronen vermindern (PIANI et al. 1991; GIULIAN et al. 1993a). Mikrogliazellen können somit eine potente Quelle sowohl tropher als auch toxischer Signale für Neuronen sein.

### 2.2.5.3 Phagozytierende Mikroglia

Im dritten Funktionsstadium entfaltet die Mikroglia ihre Phagozytoseaktivität (STREIT et al. 1988; KREUTZBERG 1996). Der Transformationsschritt wird durch das Vorhandensein von Astrozyten und Zytokinen modifiziert. Eine Co-Kultivierung mit Astrozyten, eine Inkubation mit TGF- $\beta$  oder IL-4 (Interleukin 4) inhibiert die Phagozytose (VON ZAHN et al. 1997), durch eine Vorinkubation mit GM-CSF und TNF- $\alpha$  wird dahingegen eine Verstärkung der Reaktion erreicht (DEWITT et al. 1988). In vitro war die phagozytäre Aktivität gebunden an die Expression von Komplementrezeptoren (ULVESTAD et al. 1994b) und Fc-Rezeptoren (Fc = fragment cristalline, kristallisierbarer Antikörperteil) für IgG (Immunglobulin G) (ULVESTAD et al. 1994c). Aufgrund des Vorhandenseins der Mikroglia in unmittelbarer

Nähe degenerierender Neuronen (AKIYAMA et al. 1994) wird schlussgefolgert, dass die Mikrogliazellen die Neuronen isolieren, durch Phagozytose entfernen und somit die Schadensausbreitung limitieren, bevor durch Zellyse toxische Produkte aus dem Zytosol freigesetzt werden und die Nachbarzellen angreifen (vgl. Abb. 3). Diese Eliminierung von Zelldebris erfolgt mit Hilfe hydrolytischer Enzyme, die in phagozytär wirksamer Mikroglia nachgewiesen wurden (LING u. WONG 1993; WILLIAMS et al. 1994c).



**Abb. 3:** Funktionen der Mikroglia bei pathophysiologischen Vorgängen im ZNS  
Astro = Astrozyt; Oligo = Oligodendrozyt

Es schließt sich die Eliminierung der Mikrogliazellen selbst an, die wahrscheinlich durch einen programmierten Mechanismus wie z. B. durch Apoptose bewirkt wird (GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995). Die Eliminierung ist ein sehr wichtiger Kontrollmechanismus, um lokale Entzündungsreaktionen zu limitieren und exzessive „bystander lysis“ nicht verletzter Gewebe zu verhindern (BRUCE-KELLER 1999). Die Erforschung der Mechanismen und Faktoren, die bei diesem Prozess eine Rolle spielen, hat erst in jüngerer Zeit begonnen.

Der Großteil der gewonnenen Erkenntnisse über die Reaktionen von aktivierten Mikrogliazellen stammt aus In-vitro-Untersuchungen, während Untersuchungen an ex vivo isolierten

Mikrogliazellen bisher selten durchgeführt wurden (HEIN et al. 1995). Ob die beobachteten Reaktionen direkt auf die Gegebenheiten in vivo übertragbar sind und in welchem Ausmaß ist nicht bekannt (STREIT 1995). Eine bessere Annäherung an die Zustände, die in vivo vorherrschen, stellt die Untersuchung der Mikroglia ex vivo dar. Die immunphänotypische und funktionelle Untersuchung der caninen Mikroglia ex vivo bei Hundestaupe war Gegenstand der vorliegenden Studie.

### **2.2.6 Die Rolle der Mikroglia bei ausgewählten Krankheitssyndromen**

Bei nahezu jeder Art von Störung der Homöostase im ZNS, einschließlich Infektion, Trauma, Ischämie, Degeneration und Demyelinisierung, sind aktivierte Mikrogliazellen anzutreffen (GIULIAN et al. 1995). Sie sind als immunologische Effektorzellen eine wichtige Quelle der Zytokinproduktion im ZNS, die bei einer Vielzahl neurologischer Krankheiten erhöht ist (MERRILL 1992). In der Gesamtheit der beschriebenen Reaktionen aktivierter einschließlich phagozytischer Mikroglia ist nicht verwunderlich, dass sie eng mit Erkrankungen wie durch AIDS induzierte Demenz (AIDS dementia complex = ADC), Multiple Sklerose, Alzheimer Krankheit (Alzheimer disease = AD), Schlaganfall und Epilepsie assoziiert wird (GONZÁLEZ-SCARANO u. BALUCH 1999). Welche genaue Rolle aktivierte Mikroglia im Verlauf der pathogenetischen Abläufe besitzt ist Gegenstand intensiver Forschung.

Aufgrund der schnellen Reaktion der Mikroglia als Antwort auf Störungen der Homöostase, kann eine Aktivierung bereits gefunden werden, bevor pathomorphologische Veränderungen offensichtlich sind. Sie ist daher ein sensibler Indikator für eine stattgefunden oder sich erst noch manifestierende Läsion im ZNS.

Mit den aktuellen Forschungsarbeiten werden erste Therapiestrategien diskutiert, die aus einer Suppression der Aktivierung der Mikroglia und einer Inhibition der Synthese und Sekretion von Neurotoxinen bestehen (HAYS 1998). Es besteht die Hoffnung, dass mit diesen neuen Strategien verschiedenste pathologische Vorgänge im ZNS gemindert werden können (GIULIAN 1995).

### 2.2.6.1 Mikroglia und Epilepsie

Obwohl Traumata, Meningitiden und Enzephalitiden mit dem Beginn von epileptischen Anfällen in Verbindung gebracht werden, ist der damit verbundene Mechanismus der Induzierung elektrophysiologischer Veränderungen noch unbekannt. Da aktivierte Mikroglia und einwandernde Makrophagen eine Vielzahl an Substanzen, wie Arachidonsäuremetaboliten, Zytokine, Aminosäuren und Zytotoxine, freilassen (s. 2.2.5.2), wird vermutet, dass sie die elektrophysiologische Aktivität im ZNS beeinflussen können. Versuche mit Gewebeproben aus dem Hippocampus, die nach Exposition mikroglialer Sekretionsprodukte eine Serie epileptiformer Anfälle zeigten, erhärten diese These (GIULIAN et al. 1994).

### 2.2.6.2 Mikroglia und Alzheimer

Die Alzheimer Krankheit ist durch neurodegenerative Dementia, assoziiert mit Neuronenverlust (GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999) und  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen in senilen Plaques kortikaler Regionen des Gehirns und Blutgefäßwandungen (TERRY 1985), gekennzeichnet.

MCGEER et al. (1988) beschreiben das zahlreiche Vorhandensein aktivierter Mikroglia in kranzförmiger Verteilung um die senilen Plaques und um dystrophische Neuriten (WISNIEWSKI et al. 1989), was zu der Bezeichnung einer mikroglialen „Totenlade“ führte (PERUSINI 1909; zusammengefasst von BANATI u. BEYREUTHER 1995). Die aktivierte Mikroglia ist bei dieser Krankheit unter anderem durch aufregulierte Expression von MHC II-Molekülen in Amyloid-Plaques (PERLMUTTER et al. 1992), der Makrophagen-Antigene CD11a, b, c, LCA (Leucocyte common antigen) und des Fc $\gamma$ -Rezeptors (AKIYAMA et al. 1994) charakterisiert. Die Ligandenbindung an den Fc $\gamma$ -Rezeptor kann wiederum die Mikroglia aktivieren, wie durch erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität (Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat-Oxidase) gezeigt werden konnte (ULVESTAD et al. 1994c).

Mikrogliazellen sind begleitet von reaktiven Astrogliazellen. Beide Zellpopulationen sind aktiv in die Bildung von Amyloid-Plaques involviert (BANATI u. BEYREUTHER 1995). APP (amyloid precursor protein) kann von beiden generiert werden (WISNIEWSKI et al. 1989). Cathepsin B ist eines von vielen Enzymen, das APP mit hoher Effizienz spalten kann. Es wird in aktivierter Mikroglia und in senilen Plaques gefunden (BANATI et al. 1993a und

c). Freie Radikale werden ebenfalls gefunden, die als wichtige amyloidogene Co-Faktoren die Aggregation von Amyloid unterstützen (DYRKS et al. 1992). Sie zeigen, dass Mikroglia wichtig für die Prozessierung von Amyloid und somit für die Pathogenese bei Alzheimer ist.

Alternativ weist das Vorhandensein der Mikroglia um die und in den senilen Plaques auf ihre phagozytäre Aktivität hin, wobei das amyloide Material die Kapazität der Mikrogliazellen jedoch übersteigt. Das amyloide Material bleibt als Faktor bestehen, der das ZNS in einem chronischen Entzündungsstatus hält und ohne hemmenden Rückkopplungsmechanismus die negativen Auswirkungen der Mikroglia potenziert (GIULIAN 1995).

### 2.2.6.3 Mikroglia und AIDS

AIDS führt bei ca. 70 % der Patienten zu Demenz, kortikaler Atrophie und dem Verlust kortikaler Neuronen (NAVIA et al. 1986), was als AIDS dementia complex (ADC) bezeichnet wird.

Bei HIV-Enzephalitis (human immunodeficiency virus) sind die Makrophagen und somit auch die Mikroglia die primären Zielzellen für das Virus (BUDKA 1991). Trotz geringer Oberflächenexpression von CD4 auf Mikrogliazellen (WILLIAMS et al. 1992), wird sie als Grund für die Virusinfektion der Mikroglia angesehen (WATKINS et al. 1990). Zudem kann die Infektion dieser Zellen durch die Gabe monoklonaler Antikörper, die an CD4 binden, verhindert werden (JORDAN et al. 1991). Auch in vitro sind Makrophagen und Mikrogliazellen einfach zu infizieren (WILEY et al. 1986), was den Tropismus des gp120-envelope-Gens des HI-Virus widerspiegelt. Eine Infektion von Neuronen wird kaum beobachtet (WILEY et al. 1986). Die Virusreplikation allein korreliert jedoch nicht mit dem Auftreten neurologischer Störungen. Ein zweiter verstärkender Faktor muss hinzukommen, von dem angenommen wird, dass er ebenfalls von Mikrogliazellen stammt (GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999).

Es existieren verschiedene Hypothesen darüber, wie der Mechanismus der Neurotoxizität bei ADC zu definieren ist. So wird unter anderem angenommen, dass das virale coat-Glykoprotein gp120 für Neuronen toxisch ist (BRENNEMANN et al. 1988). Allgemein wird jedoch die These favorisiert, dass die Entzündungszellen mit den von ihnen entlassenen neuro-

toxischen Faktoren die Pathogenese entscheidend beeinflussen (GIULIAN et al. 1990; GIULIAN 1993b; PULLIAM et al. 1991; ACHIM u. WILEY 1996).

Bekannte Sekretionsprodukte im Rahmen der Aktivierung der Mikrogliazellen sind unter anderem TNF- $\alpha$ , Zytokine, Arachidonsäurederivate und reaktive Sauerstoffmetaboliten (s. 2.2.5.2). Patienten mit ADC zeigten höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen als HIV-positive ohne ADC, wobei Mikroglia und andere Makrophagen als vorrangige zelluläre Quellen von TNF- $\alpha$  gelten (WESSELINGH et al. 1997). Das Sekretionsprodukt Quinolinsäure kann – wie viele weitere von Mikroglia synthetisierte Mediatoren (s. 2.2.5.2) – als Neurotoxin wirken (SCHWARCZ et al. 1983). Dies legt eine wichtige Rolle der Mikroglia bei der ZNS-Schädigung nahe (ACHIM u. WILEY 1996). In Co-Kultivierungsversuchen von Neuronen mit HIV-infizierten Zellen wurde zudem ein dramatischer Verlust an Neuronen verzeichnet (GIULIAN et al. 1990).

#### 2.2.6.4 Mikroglia und Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose ist eine entzündliche Erkrankung des ZNS, die in aktiven oder jüngeren Plaques Bereiche der Myelinzerstörung, der Infiltration mit entzündlichen Zellen und der Ansammlung von lipidenthaltenden Makrophagen aufweist. Pathomorphologisch fällt vor allem eine Demyelinisierung auf. In chronischen Plaques bleiben die Makrophagen ähnlichen Zellen lipidbeladen. Ihr Ursprung ist nicht absolut geklärt. Einige sind phagozytäre Mikrogliazellen und andere eventuell hämatogenen Ursprungs. Neben demyelinisierten Axonen und Mikrogliazellen enthalten die Läsionen auch deutliche Infiltrationen mit anderen Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen (GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999).

Viele der gängigen Konzepte demyelinisierender Erkrankungen wurden von Arbeiten mit experimenteller allergischer Enzephalomyelitis (EAE) an Mäusen gewonnen. Sie wurde als Modell benutzt, da pathomorphologische Ähnlichkeiten mit MS bestehen (zusammengefasst von STOLL u. JANDER 1999). Bei der EAE fungiert die murine Mikroglia als Antigen präsentierende Zelle (APC), gefolgt von einer Rekrutierung von T-Zellen, die wiederum eine verstärkte Aktivierung der Mikrogliazellen bewirkt. Diese entlassen Zytokine (BRENNER et al. 1997), die z. T. neurotoxisch wirken (s. 2.2.5.2) und Myelinscheiden sowie die sie formierenden Oligodendrozyten zerstören, woraus eine Demyelinisierung resultiert. Die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bestimmt den Verlauf der

Krankheit (STOLL u. JANDER 1999). Die Mikroglia ist also als kritische Effektorzelle bei der Degeneration der weißen Substanz anzusehen (GONZÁLEZ-SCARANO u. BALTUCH 1999).

Hundestaube ist ein anerkanntes Tiermodell für demyelinisierende ZNS-Erkrankungen wie z. B. MS (APPEL et al. 1981). Wie bei der EAE bestehen große Übereinstimmungen in Bezug auf das pathohistologische Bild. Daher wird angenommen, dass auch die Pathogenese viele Gemeinsamkeiten aufweist. Als natürliche Erkrankung ist Hundestaube gegenüber EAE als Modell für MS möglicherweise zu bevorzugen.

## 2.3 Differenzierungsantigene

Auf Zellpopulationen lassen sich spezifische Oberflächenstrukturen nachweisen, die zelluläre Strukturen von Boten- und Fremdstoffen erkennen und somit eine wichtige Grundlage für die Funktion des Immunsystems darstellen. Da die Kombination spezifischer Oberflächenstrukturen Zellpopulationen unterscheidbar macht, wurden diese Strukturen ursprünglich als Differenzierungsantigene bezeichnet. Auf der Grundlage der willkürlich nummerierten Gruppen monoklonaler Antikörper (mAK), die dieselben Zelloberflächenantigene erkennen und so Zellpopulationen definieren, wurde eine international standardisierte Nomenklatur der Oberflächenstrukturen, das „Cluster of differentiation-System“ (CD), eingeführt (ROITT et al. 1991; JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Bis vor wenigen Jahren standen für die Untersuchung des caninen Immunsystems nur humane oder murine mAK zur Verfügung, die Kreuzreaktivität aufwiesen (JACOBSEN et al. 1993). In jüngerer Zeit wurden jedoch vermehrt canine mAK gegen Leukozyten-Oberflächenantigene des Hundes entwickelt. Die Spezifität und Charakterisierung vieler dieser Antikörper wurde im ersten internationalen Workshop über canine Leukozyten-Antigene 1993 in Cambridge definiert (zusammengefasst von COBBOLD u. METCALFE 1994). Die in dieser Studie verwendeten Differenzierungscluster sollen im Folgenden kurz erläutert werden (siehe auch 3.1.6).

### 2.3.1 CD11 und CD18

CD11 und CD18 gehören zu den Integrinen. Diese umfassen eine große Familie von Zelloberflächenproteinen, die die Adhäsion zwischen Zellen sowie zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix bei der Immunantwort bzw. einer Entzündungsreaktion ermöglichen. Als Heterodimere bestehen sie bei den Leukozyten zumeist aus einer kleineren  $\beta_2$ -Kette, die nichtkovalent mit einer großen  $\alpha$ -Kette zusammengelagert ist. Während die  $\beta_2$ -Kette meist konstant ist, variieren die  $\alpha$ -Ketten und exprimieren bei Nagern und Menschen entweder für CD11a-, CD11b-, CD11c- oder CD11d-Epitope (CD11d = alpha d) (COBBOLD u. METCALFE 1994; DANILENKO et al. 1995). Sie enthalten Bindungsstellen für bivalente Kationen, die für die Signalgebung wichtig sein können. CD18 enthält nur eine  $\beta$ -Kette.

CD11b und CD11c werden vor allem auf Zellen der Granulozyten- und Makrophagen-Linie exprimiert, CD11b auch auf großen granulären Lymphozyten. CD11d wird von Makrophagen der roten Milzpulpa, des Lymphknoten- und des Knochenmarks sowie auf kleinen und großen granulären Lymphozyten exprimiert (DANILENKO et al. 1995). CD18 bindet an jede Zelle, die ein  $\beta_2$ -Integrin exprimieren kann (COBBOLD u. METCALFE 1994).

### 2.3.2 CD45

CD45 ist eine transmembrane Tyrosinphosphatase mit drei variablen Exons, die einen Teil der extrazellulären Domäne kodieren. CD45 wird als Oberflächenmolekül von nahezu allen weißen Blutzellen exprimiert. Dabei wechselt die Isoform nach Aktivierung infolge alternativen Spleißens der drei variablen Exons nahe des 5'-Endes des CD45-Gens (JOHNSON et al. 1996). Bei T-Gedächtniszellen werden die variablen Exons z. B. entfernt, so dass die Zelle die CD45R0-Isoform exprimiert (R steht für das Erkennen restringierter Expressionen monomorpher Epitope, die Ziffer bzw. der Buchstabe hinter dem R liefern Informationen über die Exon-Expressionen Null, Exon A, B oder C; LAI et al. 1996).

CD45 verbindet sich mit dem T-Zell-Rezeptor und dem Co-Rezeptor, z. B. CD4. Als Konsequenz der Isoform-Veränderung des CD45 wird die Sensibilität der T-Zelle für die Stimulierung durch Antigene heraufgesetzt (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Die genauen Zusammenhänge der nötigen Liganden und Mechanismen, durch die die verschiedenen Isoformen ihre Wirkung entfalten, sind jedoch nicht endgültig geklärt (COBBOLD u. METCALFE 1994; JOHNSON et al. 1996).

Monoklonale Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte ungespleißte CD45 können benutzt werden, um Zellen hämatopoetischen Ursprungs zu identifizieren (COBBOLD u. METCALFE 1994). In der hier vorliegenden Studie wurde das panreaktive CD45 gemessen.

### 2.3.3 CD14

CD14 (53-55 kDa) ist ein Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und lipopolysaccharidbindendem Protein (LBP). Er befindet sich auf Monozyten, Makrophagen und Granulozyten (JANEWAY u. TRAVERS 1997; TIZARD 2000).

### 2.3.4 CD44

Das Glykoprotein CD44 (ca. 90 kDa) wird von verschiedenen Zellen exprimiert, wie T- und B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und Epithelzellen. CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, vermittelt die Adhäsion der Leukozyten an vaskuläres Endothel und ist an verschiedenen intra- und extrazellulären Vorgängen durch Interaktionen mit Proteinen des Zytoskeletts und der zellulären Oberfläche beteiligt. Während der frühen Aktivierungsphase der T-Zellen kann eine Aufregulation von CD44 beobachtet werden (COBBOLD u. METCALFE 1994; LAI et al. 1996; JANEWAY u. TRAVERS 1997; TIZARD 2000). Eine erhöhte CD44-Expression wurde von ALLDINGER et al. (2000) in akuten und insbesondere subakuten staupeassoziierten ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung nachgewiesen. Die Expression von CD44 wird auf Astrozyten beschrieben. Es wird vermutet, dass CD44 durch Induktion von Chemokinen und Zytokinen am Prozess der frühen Demyelinisierung beteiligt ist.

### 2.3.5 CD1c

MHC I und II sind die klassischen Moleküle für die Antigenpräsentation. Neben diesen gibt es die Familie der CD1-Moleküle, die die Fähigkeit zu besitzen scheinen, den T-Zellen nicht-peptidische Lipid- und Glykolipid-Antigene zu präsentieren (BUSSHOFF et al. 2001; JANEWAY u. TRAVERS 1997). Im Gehirn können die Neuronen und Gliazellen mit zwei Arten von nicht-peptidischen Antigenen konfrontiert werden. Diese stammen entweder aus exogener Quelle, wie z. B. lipide Bakterienkomponenten, oder aus endogener Quelle, wie z. B. Myelin bei Erkrankungen, die mit Demyelinisierung einhergehen (BUSSHOFF et al. 2001).

Die Familie der CD1-Proteine ist strukturell den Proteinen des MHC I ähnlich. Sequenzvergleiche zeigen an, dass CD1-Proteine sich zu zwei Subfamilien entwickelt haben: CD1a-, CD1b- und CD1c-Proteine sowie CD1d-Proteine (BLUMBERG et al. 1995). In dieser Studie wurde CD1c gemessen.

CD1c wird von Thymozyten, dendritischen Zellen, aktivierten Monozyten und B-Zellen exprimiert. Diese Verteilung weist stark auf eine Rolle bei der Antigen-Präsentation hin (BLUMBERG et al. 1995; LAI et al. 1996; TIZARD 2000). Die präzisen biologisch vermittelten Funktionen sind jedoch zur Zeit noch Gegenstand intensiver Forschung.

BUSSHOFF et al. konnten bei Mäusen die Expression von CD1c auf Mikrogliazellen zeigen (2001).

### 2.3.6 1D11

1D11 ist ein monoklonaler Antikörper, der größtenteils interstitielle dendritische Zellen anfärbt, jedoch ist diese Bindung an Oberflächenepitope nicht sehr spezifisch. Er zeigt eine Expression auf histiozytären Sarkomen auf, selbst wenn diese aus dem Gehirn stammen (MOORE<sup>1</sup>).

### 2.3.7 ICAM-1

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) ist ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, das zur Immunglobulinsuperfamilie gehört. Es bindet sehr effektiv an das LFA-1-Integrin (lymphocyte function-associated antigen-1 = CD11a/CD18) und Mac-1-Integrin (Mac-1 = membrane attack complex-1 = CD11b/CD18) der T-Zelle. Diese Bindung befähigt die Zelle dazu, durch Blutgefäßwände zu wandern. Sie ist zudem wichtig, um MHC-gebundene Peptide auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen prüfen zu können. Bei Expression eines spezifischen Antigens für den T-Zell-Rezeptor wird die Affinität der adhäsiven Interaktionen durch Signalgebung verstärkt und die T-Zelle stimuliert, ihre Effektormoleküle freizusetzen (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

ICAM-1 wird auf Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert (JANEWAY u. TRAVERS 1997; LAI et al. 1996).

### 2.3.8 B7-1 und B7-2

Um naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu T-Effektorzellen zu stimulieren, bedarf es nicht nur der Bindung ihrer antigenspezifischen Rezeptoren an einen MHC-Komplex und der Co-Rezeptoren CD4 oder CD8. Die klonale Expansion der antigenspezifischen naiven T-Zellen benötigt ein zweites costimulierendes Signal, das von derselben antigenpräsentierenden Zelle stammen muss, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen

---

<sup>1</sup> Persönliche Mitteilung, November 2000.

erkennt. Diese Erkenntnis unterstützt das sogenannte „two-signal“-Modell der Immunantwort (JUNE et al. 1994; JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Die am besten charakterisierten costimulierenden Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen sind die strukturverwandten Glykoproteine B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86). Diese B7-Moleküle sind Homodimere, die zur Immunglobulinsuperfamilie gehören. Die extrazellulären Ketten der B7-Moleküle sind einander sehr ähnlich. Ihre zytosolischen Domänen zeigen jedoch große Unterschiede. Beispielsweise beinhaltet die zytosolische Domäne bei B7-2 drei potentielle Orte zur Phosphorylierung durch Protein-Kinase C, die bei B7-1 nicht identifiziert werden konnten (JUNE et al. 1994).

Die funktionellen Unterschiede zwischen B7-1 und B7-2 sind noch nicht ausreichend definiert (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Es wurde jedoch an humanen B-Zellen beobachtet, dass die Expression von B7-2 nach Aktivierung wesentlich schneller ihr Maximum erreicht (innerhalb 24 Stunden), während B7-1 erst einige Tage später verstärkt exprimiert wird (JUNE et al. 1994). Die zytoplasmatische Domäne von B7-2 hat möglicherweise eine Funktion in der Signalverstärkung, die für B7-1 nicht vermutet wird (JUNE et al. 1994).

Der Rezeptor für die B7-Moleküle ist bei naiven T-Zellen lediglich CD28 und bei aktivierten zusätzlich CTLA-4 (cytolytic T-lymphocyte associated molecule-4), der in seiner Sequenz dem CD28 ähnelt, dessen Bindungsaffinität für die B7-Moleküle jedoch 20-mal höher ist. CTLA-4 spielt eine Rolle bei der Begrenzung der proliferativen Antwort aktivierter T-Zellen (JUNE et al. 1994; JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Eine Expression von B7-1 und B7-2 findet sich ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen, die das T-Zell-Wachstum anregen können, wie z. B. B-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

### **2.3.9 MHC I und MHC II**

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC) wird von einer Gruppe von Genen gebildet, die für die MHC-Moleküle I und II codieren. Der MHC-Komplex vermittelt verschiedene Reaktionen, wie die Antigenverarbeitung (= Antigenprozessierung) und –präsentation an der Zelloberfläche, die Abstoßung von übertragenem

Gewebe, die Entwicklung der T-Zellen und die Anfälligkeit für immunologische Erkrankungen (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

**MHC-Klasse-I-Moleküle** sind Heterodimere aus einer schweren oder  $\alpha$ -Kette, die die Zellmembran durchdringt, und einer kleineren, nichtkovalent gebundenen Kette, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Die  $\alpha$ -Kette faltet sich in drei Domänen:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  und  $\alpha_3$ . Die beiden erstgenannten legen sich zu einer Struktur zusammen, die einen Spalt erzeugt, an den die Peptidantigene binden (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

MHC I-Moleküle prozessieren Antigen aus dem Zytosol und präsentieren die Peptide den  $CD8^+$ -T-Zellen. Bei den Antigenen handelt es sich um zytosolische Krankheitserreger, d. h. vor allem Viren, aber auch einige Bakterienarten, die in diesem Zellkompartiment leben und sich vermehren. Die Aufgabe der  $CD8^+$ -T-Zellen besteht darin, infizierte Zellen zu töten, um Entstehungsorte neuer viraler Partikel und zytosolischer Bakterien zu beseitigen und so den Wirt von einer Infektion zu befreien (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

MHC I-Moleküle werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Am höchsten ist die Expression auf hämatopoetischen Zellen (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Eine Ausnahme bilden ausdifferenzierte Neuronen, auf denen MHC I-Moleküle nur bei bestimmten Erkrankungen exprimiert werden.

**MHC-Klasse-II-Moleküle** bestehen aus einem nichtkovalenten Komplex zweier Glykoproteinketten  $\alpha$  und  $\beta$ , die beide die Membran durchdringen. Jede der beiden Ketten weist zwei Domänen auf, wobei der peptidbindende Spalt durch die beiden jeweils äußeren Domänen ( $\alpha_1$  und  $\beta_1$ ) gebildet wird. MHC II-Moleküle zeigen sehr große Ähnlichkeit mit den MHC I-Molekülen, wobei der wesentliche Unterschied in einer weiteren Öffnung der Spaltenden besteht (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

MHC II-Moleküle prozessieren Antigen aus dem vesikulären System und präsentieren es den  $CD4^+$ -T-Zellen. Die Antigene sind vor allem Bakterien und die von ihnen sezernierten Toxine, Proteine oder ihre Abbauprodukte sowie einige Parasiten. Die  $CD4^+$ -T-Zellen sind einerseits darauf spezialisiert, Zellen, die intravesikuläre Bakterien oder Parasiten töten, z. B. Makrophagen, zu aktivieren. Andererseits induzieren sie aktivierte B-Zellen, Antikörper zu

sezernieren und extrazelluläre Bakterien oder Toxine zu eliminieren (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

MHC II-Moleküle werden vor allem von B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Thymusepithelzellen exprimiert. Die Expression kann zudem an mehreren Zellen (beispielsweise Endothelzellen) induziert werden (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Auch T-Zellen einiger Spezies (z. B. beim Hund) tragen MHC II-Moleküle (COBBOLD u. METCALFE 1994). Im Gehirn sind die meisten Zellen MHC II-negativ, die exprimierende Zelle für beide Glykoproteine im ZNS ist die Mikrogliazelle (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

### **2.3.10 CD3**

Der sogenannte CD3-Komplex wird von T-Lymphozyten exprimiert (JANEWAY u. TRAVERS 1997; TIZARD 2000). Er besteht aus fünf verschiedenen Proteinen, die als CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\xi$  und CD3 $\eta$  bezeichnet werden (LAI et al. 1996). Die ersten drei besitzen extrazelluläre Domänen, die eine schwache Aminosäurehomologie mit Immunglobulin-domänen aufweisen, sowie zytoplasmatische und Transmembrandomänen, wobei letztere durch einen sauren Aminosäurerest gekennzeichnet sind, die mit den basischen (positiv geladenen) Aminosäureresten des T-Zell-Rezeptors (TCR) eine Salzbrücke bilden können. Die  $\xi$ -Kette ist ein Dimer, das über Disulfidbrücken mit dem CD3-Komplex assoziiert ist. Nur ein sehr kleiner Teil der  $\xi$ -Kette ragt aus der Zelle heraus, während sich der größte Teil des Polypeptides im Zytoplasma befindet. Der CD3-Komplex ist wichtig für die Signalübertragung. Für diese Aufgaben besitzen die zytoplasmatischen Domänen insbesondere der CD3 $\xi$ - und CD3 $\epsilon$ -Kette Sequenzen, die nach Stimulierung des Rezeptors mit Tyrosinkinasen assoziieren und so das Signal in die Zelle übertragen (JANEWAY u. TRAVERS 1997). In dieser Studie wurden die extrazellulären Anteile des CD3-Komplexes gemessen.

### **2.3.11 CD4**

CD4 ist ein spezifischer Co-Rezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle und vor allem an der Antigenerkennung durch T-Helferzellen beteiligt. Die Anwesenheit von CD4 führt zu einem beachtlichen Anstieg der Empfindlichkeit einer T-Zelle für ein von MHC II präsentiertes Antigen (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Das Glykoprotein CD4 (59 kDa) ist auf T-Helferzellen ( $T_{H2}$ ), inflammatorischen T-Zellen ( $T_{H1}$ ), Thymozyten und beim Hund auch auf Granulozyten zu finden (COBBOLD u. METCALFE 1994; JANEWAY u. TRAVERS 1997; TIZARD 2000). Im Gegensatz zu Mensch und Ratte exprimieren Monozyten und Makrophagen des Hundes kein CD4 (MOORE et al. 1992; COBBOLD u. METCALFE 1994).

### 2.3.12 CD8

Das Glykoprotein CD8 (32 kDa) ist ein Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die durch eine Disulfidbrücke kovalent gebunden sind. Die beiden Ketten des Dimers besitzen vergleichbare Strukturen, wobei beide eine Immunglobulinähnliche Domäne enthalten, die durch eine Polypeptidkette mit der Zellmembran verknüpft ist. CD8 ist ein spezifischer Co-Rezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle und wird auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert. CD8 ist an einer Erkennung endogener Antigene (Viren und einige Bakterien) beteiligt und führt zu einer beachtlichen Steigerung der Empfindlichkeit der T-Zelle für ein von MHC I präsentierte Antigen (COBBOLD u. METCALFE 1994; JANEWAY u. TRAVERS 1997). Große granuläre Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK) können auch CD8 $\alpha$ -Homodimere exprimieren (COBBOLD u. METCALFE 1994), die ebenfalls an MHC I binden können (JANEWAY u. TRAVERS 1997). In dieser Studie wurde CD8 $\alpha$  gemessen.

### 2.3.13 CD21

CD21 (145 kDa) ist ein Rezeptor für die Komplementkomponenten C3b und C3d. Er ist auf B-Zellen, aber auch auf wenigen T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Die hauptsächliche Aufgabe des Glykoproteins ist die Beteiligung an der Regulation der B-Zell-Antwort (COBBOLD u. METCALFE 1994; TIZARD 2000).

Die für die vorliegende Studie bedeutenden Merkmale der CD-Antigene werden in der folgenden Übersicht zusammengefasst:

CD-Antigen	andere Bezeichnungen	Molekulargewicht (kDa)	Funktionen	Zellen, die das Antigen exprimieren
<b>CD18</b>	zus. mit CD11b: Mac-1 od. CR3	95	$\beta_2$ -Untereinheit der Integrine; bindet an CD11a, b u. c (u. d), Signaltransduktion	Leukozyten, jede Zelle, die ein $\beta_2$ -Integrin exprimiert
<b>CD11b</b>	zus. mit CD18: Mac-1 od. CR3	170	$\alpha^M$ -Untereinheit des Integrins CR3; bindet CD54, die Komplementkomponente C3b u. extrazelluläre Matrixmoleküle	myeloide Zellen und natürliche Killerzellen (NK)
<b>CD11c</b>	zus. mit CD18: CR4 od. p150,95	150	$\alpha^X$ -Untereinheit des Integrins CR4; bindet Fibrinogen	myeloide Zellen
<b>alpha d</b>	CD11d	155	$\alpha^d$ -Untereinheit eines Integrins	Makrophagen in roter Milzpulpa, Lymphknoten- u. Knochenmark, z. T. Lymphozyten
<b>CD45</b>	LCA (leukocyte common antigen)	180-240 (mehrere Isoformen)	Tyrosinphosphatase; erhöht die Signalvermittlung über den Antigenrezeptor von B- und T-Zellen	Leukozyten, Zellen hämatopoetischen Ursprungs
<b>CD1c</b>		43	MHC-Klasse-I ähnliches Molekül, assoziiert mit $\beta_2$ -Mikroglobulin; hat möglicherweise eine bes. Bedeutung als APC (Antigen-präsentierende Zelle)	corticale Thymozyten, Langerhans-Zellen, dendritische Zellen, B-Zellen, Darmepithel, glatte Muskulatur
<b>1D11</b>				interstitielle dendritische Zellen
<b>ICAM-1</b>	CD54	75-115	interzelluläres Adhäsionsmolekül; bindet das LFA-1-Integrin und Mac-1	Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen
<b>B7-1</b>	CD80	60	Co-Stimulator der T-Zell-Proliferation; Ligand für CD28 und CTLA-4	B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen
<b>B7-2</b>	CD86	80	Co-Stimulator (s. B7-1), Signalverstärkung (?)	Monozyten, aktivierte B-Zellen, dendritische Zellen
<b>CD4</b>	T4	59	Co-Rezeptor für MHC-Klasse-II-Moleküle	T-Helferzellen und inflammatorische T-Zellen, Thymozyten, Granulozyten

<b>CD8a</b>	T8	$\alpha$ : 32-34 $\beta$ : 32-34	Co-Rezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle	zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen, einige Gruppen von Thymozyten, granuläre Lymphozyten
<b>CD3</b>	CD3-Komplex	$\gamma$ : 25-28 $\delta$ : 20 $\epsilon$ : 20 $\xi$ : 16 $\eta$ : 22	assoziiert mit dem T-Zell-Rezeptor; notwendig für die Zelloberflächenexpression und Signalübertragung des TCR; zytoplasmatische Domänen enthalten dazu spez. Sequenzen, die Tyrosinkinasen binden	T-Zellen, Thymozyten
<b>CD21</b>	CR2	145	Rezeptor für die Komplementkomponenten C3b, C3d; beteiligt an Regulation der B-Zell Antwort	reife B-Zellen, folliculäre dendritische Zellen, wenige T-Zellen
<b>MHC I</b>			Antigenprozessierung u. -präsentation, Transplantat-abstoßung, T-Zell-Entwicklung	fast alle kernhaltige Zellen, exkl. Neurone
<b>MHC II</b>			Antigenprozessierung u. -präsentation, Transplantat-abstoßung, T-Zell-Entwicklung	B-Zellen, Makrophagen, Thymusepithel, T-Zellen, Mikroglia
<b>CD14</b>	LPS-Rezeptor	53-55	Rezeptor für den Komplex aus Lipopolysaccharid u. lipopolysaccharidbindendem Protein (LBP)	Monozyten, Makrophagen, Granulozyten
<b>CD44</b>	Hermes-1	85-90	bindet Hyaluronsäure; vermittelt die Adhäsion der Leukozyten	T- und B-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Epithelzellen, Astrozyten

**Tab. 2: Übersicht über die in dieser Studie relevanten CD-Antigene beim Hund**

Zusammengefasst nach MOORE et al. 1992; COBBOLD u. METCALFE 1994; JUNE et al. 1994; BLUMBERG et al. 1995; DANILENKO et al. 1995; JOHNSON et al. 1996; LAI et al. 1996; JANEWAY u. TRAVERS 1997; ALLDINGER et al. 2000; TIZARD 2000; MOORE<sup>2</sup>; BUSSHOF et al. 2001.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte und Materialien

##### 3.1.1 Geräte, Klinik- und Laborbedarf, Zentrifugen

###### Geräte

Aqua tridest. Aufbereitungsanlage, Seralpur Delta UF	Fa. USF Serial, Ransbach- Baumbach
Durchflusszytometer FACSCalibur™ mit Apple&Macintosh®-Computer	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine, „Scotsman“, AF 10AS	Fa. Tapa, Barsbüttel
Gefrierschrank, GS1583	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank, KT 1940	Fa. Liebherr, Ochsenhausen
Laborwaage Omnilab, OL 1500-P	Fa. Nordlab, Bremen
Lichtmikroskop, H 600	Fa. Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR 3001	Fa. Heidolph, Schwabach
Pipetten, einstellbar (0,1-1000µl)	Fa. Brand, Wertheim
Pipettierhelfer, Accu jet	Fa. Brand, Wertheim
Reagenzglasschüttler, „Reax top“	Fa. Heidolph, Schwabach
Rüttler für Mikrotiterplatten, Promax 1020	Fa. Heidolph, Schwabach
Ultraschallgerät „Sonorex“, Typ RK 103H/13067/00	Fa. Bandelin electronic GmbH, Berlin
Wasserbad mit Einhängethermostat	Fa. Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Wasservollentsalzer, DI 2800	Fa. TKA Wasseraufbereitungs- systeme GmbH, Niederelbert

**Geräte für steriles Arbeiten**

Bunsenbrenner, gasprofil	Fa. WLD-Tec, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Brutschrank, Typ 36150180003100	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Glasfaserfilterpapier, 003048.083	Fa. Schleicher u. Schüll, Dassel
Pinzette, BD 660	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, CA/R	Fa. Clean Air, Hilden

**Klinikbedarf**

Arterienklemme, BH 412R	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Braunüle Vasofix®, Ch. 4268130B, 0,9 x 25 mm	Fa. Braun, Melsungen
EDTA-Röhrchen, 5 ml	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe, Peha-soft	Fa. Hartmann, Heidenheim
Kanülen, Neolus, Lot Nr. 8895B01F, 18 G x 1 1/2'', 1,2 x 40 mm	Fa. Terumo, Leuven, Belgien
Perfusionsbesteck, Perfudrop®-Air G	Fa. Clinico, Bad Hersfeld
Pinzette, anatomisch, BD 27	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Pinzette, chirurgisch BD 557	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Präzisionspinzette, anatomisch, AE 160-12	Fa. Geomed Medizin-Technik, Tuttlingen
Präzisionspinzette, chirurgisch, BD 512	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Skalpellklingen, BB510, Lot Nr. H21312	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Skalpellklingenhalter, BB73	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Schere, groß, BC 283R	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Schere, klein, BC 111	Fa. Aesculap, Tuttlingen
Spritze, 2 ml, Discardit II, Lot Nr. 0002-086	Fa. Becton Dickinson, Fraga, Spanien

Zange, FO 626	Fa. Aesculap, Tuttlingen
<b>Laborbedarf</b>	
Auslaufpipetten, steril (1, 5, 10 u. 20 ml)	Fa. Brand, Wertheim
Glasflaschen, Plastibrand, versch. Größen	Fa. Omnilab, Gehrden
Hand-Refraktometer, HRM-18, Nr. 10487	Fa. Krüss, Hamburg
Mikrotiterplatten, 96-Loch, Rundboden, unsteril (Bestell-Nr. 7020147)	Fa. Brand, Wertheim
Pasteurpipetten, 150 mm (Bestell-Nr. 7477 15)	Fa. Brand, Wertheim
Petrischalen (Bestell-Nr. 450 2000)	Fa. Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Fa. Brand, Wertheim
0,1 - 20 µl (Bestell-Nr. 7023 12)	
2 - 20 µl (Bestell-Nr. 7023 15)	
50 - 1000 µl (Bestell-Nr. 7023 20)	
Reaktionsgefäß mit Deckel, 1,5 ml (Bestell-Nr. 7805 00)	Fa. Brand, Wertheim
Röhrchen, 15 ml (Bestell-Nr. 1148 17)	Fa. Brand, Wertheim
Röhrchen, 50 ml (Bestell-Nr. 1148 22)	Fa. Brand, Wertheim
Röhrchen für die Durchflusszytometrie, Falcon, 12 x 75 mm (Bestell-Nr. 2008)	Fa. Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Stahlsieb, Durchmesser: 6 cm	Fa. Teehaus Felber, Hannover
Zellzählkammer nach TÜRK	Fa. Brand, Wertheim
Zellzählkammer nach BÜRKER	Fa. Glaswarenfabrik K. Hecht, Sondheim
<b>Zentrifugen</b>	
Tischzentrifuge „Rotina 35R“	Fa. Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge „Rotanta RP“	Fa. Hettich, Tuttlingen

**3.1.2      Medikamente, Reagenzien und andere Verbrauchsmaterialien**

Albumin, bovine, Fraktion V, 98% pulverisiert ( <b>BSA</b> , bovines Serumalbumin; Bestell-Nr. 8076.2)	Fa. Roth, Karlsruhe
Ca-Ionophor A 23187 (s. 3.1.7)	Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>CPSR-1</b> , (s. 3.1.3), C8905	Fa. Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Dihydrorhodamin 123 (s. 3.1.7)	Fa. MoBiTec GmbH, Göttingen
Dimethylsulfoxid ( <b>DMSO</b> ) (Bestell-Nr. D-5879; Lot Nr. 99H0020)	Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hanks'-Lösung (s. 3.1.3) (Bestell-Nr. H4385)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® (Ch.-B. A06837)	Fa. Ratiopharm GmbH, Ulm
Histopaque® 1119 (s. 3.1.4)	Fa. Sigma, Deisenhofen
LPS (s. 3.1.7)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Natriumazid, NaN <sub>3</sub> , >99%, reinst (Molekulargewicht: 65,01 g/mol; Bestell-Nr. 6688)	Fa. Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (Bestell-Nr. 9265.2)	Fa. Roth, Karlsruhe
Natriumbikarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) (Bestell-Nr. S-8875)	Fa. Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Pancoll® (s. 3.1.4)	Fa. Cytogen, Ober-Mörlen
Paraformaldehyd (Bestell-Nr. 1.04005.1000)	Fa. Merck, Hannover
PBS (s. 3.1.3)	
Eutha® 77 (400 mg Pentobarbiturat/ml)	Fa. Essex Tierarznei, München
Perkoll® (s. 3.1.4)	Fa. Pharmacia, Freiburg
PMA (s. 3.1.7)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Saponin (Bestell-Nr. 1.59665.0001)	Fa. Merck, Hannover

Softasept®N (74,1% Ethanol, 10,0% N-Propanol; Bestell-Nr. 0388 7049)	Fa. Braun, Melsungen
Trypanblau (Bestell-Nr. T-6146)	Fa. Sigma Aldrich, Schnelldorf
Tutofusin-Lösung® (s. 3.1.3) Ch.-B. 6309112	Fa. Baxter, Unterschleißheim

### 3.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

#### Dissoziations-Puffer:

NaCl	89,4 g/l
KCl	37,3 g/l
MgCl <sub>2</sub>	40,0 g/l
CaCl <sub>2</sub>	25,3 g/l

#### Hanks'-Lösung (s. 3.1.2; Fa. Sigma, Deisenhofen):

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
Glucose	1,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60,0 mg
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	47,5 mg
Phenolrot	17,0 mg
Aqua bidest.	ad 1000 ml
<b>+ Zusatz von:</b>	
CPSR-1	20,0 ml
Natriumbikarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ); 7,5%ig	4,7 ml
- zur pH-Werteinstellung auf pH 7,3-7,4 -	

#### Collagenase-DNAse-Puffer (Collagenase, s. 3.1.5, Fa. Serva, Heidelberg; DNAse I, s. 3.1.5, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim);

pro Versuchsansatz (= 8 g Gehirnmaterial):

DNAse	4.000 Units
Aqua bidest.	8,0 ml
Collagenase	45,6 mg
Dissoziations-Puffer	0,8 ml

**MIF- (Membranimmunfluoreszenz-) Puffer:**PBS mit 1 % BSA und 0,01 % NaN<sub>3</sub>

BSA	1,00 g
NaN <sub>3</sub> ; 10%ig	0,01 g
PBS	ad 100 ml

**PBS (phosphate-buffered saline) pH 7,4:**

NaCl	8,00 g
KCl	0,20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

**Lösung zum Lysieren von Erythrozyten:**

doppelt konzentrierte Phosphatpufferlösung ( 2 x PBS)

Aqua tridest.	ad 1000,00 ml
---------------	---------------

**Tutofusin<sup>®</sup>-Injektionslösung** (s. 3.1.2, Fa. Baxter, Unterschleißheim):

NaCl	8,182 g
KCl	0,373 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,368 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,305 g
Aqua ad inj.	1000 ml

**3.1.4 Materialien für die Separation und Differenzierung von Zellen**

Histopaque <sup>®</sup> 1119 (Bestell-Nr. 1119-1; Lot Nr. 128H6112)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Pancoll <sup>®</sup> 1.077 (Bestell-Nr. P04-60500; Lot Nr. 030 100)	Fa. Cytogen, Ober-Mörlen
Perkoll <sup>®</sup> (Bestell-Nr. 17-089-01; Lot Nr. 278498)	Fa. Pharmacia, Freiburg

### 3.1.5 Enzyme

Collagenase von *Clostridium histolyticum*;  
EC 3.4.24.3; lyophilisiert  
(Bestell-Nr. 17449; Contr. Nr. 24029)

Fa. Serva, Heidelberg

Deoxyribonuclease I (DNase I; EC 3.1.21.1)  
Typ IV: von bovinem Pankreas  
(Bestell-Nr. D-5025; Lot Nr. 28H7015)

Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

### 3.1.6 Materialien für die indirekte Membranimmunfluoreszenz

MIF-Puffer (s. 3.1.3)

#### Primäre Antikörper

##### *Monoklonale Antikörper, unkonjugiert*

Class I Major Histocompatibility Antigen  
(**MHC I**); Zelllinie H58A; Isotyp:  
IgG2a (Lot Nr. 0698-0899);  
verw. Verdünnung: 1:16

Fa. VMRD, Inc., Pullman, USA

**D110** ist ein aus der Maus gewonnener Antikörper, der als Zellkulturüberstand bereitgestellt wurde (BOLLO et al. 1986) und an ein Epitop des Nukleokapsid-Proteins des Staupevirus bindet, das gegen Fixation und Einbettung unempfindlich ist. Er wurde in einer Verdünnung von 1:16 verwendet.

Humanes Normal-Immunglobulin G  
(Lot Nr. 015 117.01; **HuIgG**);  
verw. Verdünnung: 1:16

Fa. Globuman Berna®, Serum-  
und Impfinstitut Bern, Schweiz

Ratte-anti-Hund **CD44**; aufgereinigtes IgG;  
MCA 1041G; Klon Nr.: YKIX 337.8.7  
(Lot Nr. 0998); verw. Verdünnung: 1:10

Fa. Serotec, Eching

gegen folgende canine Antigene gerichtete Antikörper	Klon	Isotyp	Verdünnung
CD1c	CA13.9H11	IgG1	1 : 5
1D11	CA22.1D11	IgG1	1 : 5
ICAM-1	CL18-1D8	IgG1	1 : 5
B7-1	CA24.5D4	IgG1	1 : 5
B7-2	CA24.3E4	IgG1	1 : 5
CD3	CA17.2A12	IgG1	1 : 5
CD4	CA13.1E4	IgG1	1 : 5
CD8 $\alpha$	CA9.JD3	IgG2a	1 : 5
CD21	CA2.1D6	IgG1	1 : 5
CD11b	CA16.3E10	IgG1	1 : 5
CD11c	CA11.6A1	IgG1	1 : 5
CD11d (alpha d)	CA11.8H2	IgG1	1 : 5
CD18	CA1.4E9	IgG1	1 : 5
MHC class II	CA2.1C12	IgG1	1 : 5

**Tab. 3:** Eingesetzte Antikörper für die immunphänotypische Charakterisierung von Mikrogliazellen und Monozyten sowie die verwendete Verdünnung

Sämtliche in der Tabelle angeführten Antikörper sind aus Zellkulturüberständen gewonnen und mit 0,1 % Natriumazid versetzt. Sie wurden von Prof. Dr. Peter F. Moore, VM Pathologie, Mikrobiologie und Immunologie, Veterinärmedizinische Universität Californien, Davis, USA, zur Verfügung gestellt.

#### *Monoklonale Antikörper, konjugiert*

Maus-anti-Human **CD14** konjugiert an R-Phycoerythrin (RPE);aufgereinigtes IgG; Klon TÜK4 (Code Nr. R 0864; Lot Nr. 108); verw. Verdünnung: 1:7

Fa. Dako, Glostrup, Dänemark

Ratte-anti-Hund **CD45** konjugiert an Biotin; aufgereinigtes IgG; MCA 1042B; Klon Nr.: YKIX 716.13 (Lot Nr. 0699); verw. Verdünnung: 1:10

Fa. Serotec, Eching

**Sekundäre Antikörper**

Aufgereinigtes R-Phycoerythrin-konjugiertes F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Ziege-anti-Maus ( <b>gam-PE</b> ) IgG (Code Nr. 115-116-072; Lot Nr.: 45974); verw. Verdünnung 1:100	Fa. Dianova, Hamburg
Für Staupevirusnachweis mit D110: verw. Verdünnung 1:50	
Streptavidin konjugiertes Fluorescein-Isothiocyanat (Isomer 1; <b>FITC</b> ); STAR2B (Lot Nr. 1199); verw. Verdünnung 1:100	Fa. Serotec, Eching
Aufgereinigtes R-Phycoerythrin-konjugiertes F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Kaninchen-anti-Ratte ( <b>rar-PE</b> ) IgG; STAR20A; verw. Verdünnung 1:100	Fa. Serotec, Eching

**3.1.7 Materialien für die Bestimmung reaktiver Sauerstoffmetaboliten**

Ca-Ionophor, A 23187 (Molekulargewicht: 523,6 g/mol; Bestell-Nr. C-7522; Lot Nr. 128H4002)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Dihydrorhodamin 123 ( <b>DHR</b> 123) (Molekulargewicht: 346,38 g/mol; Bestell-Nr. D632)	Fa. MoBiTec GmbH, Göttingen
<b>LPS</b> , Lipopolysaccharid, von E. coli, Serotyp 055:B5 (Bestell-Nr. L-2637; Lot Nr. 99H4081)	Fa. Sigma, Deisenhofen
<b>PBS</b> (s. 3.1.3)	
<b>PMA</b> , Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (Bestell-Nr. P-8139; Lot Nr. 129H1735)	Fa. Sigma, Deisenhofen

**Herstellung der DHR-Gebrauchslösung:**

Durch Auflösen der Trockensubstanz in DMSO (1,5 mg/l, s. 3.1.2) wurde eine DHR-Stamm-lösung hergestellt. Diese wurde in aliquoten Teilen zu 1,5 µl bei -20 °C gelagert. Nach weiterer Verdünnung mit PBS im Verhältnis 1:100 entstand die DHR-Gebrauchslösung.

### 3.1.8 Materialien für die Bestimmung der Phagozytoseaktivität

<i>Escherichia coli</i> konjugiert mit Fluorescein (K-12 Stamm) BioParticels®; (Bestell-Nr. E 2861; Lot Nr. 6691-2)	Fa. Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Omnisorb® Cells; hitzeinaktivierte <i>Streptokokken sp.</i> (Bestell-Nr. 496250)	Fa. Calbiochem-Novabiochem GmbH, Baden Soden/Taunus
<i>Staphylococcus aureus</i> konjugiert mit Fluorescein (Wood strain without Protein A) BioParticels®; (Bestell-Nr. S 2851; Lot Nr. 6301-1)	Fa. Molecular Probes, Leiden, Niederlande

#### *Serum zur Opsonisierung der Bakterien:*

Zur Opsonisierung der Bakterien wurde natives Serum verwendet, das aus dem Blut von zehn Beagle der Klinik für kleine Haustiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter keimarmen Bedingungen im Rahmen einer routinemäßigen Blutuntersuchung gewonnen wurde. Die allgemeine Untersuchung der Tiere ergab, dass sie klinisch gesund waren. Das Blut wurde bis zur deutlichen Koagulation bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend wurde die Verbindung zwischen Röhrchenwand und Koagulat mit Hilfe einer Pasteurpipette gelöst. Es folgte eine Zentrifugation der Röhrchen bei 2.000 x g für 15 min bei Raumtemperatur. Um noch verbliebene korpuskuläre Bestandteile zu entfernen, wurde der Überstand gewonnen und für 10 min bei 3.500 x g zentrifugiert. Das so gewonnene Serum der zehn Tiere wurde zu gleichen Anteilen zusammengegeben (gepoolt). Die Lagerung erfolgte in aliquoten Teilen zu 60 µl bei -20 °C. Zum Einsatz kam eine im Verhältnis 1:5 mit PBS verdünnte Gebrauchslösung.

### 3.1.9 Materialien für die Durchflusszytometrie

Reinigungsflüssigkeit: FACSRinse® (Bestell-Nr. 340346; Lot Nr. 28)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Trägermedium zur Messung: FACSTFlow®; (Bestell-Nr. 342003; Lot Nr. 1294)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

### 3.1.10 Computer-Software

Cell-Quest®-Software  
(für Apple&Macintosh®-Computer)

Fa. Becton Dickinson, Heidelberg

STATeasy 2001-Software für Windows

Dr. Lozan, Universität Hamburg

### 3.1.11 Virus

Der virulente Staupevirusstamm A75/17 wurde vom Institut für Tierneurologie der Universität Bern bezogen. Das Virus wurde in einem vorhergehenden Versuch (CHERPILLOD et al. 2000) zunächst in spezifisch-pathogenfreien Hunden vermehrt, aus diesen Tieren gewonnenes lymphatisches Gewebe, das große Mengen an Virus enthielt, wurde homogenisiert, gereinigt und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Belastungsinfektion wurden die Versuchstiere mit 0,2 ml des so gewonnenen Virus-Homogenisats intravenös infiziert.

### 3.1.12 Impfstoff

Der in diesem Versuch verwendete DNA-Impfstoff enthielt je ein eukaryotisches Expressions-Plasmid mit den Genen des Nukleokapsid- (N), Fusions- (F) und Haftproteins (H) eines virulenten Staupevirus-Stammes (CHERPILLOD et al. 2000). Eine Impfdosis bestand zu gleichen Teilen aus jedem der oben genannten Gene. Es wurden folgende Impfgruppen gebildet: 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  und 200  $\mu\text{g}$  DNA pro Plasmid sowie eine ungeimpfte Positivkontrollgruppe (SCHREINER 2001).

### 3.1.13 Probanden

Die Vorversuche zum Erlernen der Technik der Mikrogliaisolierung wurden am Institut für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg im Rahmen von Studien (HANSEN 1999) an eigens gezüchteten Mäusen und F344-Fisher-Ratten erlernt.

Die Adaptation der Technik der Mikrogliaisolierung für den Hund wurde an Gehirngewebe von sieben frisch euthanasierten Hunden an der Klinik für kleine Haustiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. Diese Hunde wurden aufgrund verschiedener extraneuraler Erkrankungen auf Wunsch der Besitzer euthanasiert und am Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover morphologisch untersucht.

Der Hauptversuch fand im Rahmen einer Impfstoffstudie im Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe in Mittelhäusern, Schweiz, statt. Als Probanden dienten 22 Swiss-Beagle aus zwei Würfen einer Versuchstier-Zucht aus Zürich, Schweiz. Die Staupevirus-seronegativen Tiere wurden zwischen dem 2. und 4. Februar 2000 unter SPF-Bedingungen geboren und gehalten. Die Impfstoffversuchstiergruppe setzte sich aus zehn weiblichen und zehn männlichen Tieren zusammen. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns waren die Hunde circa 8 Wochen alt. Sie wurden einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, bei der keinerlei Abweichungen vom physiologischen Zustand auffielen (s. auch SCHREINER 2001).

Im Alter von etwa 12 Wochen wurden 15 Tiere mit unterschiedlichen Konzentrationen des DNA-Vakzine-Impfstoffs (s. 3.1.12) durch Injektion in den Musculus quadriceps geimpft. Diese Impfung wurde mit einem Abstand von vier Wochen wiederholt. Fünf Hunde (Positivkontrolltiere für den Impfstoffversuch) wurden nicht geimpft (SCHREINER 2001). Vier Wochen nach der letzten Immunisierung wurden alle Tiere am 30. Juni 2000 im Alter von etwa fünf Monaten durch intravenöse Gabe von 0,2 ml einer virulenten A75/17-Staupevirus-Milzsuspension (s. 3.1.11) infiziert.

Versuchsgruppen	Menge der geimpften DNA pro Plasmid	Menge der Staupevirus-Suspension	Anzahl der Tiere
Impfgruppe 1	50 µg	0,2 ml	5
Impfgruppe 2	100 µg	0,2 ml	5
Impfgruppe 3	200 µg	0,2 ml	5
Positivkontrolle	0 µg	0,2 ml	5
Negativkontrolle	0 µg	0 ml	2

**Tab. 4:** Übersicht über die Probanden des Hauptversuchs

Bei Auftreten neurologischer Symptome der nicht-immunisierten Tiere (ab Tag 20 p.i.) wurden alle Tiere euthanasiert. Zum Zeitpunkt der Euthanasie waren sie ca. 6 Monate alt. Zwei gleichaltrige, ungeimpfte, nicht-infizierte SPF-Hunde unterschiedlichen Geschlechts aus den gleichen Würfen wurden als Negativkontrolltiere herangezogen. Die Tierversuchsbewilligungsnummer lautet 111/99/Bern/CH.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Gewinnung und Isolierung von Leukozyten aus Hundeblut**

Im Rahmen der Vorversuche wurden canine Leukozyten verwendet, um an ihnen die für die Untersuchung der Monozyten und die Charakterisierung der caninen Mikroglia bei Hundestaupe zu verwendenden Antikörper zu testen und ihre optimale Verdünnungsstufe zu ermitteln. Dabei wurde wegen der vergleichbaren Färbeeigenschaften von Monozyten und Mikroglia (DIJKSTRA et al. 1985; FLARIS et al. 1993) vorausgesetzt, dass die für die Monozyten ermittelten Ergebnisse der Antikörper auch für die Mikroglia gelten.

Die Vorversuche der Tests zur funktionellen Charakterisierung der Mikroglia sowie die Ermittlung der Trigger und deren Konzentrationen wurden an neutrophilen Granulozyten durchgeführt, da Mikrogliazellen nur sehr begrenzt zur Verfügung standen.

#### **3.2.1.1 Blutentnahme**

Im Rahmen routinemäßiger Untersuchungen wurden jeweils 7 bis 10 ml Hundeblut von verschiedenen Patienten der Klinik für kleine Haustiere der Tierärztlichen Hochschule und im Hauptversuch von 22 Swiss-Beagle durch Punktion aus der gestauten Vena cephalica antebrachii oder Vena saphena lateralis entnommen. Das Blut wurde in EDTA-Zusatz enthaltende Röhrchen (s. 3.1.1) möglichst kontaminationsfrei aufgefangen. Die Versuche – in Form der indirekten Membranimmunfluoreszenz – schlossen sich unmittelbar an die Blutentnahme an.

#### **3.2.1.2 Separation der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) des Hundes**

Die Separation der PBMCs (Monozyten und Lymphozyten) erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation nach einer von SOMBERG et al. (1992) modifizierten Methode von WUNDERLI u. FELSBURG (1989).

Das Blut wurde in der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank in ein steriles Zentrifugenröhrchen pipettiert, im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und vorsichtig durch Aufziehen in einer Pipette vermischt. Der Dichtegradient bestand aus 2 ml Histopaque® der Dichte 1,119 g/ml und vorsichtig darübergeschichteten 2 ml Pancoll® der Dichte 1,077 g/ml in einem

15 ml-Röhrchen. Darauf wurde das Blut-PBS-Gemisch gegeben und für 35 Minuten bei 400 x g und Raumtemperatur (RT, 20 °C) bei einer Anlaufzeit von 120 Sekunden und Auslaufzeit ohne Bremse zentrifugiert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte separierten die Blutzellen in drei Fraktionen: die mononukleären Zellen und einige Thrombozyten sammelten sich als weiße Bande in der Interphase zwischen Blutplasma und Pancoll® an, die Granulozyten befanden sich als gelblicher Ring zwischen den beiden Dichten, während die Erythrozyten zum Röhrchenboden sedimentierten. Nach Ablauf der Zentrifugation wurde der Überstand, bestehend aus Blutplättchen, Zelldetritus und Plasma, verworfen. Die Zellen, die sich oberhalb der 1,077 g/ml-Bande befanden, wurden mit einer 1 ml- oder sterilen Pasteur-Pipette abgenommen, in ein separates Röhrchen überführt und mit 10 ml PBS suspendiert. Zur Reinigung von noch vorhandenen Blutplättchen wurde mit einer Geschwindigkeit von 200 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet wurde gewonnen und zwei weitere Reinigungszentrifugationsschritte zum Entfernen von Histopaque- bzw. Pancollresten schlossen sich an. Dabei wurde mit PBS für jeweils 8 Minuten mit 200 x g zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in einem Zehntel der originären Blutmenge mit PBS resuspendiert.

### 3.2.1.3 Separation von neutrophilen Granulozyten des Hundes

Sollten anstelle der peripheren mononukleären Zellen Granulozyten isoliert werden, so wurde die Dichtegradientenzentrifugation (s. 3.2.1.2) für 30 min und 400 x g bei 4 °C durchgeführt, um eine Aggregation und Aktivierung vor den funktionellen In-vitro-Untersuchungen zu vermeiden. Sämtliche Gefäße und Lösungen waren ebenfalls auf 4 °C vorgekühlt. Nach erfolgter Zentrifugation wurde die Granulozyten-Bande in der Interphase zwischen den beiden Dichten mit einer 1 ml- oder sterilen Pasteur-Pipette abgenommen und mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Befanden sich in dieser Zellfraktion Erythrozyten, so wurden sie durch hypotone Lyse entfernt. Dazu wurden 5 ml Aqua tridest. (4 °C) zu etwa 2 ml Zellsuspension gegeben und 20 Sekunden geschwenkt. Die resultierende Lyse betraf selektiv die Erythrozyten, da kernhaltige Zellen gegenüber hypotonen Lösungen wesentlich unempfindlicher sind als kernlose. Die Isotonie wurde durch Zugabe von 5 ml doppelt konzentrierter PBS (s. 3.1.3) wieder hergestellt. Nach Zentrifugation (8 min, 200 x g) wurde diese Prozedur

nach Dekantieren des Überstands und Resuspension des Pellets wiederholt, um noch verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Abschließend wurde eine weitere Reinigungszentrifugation für 8 min bei 100 x g durchgeführt. Nach dieser letzten Zentrifugation wurde die Zellsuspension mit PBS (s. 3.1.3) auf ein Zehntel der originären Blutmenge aufgefüllt. Alle Präparationsschritte, sowohl der PBMCs als auch der Granulozyten, fanden unter sterilen Bedingungen statt. Für das Pipettieren kamen Glaspipetten zum Einsatz.

### 3.2.2 Lichtmikroskopische Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 90 µl Trypanblau mit 10 µl der isolierten Zellsuspension versetzt und sorgfältig vermischt. 10 µl des Gemischs wurden in eine Zellszählkammer nach TÜRK (s. 3.1.1) pipettiert und mikroskopisch vier große Eckquadrate ausgezählt. Dabei fanden nur ungefärbte und somit lebende Zellen Berücksichtigung. Die Auswertung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{vier Eckquadrate}} \times 10.000 \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension}$$

Anschließend wurde die Zellsuspension durch Zugabe von PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

### 3.2.3 Färbung der Zelloberfläche bzw. indirekte Membranimmunfluoreszenz (MIF) der peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) des Hundes

Zum Nachweis zellulärer Oberflächenstrukturen wurde die indirekte Membranimmunfluoreszenztechnik (MIF) eingesetzt. Dabei bindet ein primärer Antikörper an bestimmte Oberflächenstrukturen auf der Zelle. Ein zweiter, fluorochromkonjugierter Antikörper erkennt den primären Antikörper und bindet an diesen. Die Fluoreszenzintensität des zweiten Antikörpers kann mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen werden. Als Negativkontrolle für unspezifische Bindungen der eingesetzten Differenzierungsantikörper an die Zellen diente ein Ansatz ohne Primärantikörper.

Für die Immunfärbung wurden Ansätze von jeweils 50 µl (mit  $2 \times 10^5$  Zellen) in Probenröhrchen bzw. in die Vertiefungen („well“) einer 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte pipettiert. Diese wurden zunächst mit 10 mg/ml humanem Normalimmunglobulin G (s. 3.1.6)

absorbiert (TIPOLD et al. 1998), um unspezifische Fc-Rezeptor-Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde mit einem primären Antikörper in einer zuvor ermittelten Konzentration (s. Tab. 3) für 30 min bei 4 °C inkubiert.

Sofern ein unkonjugierter Primärantikörper verwendet wurde, erfolgte nach zweimaligem Waschen die Inkubation mit dem PE-markierten Sekundärantikörper (goat-anti-mouse-R-Phycoerythrin = g $\alpha$ m-PE, bzw. rabbit-anti-rat-R-Phycoerythrin = r $\alpha$ r-PE bei Verwendung des Primärantikörpers gegen CD44, s. 3.1.6) für 30 min bei 4 °C.

Bei Verwendung eines direkt-markierten Antikörpers (gegen CD14, s. 3.1.6) entfiel die Zugabe eines sekundären Antikörpers.

Zur Durchführung einer Doppelfärbung wurde parallel zur Zugabe eines unkonjugierten Primärantikörpers der Biotin-konjugierte Primärantikörper (gegen CD45) verwendet und nach Inkubation zusätzlich zum sekundären Antikörper g $\alpha$ m-PE das Streptavidin-markierte Fluorescein-Isothiocyanat zugegeben und in oben genannter Weise inkubiert.

Nach den Inkubationsschritten mit primärem oder sekundärem Antikörper erfolgte jeweils eine zweimalige Resuspension der Zellen in 200  $\mu$ l Waschlösung (MIF-Puffer, s. 3.1.3) und Zentrifugation für 2 min bei 200 x g und 4 °C.

Danach wurden die Zellen in 200 bis 400  $\mu$ l FACSCFlow® resuspendiert, in Messröhrchen überführt und bei 4 °C aufbewahrt. Bei der sich anschließenden Messung im Durchflusszytometer (FACSCalibur™, s. 3.1.1) wurden pro Ansatz 10.000 Zellen (engl. „events“) untersucht.

Sollte – wie im Hauptversuch - eine differenzierte Untersuchung der Monozyten erfolgen, so konnten sie anhand ihrer Größe im Dot Plot mit den Parametern Größe (FSC) gegen Granularität (SSC) identifiziert und anschließend in ein „gate“ (Auswertungsfenster) eingefasst werden. Lediglich die Zellen innerhalb dieses gates fanden für die weitere Auswertung Berücksichtigung (s. 4.2.6 u. 4.2.8).

Die jeweils anfallenden Rohdaten wurden zunächst im Computer gespeichert und zu einem späteren Zeitpunkt mit Hilfe des Analysenprogramms Cell-Quest® (s. 3.1.10) ausgewertet.

### 3.2.4 Untersuchungen zur Zellfunktion

Vorversuche zur funktionellen Charakterisierung der caninen Mikroglia wurden aufgrund des begrenzten Vorhandenseins von Mikrogliazellen an neutrophilen Granulozyten durchgeführt, um mit der Technik vertraut zu werden und die Bakterien und Trigger sowie deren optimale Konzentrationen für die Spezies Hund zu ermitteln. Wegen der funktionellen Gemeinsamkeiten dieser beiden Zellpopulationen wurde die analoge Reaktion der Mikroglia angenommen.

#### 3.2.4.1 Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten (ROS = reactive oxygen species) durch neutrophile Granulozyten

Zur Abtötung von Mikroorganismen besitzen neutrophile Granulozyten neben der Aktivierung zahlreicher lysosomaler Enzyme ebenfalls die Fähigkeit, mikrobizide Sauerstoffmetaboliten (ROS) zu bilden. Während die Aktivierung des Schlüsselenzyms für den Sauerstoffmetabolismus, die NADPH-Oxidase, in vivo unter anderem durch Mikroorganismen aktiviert wird, wurde dies in vitro durch Zugabe von PMA in verschiedenen Endkonzentrationen, PMA in Kombination mit Ca-Ionophor A 23187 bzw. LPS (s. 3.1.7) untersucht. Die NADPH-Oxidase katalysiert spontan und zusammen mit der Superoxid-Dismutase die Bildung des relativ schwach toxischen Wasserstoffperoxids, das aber mit Hilfe von Halogen-Ionen durch die Myeloperoxidase aus der primären Granula zu einer stark bakteriziden unterchlorigen Säure umgesetzt wird (ROITT et al. 1991).

Um die intrazelluläre Bildung von Wasserstoffperoxid nachzuweisen, wird der durch die Triggerzugabe stimulierten Zellsuspension das nicht-fluoreszierende Dihydrorhodamin 123 (DHR 123, s. 3.1.7) hinzugegeben. Das DHR 123 wird passiv von den Zellen aufgenommen und durch Oxidation, katalysiert durch die Myeloperoxidase, in das grünfluoreszierende Rhodamin 123 metabolisiert. Dieses Kation bindet an negativ geladene intrazytoplasmatische Membranen und kann nun die Zelle nicht mehr verlassen. Granulozyten, die eine erhöhte Myeloperoxidaseaktivität aufweisen, sind somit aufgrund ihrer erhöhten Grünfluoreszenz differenzierbar.

Zur Durchführung des Tests wurden pro well jeweils 100 µl mit  $2 \times 10^5$  Zellen in eine 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte (s. 3.1.1) gegeben. Die Untersuchungen wurden für jeden

Trigger als Triplikate angesetzt. Um ein vergleichbares Ausgangsniveau der Zellen voraussetzen zu können, wurden die Granulozyten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank verschlossen für 15 min vorinkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Triggerung (Stimulation) durch Zugabe verschiedener PMA-Endkonzentrationen (1000, 300, 100, 30, 10 und 5 nmol PMA/l Zellsuspension), PMA in einer Konzentration von 50 nmol/l Zellsuspension und Ca-Ionophor A23187 in einer Konzentration von 0,5 µmol/l Zellsuspension sowie LPS in einer Konzentration von 10 µg/ml Zellsuspension. Zur homogenen Vermischung der Zellen mit den Triggern wurde die Platte für 15 Sekunden auf dem Mikrotiterplattenrüttler geschwenkt. Im Kontrollansatz wurde statt des Triggers PBS eingesetzt. Die Aktivierung der Zellen erfolgte durch einen weiteren Inkubationsschritt für 15 min verschlossen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Anschließend wurden 20 µl der DHR-Gebrauchslösung (15 µg DHR/ml Gebrauchslösung) hinzugegeben, die Platte wiederum gerüttelt (s. oben) und erneut für 15 min verschlossen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde die Platte zum Stoppen der Reaktion und zum Minimieren der Adhärenz aktivierter Zellen für 10 bis 15 min lichtgeschützt auf Eis gestellt. Daraufhin wurde 100 µl FACSFlow® pro well hinzupipettiert, die Zellsuspension in Rörchen überführt und innerhalb der nächsten 15 min im Durchflusszytometer gemessen. Dabei wurden pro Ansatz 10.000 Zellen ausgezählt. Die Daten wurden mit Hilfe des Analysenprogramms Cell-Quest® für Apple&Macintosh®-Computer ausgewertet. Der arithmetische Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten der Triplikate der Granulozyten galt als Ergebnis der jeweiligen Probe.

### 3.2.4.2 Bestimmung der Phagozytoseaktivität

Als Phagozytosepartikel kamen drei verschiedene FITC-markierte Bakterienarten (s. 3.1.8) zum Einsatz. Die Aufbereitung der Streptokokken folgte der von FRANK (2000) beschriebenen Methode. Dabei wurden die Vorratsrörchen mit 1 ml Bakteriensuspension ( $2 \times 10^8$  Bakterien/ml PBS) bei  $15.000 \times g$  für 60 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Bakterienpellet im Rörchen kräftig resuspendiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sowie einer BÜRKER-Zählkammer (s. 3.1.1) erneut auf eine Dichte von  $2 \times 10^8$  Streptokokken pro ml eingestellt. Die lyophilisierten Staphylokokken und E. coli wurden zunächst in 500 µl PBS resuspendiert und anschließend

im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Diese Suspension wurde für 4 min mit Ultraschall (s. 3.1.1) behandelt, um aneinander haftende Bakterien zu vereinzeln. Die Auszählung der Bakterien ergab einen Gehalt von etwa  $8 \times 10^8$  Bakterien/ml. Die Bakteriensuspension wurde nachfolgend auf eine Konzentration von  $10^8$  Bakterien/ml eingestellt: Von jeder Bakteriensuspension wurden 50 µl in einem ersten Reaktionsgefäß mit Deckel (s. 3.1.1) mit 50 µl PBS (= n-ops, nicht-opsonisiert) und in einem zweiten mit 50 µl Hundepoolserum (= ops, opsonisiert) vermischt. Die beiden verschlossenen Reaktionsröhrchen wurden anschließend zur Opsonisierung für 60 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Danach wurden pro Röhrchen 300 µl PBS hinzugegeben. Die Lagerung erfolgte in aliquoten Teilen zu 200 µl bei -20 °C.

Nach sorgfältiger Suspension wurde eine 96-Loch-U-Boden-Mikrotiterplatte (s. 3.1.1) mit 100 µl der jeweiligen Bakteriensuspension (=  $10^7$  Bakterien) beschickt. Den Bakterien in der Mikrotiterplatte wurden 100 µl Zellsuspension (mit  $10^5$  Zellen) hinzugegeben. Somit lag ein Zellen-Bakterien-Verhältnis von 1:100 vor. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz der Leukozytensuspension ohne Zugabe von Bakterien mitgeführt. Die Mikrotiterplatte mit den Versuchsansätzen wurde auf dem Plattenrüttler durchmischt und dann für 60 min verschlossen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um optimale Zell-Bakterien-Kontakte zu gewährleisten, wurde nach Ablauf von 30 min der Inkubation eine erneute Durchmischung auf dem Plattenrüttler vorgenommen. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Platte für 10 bis 15 min auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen und die Adhärenz der Zellen an die Mikrotiterplattenwand zu minimieren. Die Ansätze wurden anschließend in 100 µl FACSFlow® aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung im Durchflusszytometer (s. 3.1.1) erfolgte innerhalb der nächsten 15 min. Pro Versuchsansatz wurden 5.000 bis 10.000 Partikel gemessen. Unter ihnen befanden sich neben Leukozyten auch Bakterienaggregate, die jedoch bei der Auswertung mit dem Analysenprogramm Cell-Quest® ausgegrenzt werden konnten und somit nicht berücksichtigt wurden.

### 3.2.5 Messung in der Durchflusszytometrie

Die Messung im Durchflusszytometer, verwendet wurde das FACSCalibur™ von Becton Dickinson (s. 3.1.1), erlaubt eine zuverlässige und schnelle Charakterisierung von Zellen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Das Durchflusszytometer besitzt dazu

ein Sensormodul zur Messung optischer Eigenschaften von Zellen und eine Computereinheit zur Erfassung und Auswertung der gemessenen Daten.

Zur Messung optischer Eigenschaften wird die Zellsuspension im Probenröhrchen mit Hilfe von Überdruck pneumatisch der Messküvette zugeführt. Innerhalb dieser Messeinheit bilden die Zellen im Trägermedium (FACSFlow®, s. 3.1.9) durch hydrodynamische Fokussierung einen laminaren und zentralen Partikelstrom, so dass sie den Strahlengang eines Argon-Ionen-Lasers (Wellenlänge 488 nm) in Form eines Einzelzellstroms passieren. Dabei kommt es zu einer Interaktion zwischen Laserstrahl und Zelle in Abhängigkeit von der Zellgröße sowie der Struktur der Zellmembran und des Zellinneren.

Die Beugung des Lichts in Richtung des einfallenden Strahls wird als Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, **FSC**; 1-10°) bezeichnet und wird durch die Größe eines Partikels bzw. einer Zelle beeinflusst. Das im rechten Winkel zum Strahlengang gestreute Licht, das sogenannte Seitwärtsstreulicht (side scatter, **SSC**), gibt Hinweise auf die Komplexität und Granularität der Zellen. Jede Zelle wird sowohl im FSC als auch im SSC von Detektoren mit jeweils 1.024 Kanälen erfasst. Die Werte können miteinander korreliert werden und erlauben somit eine morphologische Charakterisierung der Zellen nach Größe und Komplexität.

Zusätzlich lassen sich noch bis zu vier Fluoreszenzen mit unterschiedlichen Maxima erfassen, wodurch Partikel mit hoher Eigenfluoreszenz oder nach Markierung mit Fluorochromen nachgewiesen werden können. Fluoreszierende Substanzen emittieren nach Anregung durch den Laserstrahl Lichtquanten mit für das Fluorochrom charakteristischer Wellenlänge, die langwelliger und energieärmer als das Anregungslicht sind. Das verwendete Durchflusszytometer erlaubt mit seinem Argon-Ionen-Laser die Erfassung von Grün- (FL1, Wellenlänge 515-545 nm), von Orange- (FL2, Wellenlänge 564-606 nm) und von Rotfluoreszenzintensitäten (FL3; Wellenlänge > 650 nm). Die Fluoreszenzsignale werden von Detektoren (Photomultiplier) mit hoher Sensitivität für diese bestimmten Wellenlängenbereiche erfasst, verstärkt und auf den Bildschirm übertragen. Zur Vermeidung von Überstrahlungseffekten wurden die einzelnen Fluoreszenzen elektronisch kompensiert. Die Fluoreszenzintensität ist ein relatives Maß für die Zahl der emittierten Signale und damit für die Expressionsdichte der Oberflächenmoleküle, die durch diesen Antikörper erkannt werden. Sie wird logarithmisch

verstärkt und auf einer linearen Skala mit 1.024 Kanälen, die vier Logarithmen-Dekaden (0-10.000) entspricht, dargestellt.

Somit können gleichzeitig zwei morphologische Charakteristika und drei Fluoreszenzen gemessen werden. Mit der angeschlossenen Computereinheit ist die Auswertung dieser Daten möglich. Dabei lassen sich jeweils zwei Parameter miteinander korrelieren. Die graphische Darstellung der Messwerte erfolgte entweder als Histogramm oder als Dot Plot. Bei der Darstellung als Dot Plot (s. Abb. 9A), der auch als Punktgraph bezeichnet wird, werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen und bei jeder Schnittstelle der beiden Werte wird ein Punkt angezeigt (korrelierte Zweiparameterdarstellung). Die Abszisse des Histogramms zeigt die 1.024 Kanäle des gewählten Parameters, während die Ordinate die Anzahl der jeweiligen Messsignale in diesem Kanal darstellt (s. Abb. 9B; Einparameterdarstellung).

Soll nur eine Teilpopulation von Zellen für eine Auswertung berücksichtigt werden, so ist es möglich, diesen Teilbereich der Gesamtpopulation durch Setzen eines Auswertungsfensters (engl. „gate“) um die Zellen zu definieren und nur deren Messwerte zu erfassen (JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Anhand der graphischen Darstellungen lassen sich die gemessenen Zellen exakt charakterisieren und differenzieren sowie bestimmte Teilpopulationen isoliert und gezielt untersuchen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Analysenprogramm Cell-Quest® (s. 3.1.10). Dabei wurde ein Auswertefenster gesetzt, dass die Messergebnisse der jeweiligen Negativkontrolle bis auf maximal zwei Prozent ausgrenzte. Bei der Beurteilung der Messresultate für die einzelnen Untersuchungen definierte dieses Fenster die positiven Ergebnisse (s. Abb. 12).

### **3.2.6 Test der für die Isolierung der Mikroglia geeigneten Zentrifugen**

Für die in dieser Studie verwendeten Zentrifugen bestanden mehrere Voraussetzungen, die erfüllt werden mussten, um das Gelingen der Separation der PBMCs und mehr noch der Isolation der Mikroglia zu ermöglichen. So musste z.B. die Anlauf- und Auslaufzeit der Zentrifuge programmierbar sein, was besonders wichtig war, um die Dichtegradienten nicht zu zerstören (s. 3.1.1, 3.2.1.2 u. 3.2.10.2).

Um die Tauglichkeit der Zentrifugen für diese Studie zu testen, wurde der mehrstufige Dichtegradient zur Isolierung der Mikroglia hergestellt (s. 3.2.10.2), wobei die 1,066 und

1,033 g/ml-Dichtestufen zuvor zur besseren Identifikation mit einem Tropfen Trypanblau (s. 3.1.2) angefärbt wurden. Die Zentrifuge wurde auf eine Anlaufzeit von 120 Sekunden und eine Auslaufzeit ohne Bremse programmiert und für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Dichtegradient beurteilt. Nur wenn dieser auch nach der Zentrifugation mit deutlich erkennbaren Phasengrenzen bestand, eignete sich die Zentrifuge für die Durchführung der Versuche in dieser Studie.

### **3.2.7 Impfung und Infektion mit Staupevirus und klinische Untersuchung der Versuchstiere**

15 Versuchstiere wurden im Alter von etwa 13 Wochen durch Injektion des Impfstoffs (s. 3.1.12) in den Musculus quadriceps femoris immunisiert. Die Impfung wurde nach vier Wochen wiederholt.

Vier Wochen nach der letzten Impfung wurden alle Tiere am 30. Juni 2000 im Alter von etwa fünf Monaten durch intravenöse Gabe von 0,2 ml einer virulenten A75/17-Staupevirus-Milzsuspension (s. 3.1.11) in die Vena saphena lateralis bzw. Vena cephalica antebrachii einer Belastungsinfektion (Challenge-Infektion) unterzogen (SCHREINER 2001). Die Tiere wurden täglich einer allgemeinen und einer neurologischen Untersuchung unterzogen. Zudem wurde routinemäßig zweimal wöchentlich eine hämatologische Untersuchung durchgeführt.

Bei Auftreten neurologischer Symptome der nicht-immunisierten Tiere (ab Tag 20 bis Tag 36 p.i.) bzw. hochgradiger Verschlechterung des Allgemeinzustands wurden die Tiere euthanasiert. Zwei Hunde der gleichen Würfe und folglich des gleichen Alters, die weder geimpft noch infiziert waren, wurden als Negativkontrolltiere herangezogen.

### **3.2.8 Euthanasie der Versuchstiere**

Den Hunden wurden zunächst etwa 12.000 IE Heparin (s. 3.1.2) in die Vena saphena lateralis bzw. Vena cephalica antebrachii injiziert, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern und die nachfolgende Perfusion des Gehirns zu ermöglichen. Nach wenigen Minuten war gewährleistet, dass sich das Medikament im Kreislauf verteilt hatte und die Tiere wurden durch intravenöse Gabe von Pentobarbiturat (s. 3.1.2) in Überdosis euthanasiert.

### **3.2.9 Histopathologische Untersuchung**

Im Anschluss an die Euthanasie wurden Gewebeprobe von allen Organen entnommen, in Paraformaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die daraus hergestellten Gewebeschnitte wurden nach Färbung mit Hämalaun-Eosin (HE-Färbung) histopathologisch beurteilt, immunhistochemisch wie von CHERPILLOD et al. (2000) beschrieben auf Viruspartikel untersucht und mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene der Mikroglia gefärbt. Die histopathologischen Untersuchungen führten Frau Dr. A. Gröne aus dem Institut für Tierpathologie sowie Frau Dr. R. Fatzer aus dem Institut für Tierneurologie der Universität Bern durch. Um Vergleiche zu den Untersuchungen an der Mikroglia ziehen zu können, wurde vor allem die Region Kleinhirn-Hirnstammbereich histopathologisch evaluiert.

### **3.2.10 Isolierung von Primärzellen**

#### **3.2.10.1 Entnahme des Gehirns**

Vor der eigentlichen Entnahme des Gehirns war dessen Perfusion unumgänglich, um das postmortale Auswandern von Blutzellen aus den Gefäßen in das Gehirngewebe und so eine Kontamination der zu isolierenden Mikrogliapopulation zu verhindern. Eine derartige Kontamination hätte die Trennung der Leukozyten von der Mikroglia mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation verhindert – beide (Leukozyten und Mikroglia) würden sich oberhalb derselben Dichten ansammeln.

Nach sorgfältiger Desinfektion der Bauchdecke mit 70 %igem Alkohol (s. 3.1.2) wurde der Bauchraum in der Linea alba bis zum Zwerchfell eröffnet. Parallel zum Sternum erfolgte die Durchtrennung der Rippen auf der rechten und auf der linken Seite des Brustkorbes, anschließend wurde der Zwerchfellspiegel von den Rippen gelöst und der Thorax durch Umklappen der ventralen Thoraxwand nach rostral geöffnet. Der Herzbeutel wurde an der Herzspitze vorsichtig eröffnet und bis zur Herzbasis aufgetrennt. In den Apex der linken Herzkammer wurde eine Kanüle eingeführt und bis zum Konus vorgeschoben. Ein Infusionsbesteck wurde zwischen Kanüle und Perfusionsflasche geschaltet. Die Perfusion erfolgte mit 1 Liter kalter Tutofusin-Lösung® (s. 3.1.3) pro Tier mit geringem Überdruck (Perfusionsflasche in ca. 2,20 m Höhe aufgehängt), wobei der große Kreislauf durch Aufsetzen einer Arterienklemme auf die Vena cava caudalis im Bereich kaudal der Leber ausgenommen

wurde. Um zu gewährleisten, dass die Perfusionsflüssigkeit den Blutkreislauf wieder verlassen konnte und zur Kontrolle der Perfusion, wurde die rechte Vorkammer eröffnet.

Zur Entnahme des perfundierten Gehirns wurde die Haut im Bereich der Schädelkalotte sorgfältig abpräpariert. Die Muskeln im Bereich der Schnittlinie waren zu entfernen. Anschließend wurde der Kopf im Bereich des 1. und 2. Halswirbels abgesetzt. Mit einer Zange (s. 3.1.1) wurde in das Foramen occipitale ventral des Rückenmarks eingegangen und ausgehend hiervon der Schädel bilateral symmetrisch erst bis zu den Ohren, dann in Richtung auf die Augen und schließlich bis zur Medianen des Nasenbeins aufgetrennt. Das Schädeldach konnte daraufhin abgehoben und das Gehirn nach Durchtrennen der Gehirnnerven vorsichtig entnommen werden. Das entnommene Gehirn wurde in ein auf Eis gelagertes Becherglas mit Hanks'-Lösung (s. 3.1.3) überführt.

### **3.2.10.2 Isolierung von Mikrogliazellen**

Die Gewinnung der Mikrogliazellen erfolgte nach dem Vorbild der Methode, wie sie im Institut für Virologie und Immunologie der Universität Würzburg bei PD Dr. Czub erlernt werden konnte. Die dort verwandte Technik erfolgte geringgradig modifiziert nach einer Methode von SEDGWICK et al. (1991). Für die Gewinnung der Mikrogliazellen des Hundes musste sie jedoch zunächst adaptiert werden. Das frisch entnommene Hundehirn wurde in Hanks'-Lösung aufgenommen und auf Eis gelagert. Für die weitere Untersuchung wurden 10 bis 15 g Material aus dem Bereich um den vierten Ventrikel verwendet (s. Abb. 4). Von diesem Hirnbereich wurden zunächst mit Hilfe zweier Pinzetten die Meningen sorgfältig entfernt. Anschließend wurde das Hirnmaterial in Hanks'-Lösung durch ein Stahlsieb (s. 3.1.1) vorsichtig in eine Petrischale gerieben und somit dissoziiert. Das dissoziierte Material wurde mit einer Pipette gesammelt und in 50 ml-Röhrchen (s. 3.1.1) mit Hanks'-Lösung aufgefüllt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei einer Temperatur von 4 °C (170 x g für 10 min) wurde der Überstand dekantiert und der Gewebepulver mit ca. 15 ml Collagenase-DNase-Puffer (s. 3.1.3) versetzt, um noch vorhandene Gewebstückchen enzymatisch aufzutrennen. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37 °C für 60 Minuten. Dabei wurde die Zellsuspension von Zeit zu Zeit aufgeschüttelt. Nach abgeschlossener Inkubation wurde die Suspension zu 50 ml mit Hanks'-Lösung aufgefüllt und 10 min bei 20 °C und 300 x g zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen und der Waschschrift wiederholt.

Nach diesem mechanischen und enzymatischen Aufschluss erfolgte die Aufreinigung über einen Perkoll®-Dichtegradienten. Dazu wurde Perkoll® (s. 3.1.4) mit 1,5 M NaCl-Lösung (s. 3.1.2) im Verhältnis 1:10 in eine isotone Lösung gebracht. Diese Ausgangslösung besitzt eine Dichte von 1,124 g/ml.

Die für den Dichtegradienten zusätzlich benötigten Dichten von 1,077, 1,066, 1,050 und 1,030 g/ml Perkoll® wurden durch Zugabe von Hanks'-Lösung entsprechend folgender Formel der Vertriebsfirma (s. 3.1.4) hergestellt:

$$V_0 = V \times \frac{r - 0,1 \times r_0 - 0,9}{r_0 - 1}$$

wobei

$V_0$  benötigtes Volumen Perkoll® in ml

$V$  gewünschtes Endvolumen der Arbeitslösung in ml

$r$  gewünschte Dichte der Arbeitslösung in g/ml

$r_0$  Dichte des Perkoll® (hier: 1,124 g/ml)

$r_1$  Dichte der Hanks'-Lösung (1,0046 g/ml)

entspricht. Im Anschluss an die Herstellung wurde die Exaktheit der Dichten mit Hilfe eines Refraktometers (s. 3.1.1) kontrolliert.

Die Gewebesuspension wurde in einem 50 ml-Röhrchen mit Perkoll® der Dichte 1,030 g/ml auf 45 ml aufgefüllt und mit 5 ml Perkoll® der Dichte 1,124 g/ml unterschichtet. Dieser **Dichtevorgradient** wurde mit 1.250 x g bei einer Anlaufzeit von 120 Sekunden und Auslaufzeit ohne Bremse bei Raumtemperatur für 25 Minuten zentrifugiert. Während dieses Vorgangs sanken die Zellen durch die 1,030-Dichtestufe ab und sammelten sich oberhalb der 1,124-Dichtestufe an, wohingegen Myelin und Zelldebris aufstiegen und sich an der Oberfläche des Dichtevorgradienten ansammelten. Diese Myelin- und Zelldebrisschicht wurde nach der Zentrifugation abgenommen und verworfen, die Zellen oberhalb der 1,124-Dichtestufe wurden mit einer 10 ml-Pipette gesammelt und in einem neuen Röhrchen mit Hanks'-Lösung auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Zentrifugation mit 170 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur, um die Zellen von Perkoll® zu befreien. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml Hanks'-Lösung aufgenommen.

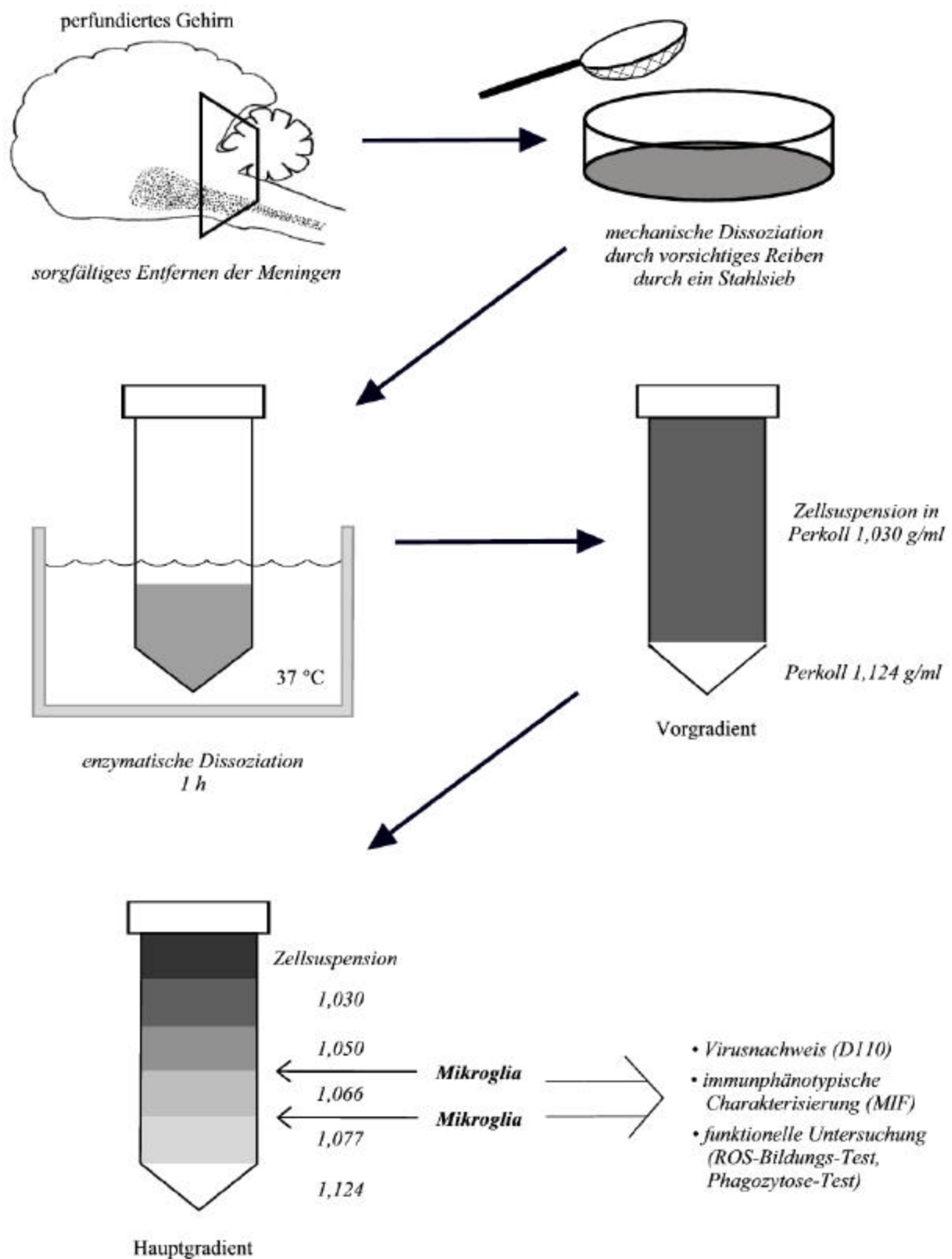


Abb. 4: Isolation von Mikrogliazellen aus Hundehirnmaterial

Um die Mikrogliazellen von den anderen in der Suspension befindlichen Zellen zu trennen, wurde das vorgereinigte Zellgemisch auf einen **mehrstufigen Dichtehauptgradienten** aufgetragen. Dazu wurden zunächst 5 ml der Dichte 1,124 g/ml vorgelegt. Es folgten

- 12 ml der Dichte 1,077,
- 12 ml der Dichte 1,066,
- 8 ml der Dichte 1,050 und
- 8 ml der Dichte 1,030 g/ml,

die in einem 50 ml-Röhrchen vorsichtig aufeinander pipettiert wurden. Auf diesen vierstufigen Gradienten wurde die Zellsuspension aufgegeben. Der Dichtehauptgradient wurde entsprechend dem Vorgradienten bei Raumtemperatur für 25 Minuten bei 1.250 x g mit einer Anlaufzeit von 120 Sekunden und Auslaufzeit ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation sammelten sich die Mikrogliazellen oberhalb spezifischer Banden an und konnten mit einer Pipette abgenommen werden. Im Anschluss an einen Waschschrift mit Hanks'-Lösung wurden die Mikrogliazellen gezählt und standen dann für die weitere Untersuchung zur Verfügung (s. Abb. 4).

### **3.2.11 Färbung der Zelloberfläche bzw. indirekte Membranimmunfluoreszenz zur immunphänotypischen Charakterisierung der Mikroglia**

Die Färbung der Zelloberfläche erfolgte in analoger Weise wie in 3.2.3 für PBMCs beschrieben. Die isolierten Mikrogliazellen wurden zunächst gezählt (s. 3.2.2) und für jede Immunfärbung auf  $2 \times 10^5$  Zellen eingestellt. Die Zellen wurden zunächst mit 10 mg/ml humanem IgG (s. 3.1.6) absorbiert, um die unspezifischen Bindungsstellen (Fc-Rezeptoren) zu blockieren. Anschließend erfolgte die Zugabe der primären Differenzierungsantikörper gegen Oberflächenantigene der Mikrogliazellen (s. 3.1.6) in der durch Verdünnungsreihen in Vorversuchen ermittelten optimalen Konzentration (s. Tab. 3). Die Mikrogliazellen wurden auf die Expression von CD11b, CD11c, CD11d (alpha d), CD18, CD14, CD45, CD44, CD3, CD4, CD8 $\alpha$ , CD21, CD1c, 1D11, ICAM-1, B7-1, B7-2, MHC I und II untersucht. Für die 30-minütige Inkubation wurden die Zellen bei 4 °C gelagert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l MIF-Puffer (s. 3.1.3) resuspendiert und bei 4 °C zwei Minuten mit 300 x g zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde der sekundäre PE- oder Streptavidin-FITC-konjugierte Antikörper (s. 3.1.6) zugegeben und

wiederum für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschvorgang – analog dem Waschvorgang nach Zugabe des primären Antikörpers – wurde das Pellet in 200 bis 400 µl FACSFlow® (s. 3.1.9) aufgenommen und bis zur Analyse im FACSCalibur™ (s. 3.1.1) auf Eis gelagert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Cell-Quest®-Software für Apple&Macintosh®-Computer.

### **3.2.12 Nachweis des Staupevirus in Mikrogliazellen**

Zum Nachweis des Staupevirus kam der monoklonale Antikörper D110 (s. 3.1.6) zum Einsatz. Dieser Antikörper bindet an ein Epitop des Nukleokapsid-Proteins des Virus und ist resistent gegen Fixations- und Einbettungsmethoden (BOLLO et al. 1986). Für die Färbung wurden die isolierten Mikrogliazellen in 200 µl PBS resuspendiert und anschließend in der gleichen Menge 4 %igen Paraformaldehyds (s. 3.1.2; Endkonzentration: 2 %) für 20 min bei 4 °C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl PBS (2200 rpm, 2 min, 4 °C) wurden die Zellen in 50 µl einer PBS-Saponin-Lösung (0,03 %ig, s. 3.1.2) permeabilisiert, um das Nukleokapsid-Protein zu demaskieren. Durch Zugabe von 10 mg/ml HuIgG wurden die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Im Anschluss daran wurden 10 µl des monoklonalen Antikörpers D110 in einer Verdünnung von 1:16 pro Ansatz hinzupipettiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf des Inkubationsschritts wurde zweimal mit PBS-Saponin-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde der sekundäre R-Phycoerythrin-konjugierte Antikörper (s. 3.1.6) hinzugegeben, der in einer Verdünnung von 1:50 mit PBS-Saponin-Lösung verwendet wurde. Inkubiert wurde wiederum für 30 min bei 4 °C und es schloss sich ein Waschschriff mit PBS-Saponin-Lösung (s.o.) an. Des Weiteren wurden 200 µl FACSFlow® (s. 3.1.9) hinzupipettiert und in der Durchflusszytometrie gemessen. Als Negativkontrollen dienten Versuchsansätze, bei denen lediglich der sekundäre Antikörper hinzupipettiert wurde. Die auf diese Weise gewonnenen Daten wurden mittels des Cell-Quest®-Analyseprogramms für Apple&Macintosh®-Computer ausgewertet.

### **3.2.13 Mikrogliazellen-Funktionstests**

#### **3.2.13.1 Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten**

**(ROS = reactive oxygen species)**

Die Durchführung des ROS-Bildungs-Tests für Mikrogliazellen erfolgte in analoger Weise wie für die neutrophilen Granulozyten beschrieben (s. 3.2.4.1). Als Untersuchungsmaterial wurden die separierten Mikrogliazellen verwendet, von denen  $2 \times 10^5$  Zellen pro well verwendet wurden. Vier verschiedene Trigger wurden eingesetzt: PMA in einer Endkonzentration von 100 nmol/l, PMA in einer Endkonzentration von 50 nmol/l in Kombination mit Ca-Ionophor A 23187 in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ mol/l und LPS in einer Endkonzentration von 10  $\mu$ g/ml. Die alleinige Zugabe von PBS zu der Zellsuspension im vierten Ansatz diente als Negativkontrolle. Für jeden Trigger wurden drei Versuchsansätze (Triplikate) durchgeführt, um eventuelle Schwankungen der Ergebnisse zu evaluieren bzw. auszugleichen.

In Anschluss an die Inkubationsschritte wurde die Zellsuspension in 100  $\mu$ l FACSFlow® aufgenommen. Innerhalb der nächsten 15 Minuten wurde die Untersuchung in der Durchflusszytometrie vorgenommen und die gewonnenen Daten mit dem Cell-Quest®-Analysenprogramm ausgewertet.

#### **3.2.13.2 Phagozytose-Test**

Der Phagozytose-Test wurde in gleicher Weise durchgeführt wie bei der Untersuchung der neutrophilen Granulozyten beschrieben (s. 3.2.4.2). Das Prinzip des Phagozytose-Tests ist, dass FITC-markierte Bakterien (grünfluoreszierend = F11) mittels eines Poolserums opsonisiert und von Mikrogliazellen phagozytiert werden. Phagozytose-positive Mikrogliazellen sind aufgrund ihrer erhöhten Grünfluoreszenz von Phagozytose-negativen zu unterscheiden.

Als Untersuchungsmaterial wurden die separierten Mikrogliazellen verwendet, als Phagozytosepartikel dienten FITC-markierte Staphylococcus aureus (s. 3.1.8).

Im Anschluss an die entsprechenden Inkubationsschritte wurde die Zellsuspension in 100  $\mu$ l FACSFlow® aufgenommen. Innerhalb der nächsten 15 Minuten erfolgte die Messung in der

Durchflusszytometrie. Für jeden Versuchsansatz wurden drei parallele Messungen vorgenommen (= Triplikate), um durch Schwankungen hervorgerufene Ergebnisverfälschungen mit Hilfe des arithmetischen Mittelwertes zu minimieren.

### **3.2.14 Auswertung der Versuchsergebnisse nach Gruppen**

Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte basierend auf der pathomorphologischen bzw. pathohistologischen Beurteilung des ZNS und der daraus folgenden Unterscheidung von genesenen Hunden, die im Rahmen der Challengeinfektion virusinfiziert waren, jedoch keine Demyelinisierung und lediglich vereinzelte Mikrogliaknötchen – wie bei TIPOLD et al. (1999) beschrieben – aufwiesen (Gruppe I), und Hunden mit staupetypischen Läsionen mit Demyelinisierung (Gruppe II) aufgrund der Staupeinfektion. Als Negativkontrolle dienten zwei zusätzliche Hunde, die nicht an dem Challenge-Versuch teilgenommen hatten. Das ZNS dieser Hunde, die aus den gleichen Würfen stammten und folglich das gleiche Alter aufwiesen wie die Hunde des Challenge-Versuchs, wies keine Abweichungen von der physiologischen Norm auf.

### **3.2.15 Statistische Auswertungsverfahren**

Die statistische Auswertung der während des Vakzine-Versuchs in der Durchflusszytometrie erhobenen Messwerte wurde mit der „STATeasy 2001“-Software für Windows (s. 3.1.10) durchgeführt. Dabei wurden die Ergebnisse der Hunde aller drei Gruppen (Negativkontrolle, Gruppe I und Gruppe II) verglichen. Berücksichtigung fanden hierbei sowohl der prozentuale Anteil positiver Zellen in Bezug auf die untersuchten Merkmale als auch die mittlere Fluoreszenzintensität als relatives Maß der Intensität der Ausprägung der o.g. Merkmale. Für die mittlere Fluoreszenzintensität wurde bei einer Normalverteilung der Ergebnisse der arithmetische Mittelwert berechnet, lag keine Normalverteilung vor, wurde der geometrische Mittelwert herangezogen. Zur Analyse der Unterschiede zweier Datengruppen in der Ausprägung eines Merkmals (z. B. CD45-positive Mikrogliazellen) wurde wegen nicht normal-verteilter Wertegruppen der Mann-Whitney-U-Test (Rangsummen-Test) verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für die statistische Signifikanz wurde als p-Wert in Klammern genannt.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Methodische Vorarbeiten**

Während der Vorarbeiten im Labor der Klinik für kleine Haustiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover wurden die Voraussetzungen und Bedingungen für die Isolierung der Mikroglia beim Hund festgelegt und die Methode etabliert. Dabei mussten die Dichten zur Isolierung (s. 4.1.9.2) und die Möglichkeiten zur Identifizierung caniner Mikroglia (s. 4.1.9.1) definiert werden. Als Voraussetzung für die Charakterisierung der Mikroglia wurden die Antikörper an PBMCs des Hundes getestet (4.1.1) und deren optimale Verdünnung ermittelt (4.1.2). Die Trigger für die Untersuchung der ROS-Bildung sowie die Bakterien und deren Verdünnung für den Phagozytose-Test der Mikroglia wurden an neutrophilen Granulozyten erprobt (s. 4.1.4 bis 4.1.7), da diese funktionelle Gemeinsamkeiten mit den Mikrogliazellen aufweisen (PERRY u. GORDON 1991; STOLL u. JANDER 1999) und die Mikroglia nur in begrenzter Menge zur Verfügung stand.

#### **4.1.1 Auswahl der in der Durchflusszytometrie einsetzbaren Antikörper für die immunphänotypische Charakterisierung caniner Mikrogliazellen und Monozyten**

Die Antikörper zur immunphänotypischen Charakterisierung der caninen Mikroglia wurden zunächst an mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) und anschließend für die MIF der Mikroglia des Hundes getestet.

Es kamen Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD18, CD11b, CD11c, alpha d, CD14, CD45, CD44, CD1c, 1D11, ICAM-1, B7-1, B7-2, CD3, CD4, CD8 $\alpha$ , CD21, MHC I und II zum Einsatz (s. 3.1.6 u. 3.2.11), die sich in der Messung mit dem FACS als geeignet erwiesen.

#### **4.1.2 Einstellen der optimalen Verdünnung der Antikörper zur indirekten Membranimmunfluoreszenz an PBMCs und der Mikroglia**

Um die geeignetsten Konzentrationen der Antikörper für die Studie feststellen zu können, wurden für die Färbungen der PBMCs unterschiedliche Mengen an Antikörper eingesetzt, durchflusszytometrisch gemessen und anschließend die Ergebnisse für die einzelnen Konzentrationen verglichen. Die Konzentrationen mit den besten Ergebnissen für die PBMCs wurden anschließend auch für die Färbung der Mikroglia getestet und wiesen auch hier sehr gute Resultate auf.

##### **4.1.2.1 Primäre Antikörper**

Bei der Bestimmung der optimalen Konzentration zeigte sich, dass für die Mehrzahl der primären Antikörper eine Verdünnung von 1:5 die besten Ergebnisse lieferte, während für den MHC I der Einsatz einer Verdünnung von 1:17, für antiCD45 und antiCD44 von 1:11 und für antiCD14 von 1:8 vorzuziehen war bzw. ausreichte (s. Tab. 3 u. 3.1.6).

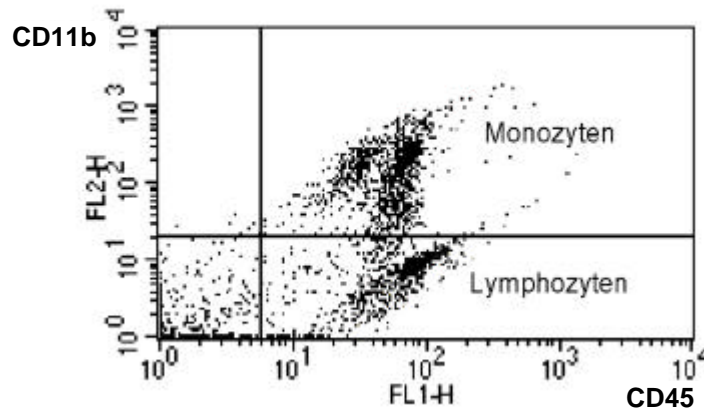
##### **4.1.2.2 Sekundäre Antikörper**

Für die drei sekundären Antikörper  $\gamma\alpha$ m-PE, r $\alpha$ r-PE und mit Streptavidin konjugiertes Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) erwies sich eine Verdünnung von 1:100 als optimal für die durchflusszytometrische Messung (s. 3.1.6). Beim monoklonalen primären Antikörper D110 wurde eine Verdünnung des sekundären Antikörpers  $\gamma\alpha$ m-PE von 1:50 benötigt.

#### **4.1.3 Test der Doppelfärbungen an PBMCs und Mikroglia**

Zur Identifizierung der Mikroglia sollte eine Doppelfärbung von CD11b und CD11c mit CD 45 vorgenommen werden (SEDGWICK et al. 1991). Um eine sterische Behinderung der Färbung bei gleichzeitiger Zugabe beider primärer Antikörper (d. h. CD11b und CD45 bzw. CD 11c und CD45) und anschließend beider sekundärer Antikörper ( $\gamma\alpha$ m-PE und Streptavidin-konjugiertes Fluorescein-Isothiocyanat) auszuschließen, wurden die Antikörper zusätzlich in einem separaten Ansatz einzeln zugegeben, in der Durchflusszytometrie gemessen und anschließend die Ergebnisse verglichen. Diese Tests erfolgten sowohl für PBMCs als auch für die Mikroglia.

Als Resultat ergab sich bei gleichzeitiger Applikation der eingesetzten primären und sekundären Antikörper keine Beeinträchtigung der Färbereigenschaften.



**Abb. 5: Doppelfärbung der PBMCs mit den Antikörpern gegen CD11b und CD45**  
Monozyten zeigen eine deutliche Expression beider Antigene, während Lymphozyten keine Expression von CD11b aufweisen.

Anhand ihrer Anfärbeeigenschaften mit den beiden Antikörpern lassen sich zwei Zellpopulationen unterscheiden. Im rechten oberen Quadranten befindet sich die Zellpopulation, die beide Antigene exprimiert, im rechten unteren Quadranten die lediglich CD45-positive Zellpopulation.

#### 4.1.4 Vergleich und Auswahl der als Trigger einsetzbaren Agenzien für die Bestimmung der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten an neutrophilen Granulozyten

Als Trigger der Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten wurden PMA, PMA in Kombination mit dem Ca-Ionophor A 23187 und schließlich LPS verwendet, da sie als Induktoren der ROS-Bildung bei Makrophagen gelten (RUULS et al. 1995; TIPOLD et al. 1998). Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurden die o.g. Agenzien an neutrophilen Granulozyten des Hundes getestet.

#### 4.1.5 Ermittlung der optimalen Konzentration der eingesetzten Trigger an neutrophilen Granulozyten

Zunächst wurde die optimale Konzentration des PMA an neutrophilen Granulozyten ermittelt. Die ROS-Bildung der neutrophilen Granulozyten wurde durchflusszytometrisch gemessen

und die Ergebnisse anschließend verglichen. Die beste Triggerung der neutrophilen Granulozyten wurde mit PMA in einer Endkonzentration von 100 nmol/l ermittelt.

In der Kombination mit Ca-Ionophor A 23187 wurde für PMA mit Verdünnungen von 100, 50 und 10 nmol/l die Effektivität als Trigger an neutrophilen Granulozyten getestet. Dabei wurde Ca-Ionophor A 23187 jeweils in einer Endverdünnung von 10, 1, 0,5 und 0,25 µmol hinzugegeben. In der Durchflusszytometrie erwies sich nach Vergleich der jeweils als Triplikate angesetzten Proben eine Konzentration von 50 nmol/l PMA mit 0,5 µmol/l Ca-Ionophor A 23187 als beste Kombination der Trigger für die neutrophilen Granulozyten.

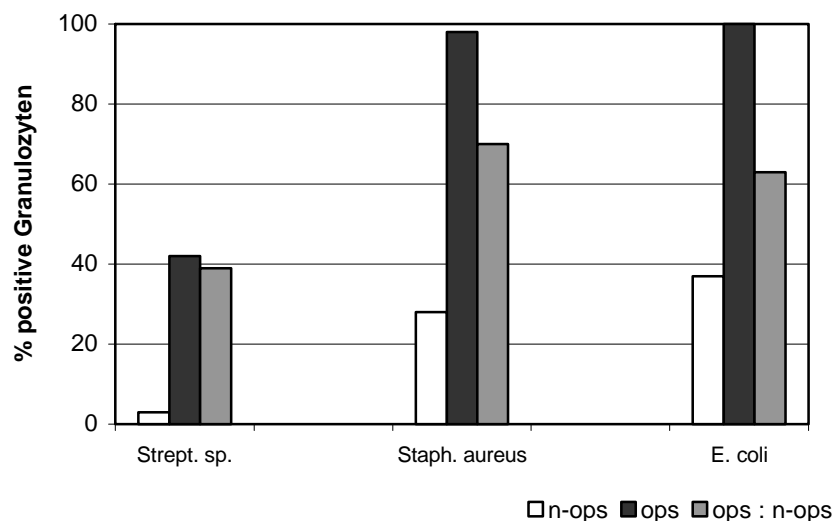
Entsprechend der oben genannten Methode wurde auch LPS in einer Konzentration von 10 und 1 µg/ml im dreifachen Ansatz als Trigger getestet. Eine Konzentration von 10 µg/ml erwies sich hierbei als effektivste Verdünnung zur Triggerung der neutrophilen Granulozyten.

Die für die neutrophilen Granulozyten ermittelten optimalen Konzentrationen der Trigger wurden wegen der funktionellen Gemeinsamkeiten auch für die Untersuchung der ROS-Bildung der caninen Mikroglia zugrunde gelegt.

#### **4.1.6 Vergleich und Auswahl der als Phagozytosepartikel einsetzbaren Bakterien anhand der Ergebnisse mit neutrophilen Granulozyten**

Als Phagozytosepartikel wurden hitzeinaktivierte *Streptococcus* sp., *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*, die jeweils an Fluorescein konjugiert waren, anhand dreifacher Versuchsansätze mit neutrophilen Granulozyten ausgetestet.

Als Resultat entfalteten die neutrophilen Granulozyten bei den Fluorescein-konjugierten *Escherichia coli* die stärkste Phagozytoseaktivität. *Staphylococcus aureus* wiesen keine wesentlich geringere Phagozytoserate auf, jedoch war hier der Unterschied zwischen opsonisierten (ops) und nicht-opsonisierten (n-ops) Bakterien deutlicher ausgeprägt (s. Abb. 6). Da *Escherichia coli* zudem eine starke Neigung aufwiesen, zu Klumpen zu aggregieren, die im Ultraschall nur schwer zu lösen waren, wurden als Phagozytosepartikel für den Hauptversuch mit Mikrogliazellen die Fluorescein-konjugierten *Staphylococcus aureus* gewählt.



**Abb. 6:** Vergleich der Phagozytoseraten neutrophiler Granulozyten bei Zugabe von *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*

Der erste Balken zeigt die Phagozytoseraten für jeweils nicht-opsonisierte (n-ops), und der zweite für opsonisierte Bakterien (ops). Der dritte Balken stellt die Differenz zwischen den Phagozytoseraten für jeweils opsonisierte und nicht-opsonisierte Bakterien dar.

#### 4.1.7 Ermittlung der optimalen Konzentration der eingesetzten Bakterien

Zur Ermittlung der optimalen Konzentration wurden die drei Bakterienarten der Granulozytensuspension in verschiedenen Verdünnungen von 10:1 bis zu 200:1 Bakterien pro neutrophilem Granulozyten zugegeben. Die Messung in der Durchflusszytometrie ergab die besten Resultate für das Verhältnis von circa 100 Bakterien pro neutrophilem Granulozyten.

#### 4.1.8 Auswahl der verwendeten Zentrifugen

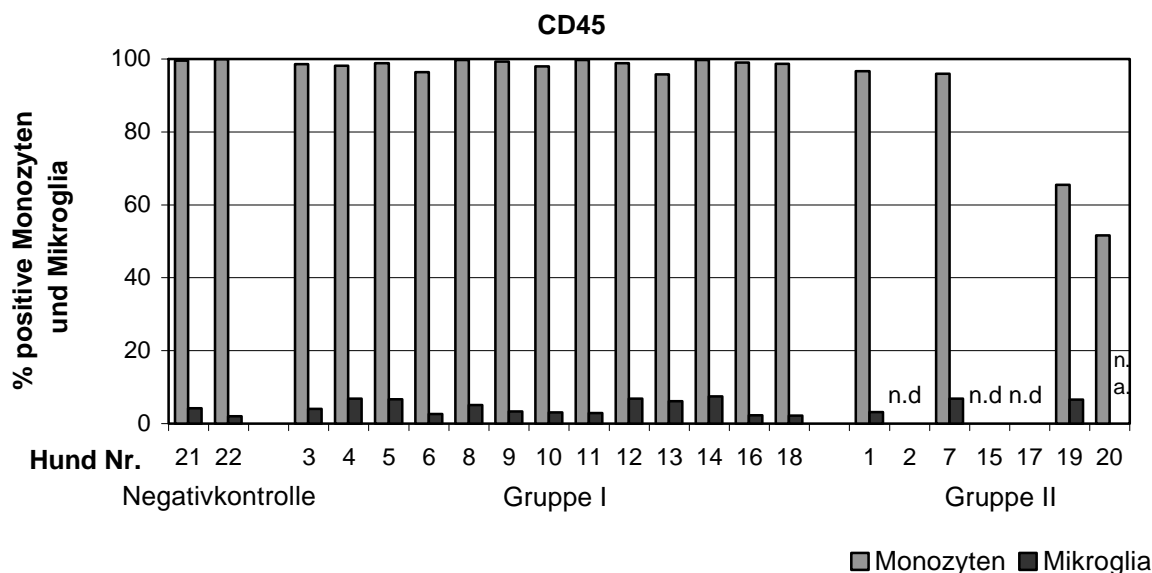
Während der Vorversuche stellten sich die beiden Tischzentrifugen „Rotina 35R“ und „Rotanta RP“ der Firma Hettich aus Tuttlingen (s. 3.1.1) als geeignet heraus. Mit diesen Zentrifugen war es möglich, die Anlaufzeit zu programmieren und die Bremse beim Auslaufen des Rotors nach der Zentrifugation abzuschalten. Der Dichtegradient für die Mikroglia-Isolation wies nach Zentrifugation deutlich erkennbare und scharfe Phasengrenzen zwischen den verschiedenen Dichten auf, was zudem für eine sehr ruhige Laufweise ohne größere Vibrationen sprach (vgl. 3.2.6). Aufgrund dieser Resultate wurden die genannten Zentrifugen für die Durchführung der Versuche verwendet.

#### 4.1.9 Identifizierung caniner Mikroglia und Ermittlung der zu verwendenden Dichten für die Isolation

Zur Ermittlung der für die Isolation caniner Mikroglia zu verwendenden Dichten wurden die in der Literatur angegebenen Dichtegradienten für die Mikroglia-Isolation anderer Spezies (SEDGWICK et al. 1991; FORD et al. 1995; HANSEN 1999) beim Hund getestet. Die jeweils oberhalb der Dichten gewonnenen Zellen wurden mittels indirekter Membranimmunfluoreszenz gegen Mikroglia-spezifische Oberflächenantigene gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

##### 4.1.9.1 Identifizierung der Mikroglia

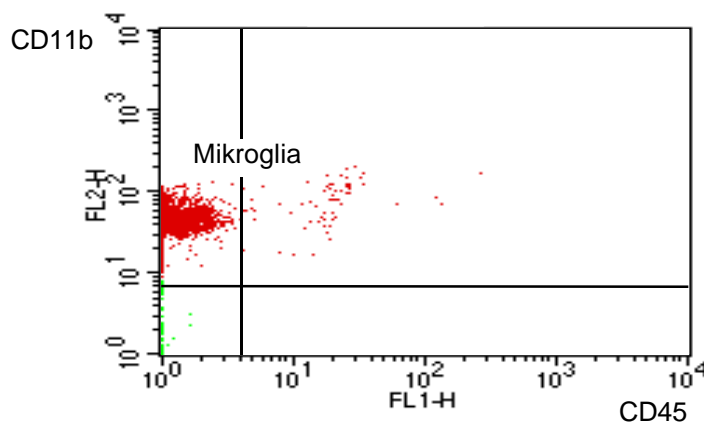
Die Identifizierung der Mikroglia sollte auf der Basis verschiedener Parameter in der Durchflusszytometrie erfolgen. Dazu zählten Größe (FSC), Granularität (SSC) und die Expression von Oberflächenmolekülen mittels indirekter Membranimmunfluoreszenz. In der Literatur wird die phänotypische Expression von CD11b/c<sup>+</sup> und CD45<sup>low</sup> als Merkmal beschrieben, um Mikrogliazellen spezifisch zu identifizieren (FORD et al. 1995). Es lag nahe, dass sich Mikroglia vom Hund auf dieselbe Art definieren lässt, daher wurde die relative Expression von CD11b/c und CD45 parallel in zwei verschiedenen Fluoreszenzkanälen gemessen.



**Abb. 7: Expression von CD45 auf Monozyten im Vergleich zur Expression auf Mikroglia**  
Für Hd. 2, 15 und 17 wurden keine Werte ermittelt (n.d. = nicht durchgeführt), bei Hd. 20 war eine Auswertung der Daten für die Mikroglia nicht möglich (n.a. = nicht auswertbar).

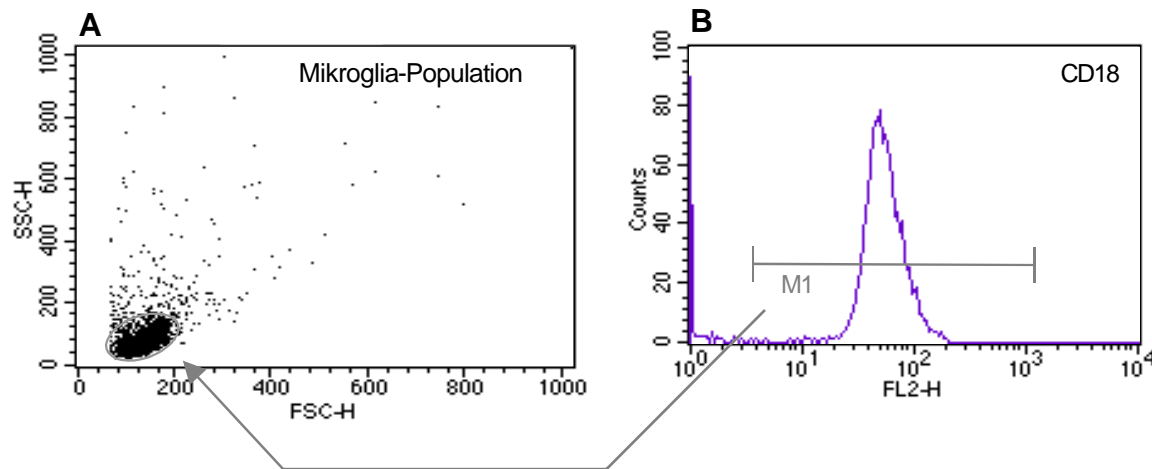
Anhand dieses Phänotyps ist zudem eine eindeutige Unterscheidung zu ZNS-assoziierten Makrophagen möglich, die sich bei der Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation oberhalb derselben Dichte ansammeln wie die Mikroglia. Die Makrophagen zeigen wie die Mikroglia einen CD11b/c<sup>+</sup>-Phänotyp, jedoch sind sie im Gegensatz zur Mikroglia CD45<sup>high</sup> (SEDGWICK et al. 1991; FORD et al. 1995).

Die in dieser Studie separierten Zellen zeigten neben einer deutlichen Expression von CD11b/c jedoch nur eine sehr geringe Expression von CD45 (s. Abb. 7 u. 8). Somit ergibt sich beim Hund eine Abweichung in Bezug auf den in der Literatur beschriebenen Phänotyp der Mikroglia.



**Abb. 8:** Ergebnis der Doppelfärbung caniner Mikrogliazellen mit CD11b und CD45. Canine Mikrogliazellen ex vivo zeigen eine deutliche Expression von CD11b, während die Expression von CD45 nur sehr gering war.

Aufgrund dessen wurden alternative phänotypische Charakteristika zur Identifizierung caniner Mikroglia herangezogen. Da CD18 in immunhistochemischen Untersuchungen Mikroglia im nicht entzündlich veränderten Gehirngewebe gut darstellt, wurden die CD18-positiven Zellen der gesamten Zellausbeute oberhalb jeder Dichte in der Darstellung als Histogramm in ein gate eingefasst (s. Abb. 9B). Die derart gekennzeichneten Zellen wurden in der Darstellung der Zellpopulation als Dot Plot mit den Parametern Größe (FSC) und Granularität (SSC) zurückverfolgt und farbig dargestellt (s. Abb. 9A). Die farbig dokumentierten und somit CD18-positiven Zellen wurden in dieser Darstellung erneut und möglichst exakt in ein zweites gate eingefasst. Lediglich die Zellen innerhalb dieses gates fanden für die weitere Auswertung der Membranimmunfluoreszenz Berücksichtigung.

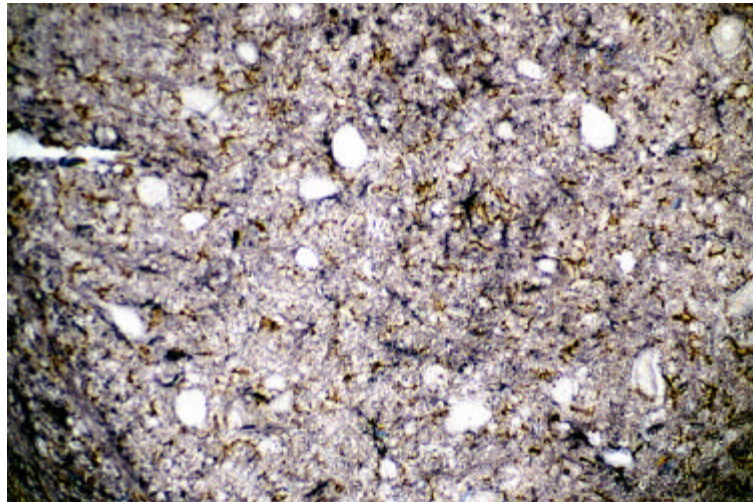


**Abb. 9:** Darstellung der Mikroglia-Population als Dot Plot mit den Merkmalen Größe (FSC) und Granularität (SSC) (A) bzw. CD18-positive Zellen in der Darstellung als Histogramm (B)  
Die CD18-positiven Zellen im Histogramm wurden in der Darstellung als Dot Plot farbig dargestellt und in ein gate eingefasst. Die Zellen innerhalb dieses gates fanden für die weitere Auswertung der MIF Berücksichtigung.

Es zeigte sich, dass diese Zellen einen CD11b/c<sup>+</sup>-Phänotyp aufwiesen und sich als homogene Population relativ kleiner Zellen darstellten (s. Abb. 9A), was in Übereinstimmung mit anderen Beschreibungen der Mikroglia steht (FORD et al. 1995).

Immunhistochemisch (s. 3.2.9) wurden die durchflusszytometrischen Ergebnisse der indirekten MIF bestätigt, da die Mikroglia mit typischer Morphologie identische Anfärbereigenschaften wie in der Durchflusszytometrie aufwies. Die Mikroglia zeigte auch ex vivo die bereits für die Immunhistochemie beschriebene (AKIYAMA u. MCGEAR 1990; TIPOLD et al. 1999) deutliche Anfärbung der exprimierten Antigene CD18, CD11b und CD11c.

Zellen, die die oben genannten Merkmale aufwiesen, wurden als Mikroglia identifiziert.



**Abb. 10:** Gehirnschnitt nach Färbung mit dem Antikörper gegen CD18 und gegen saures Gliafaserprotein (GFAP = glial fibrillary acidic protein)  
Hund, Hundestaupe, akut. Schnitt im Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels.  
Eine akute Staupeläsion mit Demyelinisierung ist zu sehen. Die braun gefärbten „verzweigten“ Zellen sind CD18-positive Mikrogliazellen (Färbung: Peroxidase-Antiperoxidase; Farbreaktion durch Diaminobenzidin). Die violett gefärbten Zellen sind GFAP-positive Astrozyten (Färbung: antiGFAP, Phosphatase-konjugiert; Farbreaktion durch Nitroblue Tetrazolium und X-Phosphat); x 100. Diese Färbung wurde von Frau Prof. Tipold aus einer früheren Studie zur Verfügung gestellt (TIPOLD et al. 1999).

#### **4.1.9.2 Modifikationen von Vor- und Hauptgradient und Definition der Dichten, oberhalb derer sich die Mikroglia spezifisch ansammelt**

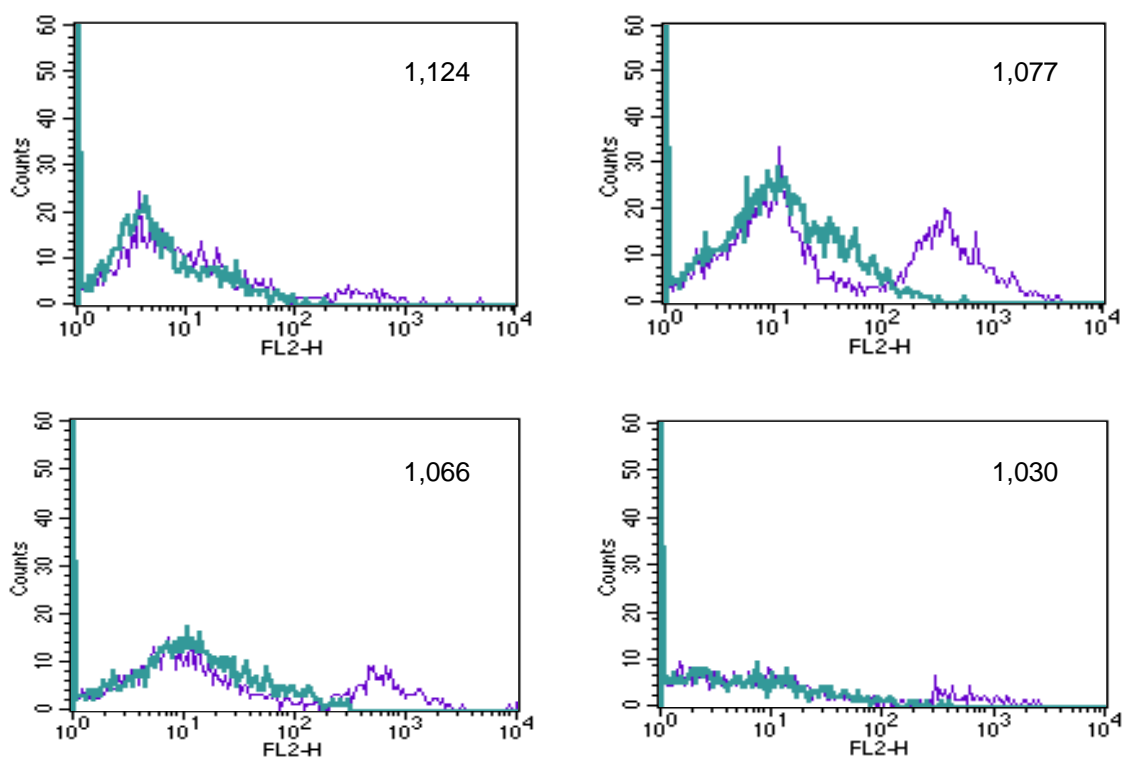
Die canine Mikroglia sollte durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden. Der **Vorgradient** wurde in Anlehnung an andere Spezies getestet. Dabei wurden die enzymatisch aufgetrennten Gehirnzellen in Percoll® der Dichte 1,030 g/ml zunächst suspendiert und anschließend in einem Ansatz mit 1,088 g/ml bzw. einem mit 1,124 g/ml Percoll® unterschichtet. Für den Ansatz mit der Dichte 1,088 g/ml zeigte sich nach der Zentrifugation, dass viele Zellen durch die Dichte (1,088 g/ml) hindurchgewandert waren. Die Zellausbeute oberhalb dieser Dichte war nur sehr gering und erwies sich nach durchflusszytometrischer Messung nicht als Mikroglia (s. 4.1.9.1).

Bei Verwendung der Dichten 1,124 und 1,030 g/ml Percoll® sammelten sich viele Zellen oberhalb der Bande von 1,124 g/ml Percoll® an. Durchflusszytometrisch konnte jedoch nur ein geringer Bruchteil der Zellen mittels Membranimmunfluoreszenz als Mikroglia

identifiziert werden. Zur exakten Differenzierung war es daher nötig, die Zellen anschließend über einen Hauptgradienten zu trennen.

Um die Ausbeute bei der Gewinnung caniner Mikrogliazellen zu erhöhen, wurde eine weitere Modifikation des Vorgradienten versucht, die allerdings zu keiner Verbesserung der Technik führte: Hierzu wurden die Zellen nach der enzymatischen Verdauung nicht in der 1,030 g/ml-Dichtestufe suspendiert, sondern in die 1,124 g/ml-Dichte aufgenommen, woraufhin die 1,030 g/ml-Dichtestufe aufpipettiert wurde. Nach der Zentrifugation befanden sich jedoch nur sehr wenige Zellen in der Interphase zwischen den beiden Dichten, die durchflusszytometrisch zudem nur in geringem Maße als Mikroglia bestimmt werden konnten.

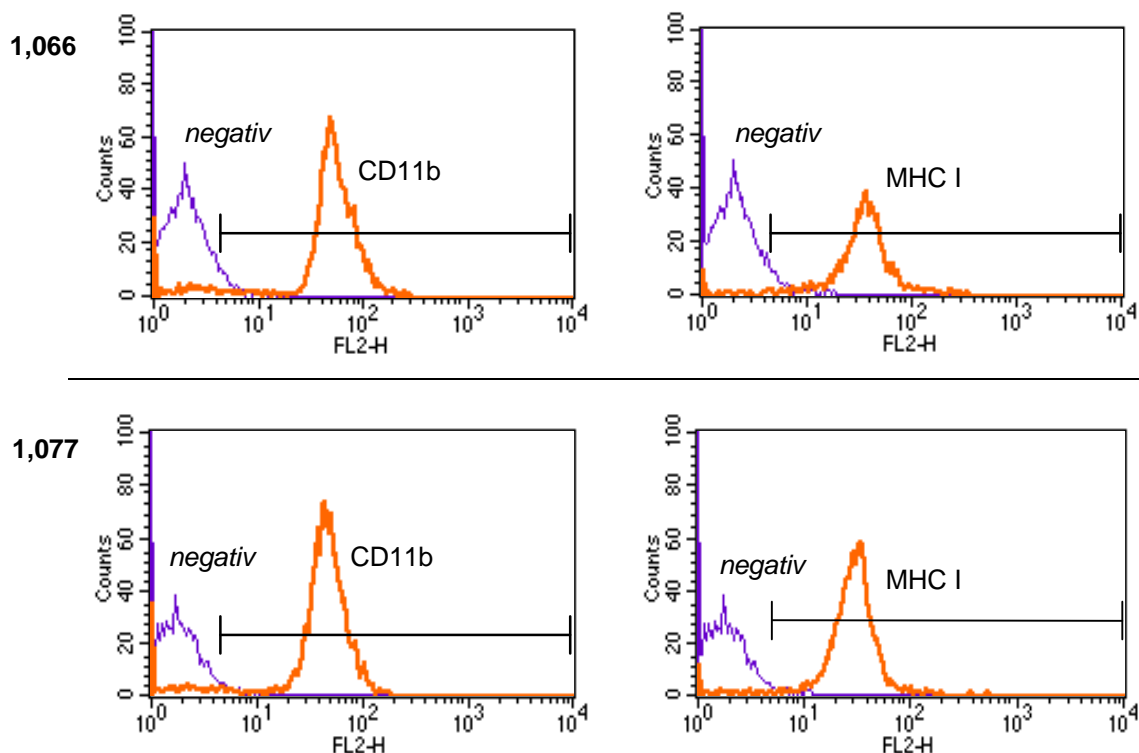
Der Vorgradient mit den Dichten 1,030 und 1,124 g/ml Percoll® lieferte die größten Zellausbeuten und wurde daher als erster Schritt der Mikroglia-Isolation verwendet. Die Zellen, die nach Zentrifugation des Vorgradienten oberhalb der Dichte 1,124 g/ml Percoll gewonnen wurden, wurden für die Zentrifugation im Hauptgradienten verwendet.



**Abb. 11:** Resultate der Färbung der isolierten Zellen oberhalb der Dichten 1,124, 1,077, 1,066 und 1,030 g/ml Percoll mit dem Antikörper gegen CD11b in der Darstellung als Histogramme. Die hellgraue, breitere Kurve stellt jeweils die Negativkontrolle dar ( $\alpha$ m-PE).

Eine höhere Reinheit der isolierten Mikrogliazellen aus dem Vorgradienten sollte durch eine erneute Auftrennung der gewonnenen Zellen über einen mehrstufigen **Hauptgradienten** erreicht werden. Die Dichten für diesen Hauptgradienten wurden in Anlehnung an andere Spezies (FORD et al. 1995; HANSEN 1999) getestet. Zur Definition der Dichte bzw. Dichten, oberhalb der sich die canine Mikroglia nach Zentrifugation charakteristisch ansammelt, wurden die Zellen jeder Interphase gewonnen und nach indirekter Membranimmunfluoreszenz in der Durchflusszytometrie gemessen (s. Abb. 11). Die Identifikation der Zellen erfolgte wie unter 4.1.9.1 beschrieben.

Als Ergebnis wurde festgestellt, dass sich die canine Mikroglia oberhalb der Dichten 1,077 und 1,066 g/ml Percoll® spezifisch ansammelt. Da die canine Mikroglia oberhalb beider Dichten in der Membranimmunfluoreszenz keine Unterschiede in den Färbereigenschaften aufwies (s. Abb. 12), wurde sie im Hauptversuch gepoolt.



**Abb. 12: Identische Färbereigenschaften der Mikroglia oberhalb der Dichten 1,066 und 1,077 g/ml Percoll**  
Dargestellt sind Histogramme der Färbung mit den Antikörpern gegen CD11b und MHC I.

## 4.2 Hauptversuch der Charakterisierung der Mikroglia nach Challenge-Infektion/ Test-Infektion mit Staupevirus

### 4.2.1 Hunde

Die Einteilung der Swiss-Beagle in die drei Impfgruppen sowie die Positiv- und Negativkontrollgruppe nach dem Zufallsprinzip ist in Tab. 5 dargestellt. Die Nummern als Bezeichnung der Hunde entspricht ihrer Ohrtätowierungsnummer.

Versuchsgruppen	Hund Nr.
50 µg DNA-Vakzine (Nr. 1)	2, 4, 6, 8, 10
100 µg DNA-Vakzine (Nr. 2)	1, 3, 12, 14, 16
200 µg DNA-Vakzine (Nr. 3)	5, 7, 9, 11, 13
Positivkontrolle	15, 17, 18, 19, 20
Negativkontrolle	21, 22

Tab. 5: Zuordnung der Hunde zu den Versuchsgruppen

### 4.2.2 Klinische Symptome

Sämtliche Hunde, die mit dem Staupevirus infiziert wurden, zeigten unabhängig von der Impfgruppenzugehörigkeit zwei bis drei Tage nach der Challenge-Infektion gering- bis mittelgradig ausgeprägte klinische Symptome wie Fieber, Anorexie, Diarrhoe, Rhinitis, Konjunktivitis, Tonsillitis und seltener Vomitus und Dyspnoe. Nach einer Phase mit vorübergehender Besserung entwickelten sich bei 7 der 20 infizierten Hunde jedoch hochgradige Symptome einer systemischen und nervalen Form der Staupe. Alle Hunde wurden daraufhin euthanasiert. Die klinischen Befunde am Tag der Euthanasie sind in Tab. 6 mit Zuordnung zu den Impfgruppen dargestellt.

VG	Hund Nr.	Euthanasie Tage p. i.	Allgemeine Symptome	Neurologische Symptome
Neg. K.	21	–	o.b.B.	o.b.B.
Neg. K.	22	–	o.b.B.	o.b.B.
50 µg	4	31	o.b.B.	o.b.B.
50 µg	6	36	o.b.B.	o.b.B.
50 µg	8	34	ggr. systemische Staupe (purulente Konjunktivitis, Kachexie)	ggr. zentral vestibulär
50 µg	10	34	ggr. systemische Staupe (purulente Konjunktivitis, Rhinitis, Tonsillitis, Lymphknotenschwellungen)	ggr. zentral vestibulär und spinal
100 µg	3	35	o.b.B.	o.b.B.
100 µg	12	34	ggr. systemische Staupe (39,1°C, purulente Konjunktivitis, ggr. Kachexie, Muskelatrophie)	ggr. zentral vestibulär
100 µg	14	33	ggr. systemische Staupe (39,1°C, Tonsillitis, ggr. seröse Konjunktivitis, ggr. Kachexie)	ggr. zentral vestibulär
100 µg	16	36	o.b.B.	o.b.B.
200 µg	5	35	ggr. Konjunktivitis, Ohrmuschelinnenseite: Bläschen und Papeln	ggr. Propriozeptionsstörungen an den Hinterextremitäten
200 µg	9	33	systemische Staupe	ggr. zentral vestibulär und spinal
200 µg	11	35	o.b.B.	o.b.B.
200 µg	13	33	ggr. systemische Staupe (blasse Schleimhäute, Tonsillitis, ggr. Kachexie)	multifokal (vestibulär, Großhirn)
Pos. K.	18	31	o.b.B.	o.b.B.
50 µg	2	20	systemische Staupe	ggr. Propriozeptionsstörungen
100 µg	1	32	systemische Staupe (39,6°C, Apathie)	zentral vestibulär – Kopfschiefhaltung rechts
200 µg	7	32	systemische Staupe	zentral vestibulär – Kopfschiefhaltung links
Pos. K.	15	24	systemische Staupe (39,3°C, Apathie)	Großhirn, Kaukrämpfe
Pos. K.	17	24	systemische Staupe (39,9°C, Apathie)	Großhirn, Myoklonus
Pos. K.	19	28	systemische Staupe (39,3°C, Apathie, Kachexie)	Hirnstamm (vestibulär, spontaner Nystagmus, vertikal), Myoklonus Kaumuskulatur
Pos. K.	20	28	systemische Staupe (39,8°C, hgr. Kachexie)	Hirnstammläsionen (vestibulär), Myoklonus

Tab. 6: Klinische Befunde am Tag der Euthanasie

Hunde mit histopathologisch diagnostizierten mittel- (mgr.) bis hochgradigen (hgr.) staupebedingten ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung sind dunkelgrau unterlegt, genesene Hunde sind hellgrau unterlegt. Die Hunde der Negativkontrolle (Neg. K.) zeigten keine Abweichungen von der physiologischen Norm (o.b.B. = ohne besonderen Befund). Die ungeimpften, infizierten Hunde sind als Positivkontrolle (Pos. K.) benannt.

– = nicht zutreffend, VG = Versuchsgruppen

### 4.2.3 Histopathologische Untersuchung

Die postmortal erhobenen histopathologischen Befunde (s. 3.2.9) legten eine Einteilung in drei Versuchsgruppen nahe: Das ZNS der Hunde der Gruppe I war zum Zeitpunkt der Euthanasie bis auf vereinzelte Mikrogliaknötchen ohne besonderen Befund (o.b.B.). Dies spricht – in Übereinstimmung mit anderen experimentellen Staupeversuchen (TIPOLD et al. 1999) – für eine Erholung nach Virusinfektion. Systemisch zeigten sich keine oder lediglich geringgradige Befunde wie eine interstitielle Pneumonie. Diese Gruppe wird auch als „genesene“ Hunde bezeichnet.

Die Hunde der Gruppe II wiesen im ZNS (wie auch systemisch) mittel- bis hochgradige Befunde einer stattgefundenen Staupeerkrankung auf. Sie wurden zur Gruppe II gezählt, weil sie demyelinisierende Läsionen aufwiesen. Die Hunde 2, 15 und 17 wiesen dabei nur kleine Entmarkungsläsionen, Gliose und im Vergleich zu den Hunden 1, 7, 19 und 20 immunhistochemisch weniger Virus auf. Die übrigen vier Hunde (1, 7, 19 und 20) hatten bereits fulminante, vollständige Entmarkungsläsionen.

Als dritte Versuchsgruppe wurden zwei gleichaltrige, verschiedengeschlechtliche Hunde der gleichen Würfe als Negativkontrolle herangezogen. Sie zeigten bei der pathohistologischen Untersuchung keine Abweichungen von der physiologischen Norm. Die Einteilung der Hunde ist in Tab. 7 dargestellt.

Versuchsgruppe	Sektionsbefunde am ZNS	Hund Nr.
Negativkontrolle	ohne besonderen Befund	21, 22
I	ohne besonderen Befund, vereinzelte Mikrogliaknötchen	3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18
II	Demyelinisierung	1, 2, 7, 15, 17, 19, 20

**Tab. 7: Einteilung der Hunde in Versuchsgruppen anhand der histopathologisch erhobenen Befunde im ZNS**

Den Zeilen mit grauer Unterlegung entsprechen die mit Staupevirus infizierten Versuchsgruppen.

Die **systemischen histopathologischen Befunde** der Hunde der Gruppe I umfassten eine geringgradige interstitielle Pneumonie und eine geringgradige Lymphozytendepletion in den Lymphknoten. Hd. 18 zeigte zudem eine Gastritis.

Die Hunde der Gruppe II zeigten beruhend auf der Staupeinfektion mittel- bis hochgradige Veränderungen. Diese umfassten eine deutliche interstitielle Pneumonie, Konjunktivitis, geringgradige Hepatopathie, Thymusatrophie und eine deutliche Lymphozytendepletion in Lymphknoten, Milz und im lymphatischen Gewebe des Darmtraktes (GALT). Bei Hd. 2 wurde zudem eine eitrig-nekrotisierende Enteritis festgestellt.

In Epithelzellen von Magen, Dünndarm, Gallengängen, Harnblase, Nierenbecken und Augenscheidrüsen, aber auch in den Fußballen, der Lunge, dem Pankreas, der Speicheldrüse und den Tonsillen konnte bei allen Tieren der Gruppe II und bei den Hunden 4, 9, 13, 18 zumindest in einer dieser Lokalisationen Einschlusskörperchen nachgewiesen werden.

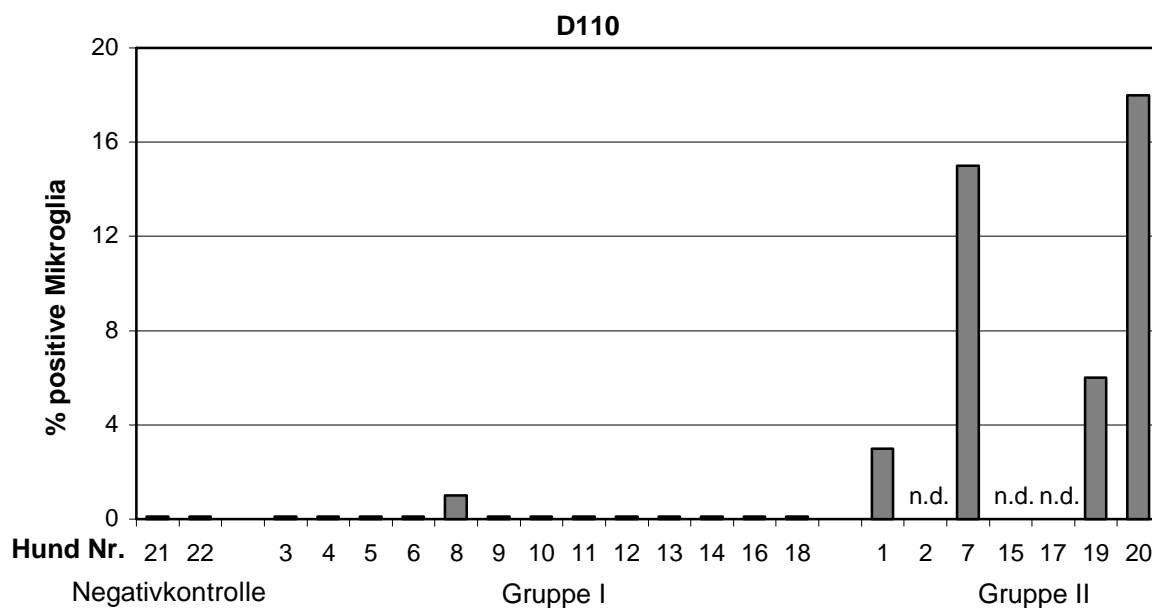
Beim Vergleich der Einteilung in Versuchsgruppen anhand der histopathologischen Befunde einerseits und der Impfgruppenzugehörigkeit der Hunde andererseits ist erkennbar, dass ein Großteil der geimpften Hunde durch die Impfung mit der DNA-Vakzine klinisch einen partiellen Schutz gegen das Staupevirus entwickelt hatte. Die Negativkontrolliere hatten keinen Kontakt mit dem Staupevirus und zeigten folglich bei der histopathologischen Untersuchung keine Abweichungen von der physiologischen Norm. Im Folgenden werden die in Tab. 7 dargestellten Versuchsgruppen wie dort angegeben als Negativkontrolle und Gruppe I bzw. II bezeichnet.

#### **4.2.4 Staupevirusnachweis in der Mikroglia ex vivo**

Der durchflusszytometrische Staupevirusnachweis in der Mikroglia ex vivo (s. 3.2.12) ist in Abb. 13 dargestellt. Es wurden deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sichtbar.

Die Negativkontrollen (Hd. 21 und 22) zeigten erwartungsgemäß keine Färbung mit dem Antikörper D110 und somit ein negatives Ergebnis für den Nachweis von CDV.

In der Gruppe I zeigte lediglich ein Hund (Hd. 8) ein positives Ergebnis, jedoch nur in geringem Ausmaß: Lediglich 1 % der Mikrogliazellen waren D110-positiv.



**Abb. 13: Staupevirusnachweis in Mikrogliazellen ex vivo**

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil D110-positiver Mikrogliazellen, der durchflusszytometrisch ermittelt wurde. Für die Hunde 2, 15 und 17 fand keine Wertermittlung statt (n.d. = nicht durchgeführt).

Bei der Gruppe II fielen vergleichsweise hohe positive Werte auf. Hd. 7 und Hd. 20 zeigten Werte zwischen 15 und 18 % positiver Mikrogliazellen. Somit waren bei ihnen etwa  $\frac{1}{6}$  der Mikrogliazellen mit CDV infiziert, wohingegen Hd. 1 einen Anteil von 3 % und Hd. 19 von 6 % D110 positive Mikrogliazellen aufwiesen. Bei den Hunden 2, 15 und 17 wurde aufgrund technischer Probleme der Virusnachweis nicht durchgeführt (=n.d.). Anhand der histopathologischen Untersuchung wurde jedoch auch bei diesen Hunden der Gruppe II an Gewebsschnitten des ZNS ein positives Ergebnis für den Virusnachweis ermittelt – allerdings ohne Zellspezifikation.

Die Hunde mit dem deutlichsten Virusnachweis hatten den höchsten Grad der Demyelinisierung im ZNS.

## 4.2.5 Immunphänotypische Charakterisierung caniner Mikroglia ex vivo bei Hundestaupe

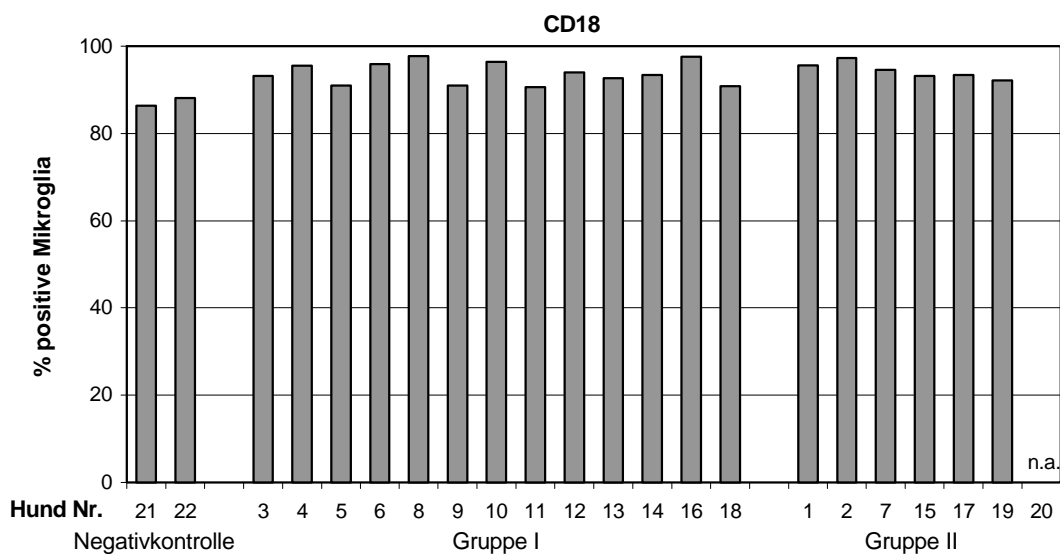
### 4.2.5.1 Identifizierung der Mikroglia

Die Identifizierung der Mikroglia erfolgte wie in den Vorversuchen erprobt (s. 4.1.9.1). Die Zellen oberhalb der Dichten 1,066 und 1,077 g/ml Perkoll wurden gewonnen und gezählt. Aus den 10 bis 15 g Gehirnmateriale aus dem Bereich um den vierten Ventrikel konnten  $3 - 7 \times 10^6$  Mikrogliazellen pro Hund isoliert werden. Im Anschluss wurden sie mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene gefärbt und in der Durchflusszytometrie gemessen. Bei der Darstellung als Dot Plot mit den Parametern Größe (FSC) und Granularität (SSC) zeigte sich bei allen Hunden eine homogene Population relativ kleiner Zellen. Die Expression von CD18 wurde in einem Histogramm dargestellt und betrug im arithmetischen Mittel aller 22 Hunde 62,0 %.

Die CD18-positiven Zellen wurden in ein gate gefasst und in dem Dot Plot farblich gekennzeichnet. Dabei zeigte sich, dass die homogene Zellpopulation nahezu vollständig farblich dargestellt und somit CD18-positiv war. Um diese CD18-positiven Zellen wurde möglichst exakt ein zweites gate gesetzt. Die Zellen innerhalb dieses zweiten gates wurden als Mikrogliazellen definiert und fanden für die weiteren Untersuchungen zur MIF Berücksichtigung.

Der Anteil CD18-positiver Zellen innerhalb dieses Auswertungsfensters lag bei allen 22 Hunden zwischen 86 und 98 %, im arithmetischen Mittel betrug der Anteil 93,3 % (s. Abb. 14). Dieser hohe Prozentsatz stellt ein Maß für die Genauigkeit der gesetzten gates dar. Der Anteil CD18 exprimierender Mikrogliazellen erwies sich als unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Hunde.

Die Zellen innerhalb des gates zeigten einen charakteristischen Phänotyp von CD11b/c<sup>+</sup>, jedoch nur eine sehr schwache Expression von CD45, wie bereits in Vorversuchen festgestellt wurde (s. 4.1.9.1 u. Abb. 7).



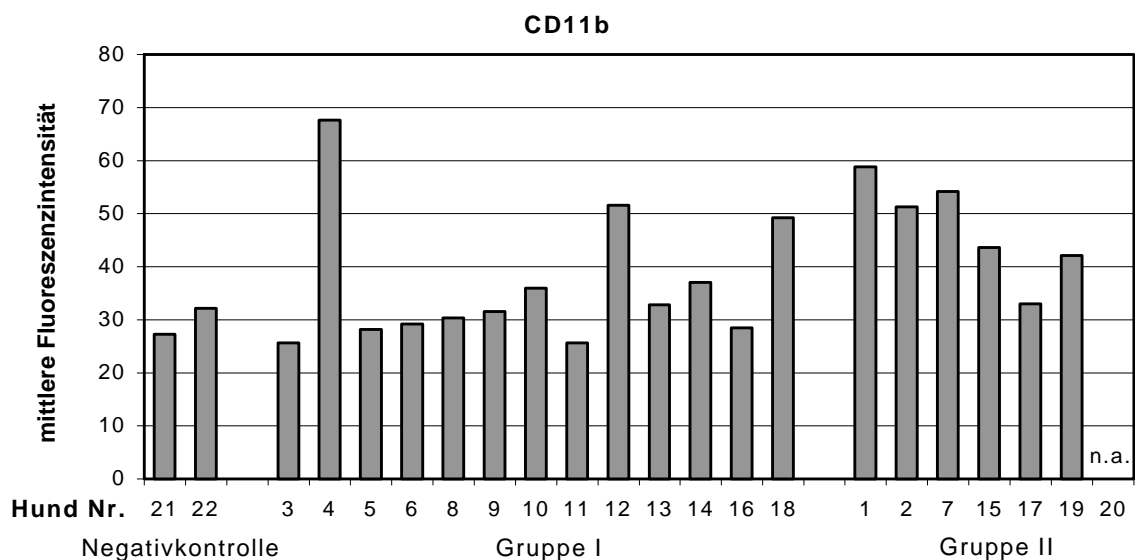
**Abb. 14: Konstitutive Expression von CD18 auf caniner Mikroglia**

Die Expression von CD11b und CD11c zeigt nahezu identische Ergebnisse. Die Werte für Hd. 20 waren nicht auswertbar (n.a.).

Neben dem Anteil positiver Zellen für ein Merkmal bestand zudem die Möglichkeit, die Expressionsdichte von Oberflächenmolekülen zu bestimmen. Ein relatives Maß der Expressionsdichte und somit der Anzahl der gebundenen Fluorochrommoleküle pro Zelle wird über die **mittlere Fluoreszenzintensität** wiedergegeben. Beim Vergleich der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Versuchsgruppenzugehörigkeit war eine Aussage über die Auf- oder Abregulation der Oberflächenmoleküle bei Hunden mit staubebedingten ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung möglich.

Eine Aufregulation des CD18 wurde bei keiner Versuchsgruppe beobachtet.

Die Expression von CD11b und CD11c lag zwischen 84 und 99 % positiver Mikrogliazellen (CD11b:  $\bar{x} = 92,0$  %; CD11c:  $\bar{x} = 92,1$  %). In Bezug auf die konstitutive Expression sowie die Expressionsdichte von CD11c war kein Unterschied zwischen Hunden der Negativkontrolle und der Gruppe I gegenüber Hunden der Gruppe II feststellbar. Für CD11b war jedoch mit statistischer Signifikanz ( $p < 0,05$ ) eine Aufregulation bei Hunden der Gruppe II gegenüber Hunden der Gruppe I zu beobachten.



**Abb. 15: Expressionsdichte von CD11b auf caniner Mikroglia ex vivo**

Die Hunde der Gruppe II zeigten eine aufregulierte Expression im Vergleich zu Gruppe I und zur Negativkontrolle. Die mittlere Fluoreszenzintensität gilt als relatives Maß der Expressionsdichte des Oberflächenmoleküls. Die Werte für Hd. 20 waren nicht auswertbar (n.a.).

Im Vergleich der drei Oberflächenmoleküle zeigte CD18 auf der Mikroglia insgesamt die größte Expressionsdichte (um den Faktor 1,6 höher als bei CD11b und um den Faktor 2,2 höher als bei CD11c).

Eine Anfärbung des CD11d (alpha d) zeigte ein negatives Ergebnis. CD11d wird auf der caninen Mikroglia nicht exprimiert.

Für CD45 konnte sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den Hunden der Gruppen I und II nur ein sehr geringer Anteil exprimierender Mikrogliazellen (3-8 %;  $\bar{x} = 4,6\%$ ) beobachtet werden. Eine Aufregulation der Expressionsdichte der Oberflächenmoleküle konnte bei keiner Versuchsgruppe festgestellt werden. In der vergleichenden Darstellung der Färbung der Monozyten am Tag der Euthanasie (s. Abb. 7) wird deutlich, dass CD45 hier in weit höherem Maße exprimiert wird ( $\bar{x} = 94,2\%$ ). Dieses Ergebnis dokumentierte zudem, dass der Antikörper einwandfrei funktionierte.

In der folgenden Tabelle ist eine kurze Übersicht über die Expression der getesteten Antikörper auf der Mikroglia gegeben. Dabei ist zudem zusammengefasst, ob bei Hunden mit staupetypischen Läsionen mit Demyelinisierung im ZNS eine Aufregulation der Expressionsdichte zu verzeichnen ist.

Oberflächenstruktur auf caniner Mikroglia	Expression (Prozentualer Anteil positiver Zellen im arithmetischen Mittel aller Hunde)	Aufregulation der Expressionsdichte des Oberflächenmoleküls bei Hunden mit Staupeläsionen im ZNS
CD18	Ja (93,3)	Nein
CD11b	Ja (92,0)	Ja
CD11c	Ja (92,1)	Nein
CD11d	Nein	–
CD45	Ja (4,6)	Nein
CD1c	Ja (75,6)	Ja
1D11	Nein	–
ICAM-1	Ja (90,8)	Ja
B7-1	Ja (10,5)	Ja
B7-2	Ja (77,0)	Ja
MHC I	Ja (95,6)	Ja
MHC II	Ja (93,4)	Ja
CD14	Ja (62,0)	n.a.
CD44	Ja (9,0)	n.a.
CD3	Nein	–
CD8 $\alpha$	Nein	–
CD21	Nein	–
CD4	Nein	–

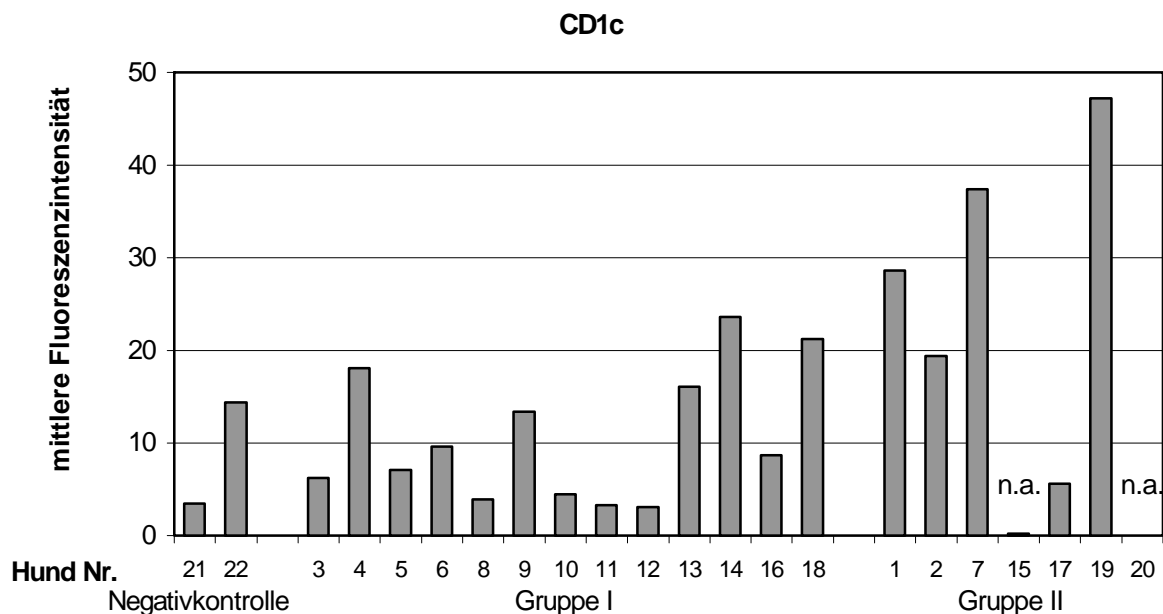
**Tab. 8:** Übersicht über die Expression von Oberflächenmolekülen auf caniner Mikroglia und Aufregulation der Expressionsdichte der Oberflächenmoleküle bei Hunden mit staupelbedingten ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung

Für CD14 und CD44 konnte aufgrund sehr geringer Werte keine Auswertung der Expressionsdichte durchgeführt werden (n.a. = nicht auswertbar). War keine Expression vorhanden, konnte auch keine Aufregulation beurteilt werden (–).

#### 4.2.5.2 CD1c

Der Anteil CD1c-positiver Mikroglia lag im arithmetischen Mittel bei 75,6%. Dabei bestand kein Unterschied hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der Hunde. In Bezug auf die Expressionsdichte des CD1c war jedoch ein Unterschied zwischen Gruppe II und den beiden anderen Gruppen festzustellen. Die Hunde der Gruppe II zeigten mit einer statistischen Signifikanz ( $p < 0,05$ ) eine um das 3,1fache aufregulierte Expression des CD1c gegenüber den

Hunden der Negativkontrolle und um das 2,6fache gegenüber denen der Gruppe I (vgl. Tab. 8). Die Hunde 1, 7 und 19 zeigten die höchsten Werte. Sie waren auch die Hunde, die in der histopathologischen Untersuchung die höchsten Grade der Demyelinisierung aufwiesen.



**Abb. 16: Expressionsdichte von CD1c auf caniner Mikroglia ex vivo**

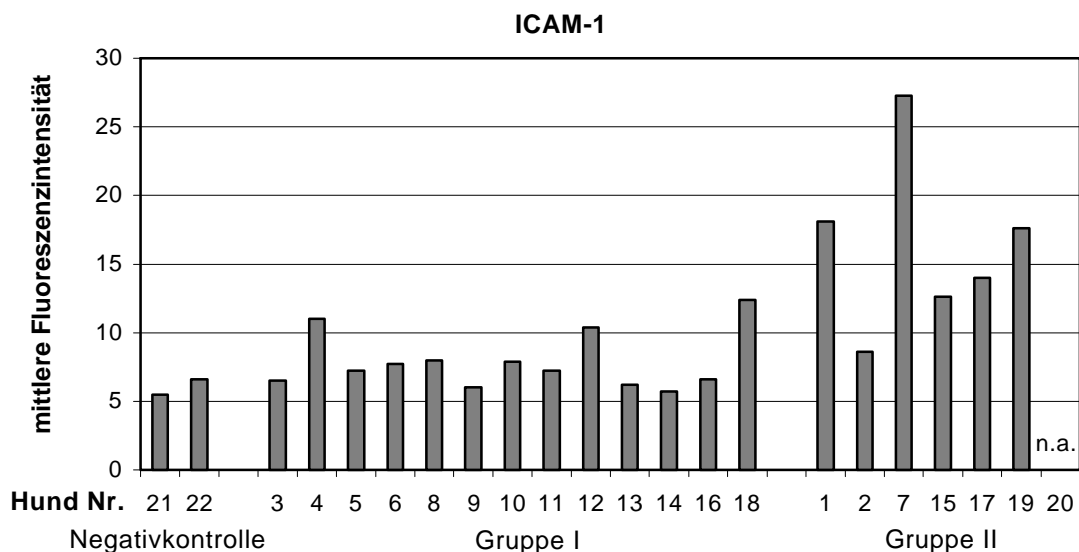
Die Hunde der Gruppe II zeigten eine deutlich aufregulierte Expression im Vergleich zu Gruppe I und zur Negativkontrolle. Die Werte für Hd. 20 und 15 waren nicht auswertbar (n.a.).

#### 4.2.5.3 1D11

Der Antikörper gegen 1D11 zeigte keine Färbung der Mikrogliazellen (vgl. Tab. 8).

#### 4.2.5.4 ICAM-1

Im arithmetischen Mittel wurde ICAM-1 von der Mikroglia zu einem Prozentsatz von 90,8 % konstitutiv exprimiert (vgl. Abb. 21). Dabei bestand kein Unterschied zwischen den Hunden der drei verschiedenen Gruppen. In Bezug auf die ICAM-1-Expressionsdichte fielen jedoch höhere Werte für die Gruppe II ( $\bar{x} = 16,4$ ) im Vergleich zu Negativkontrolle ( $\bar{x} = 6,1$ ) und Gruppe I ( $\bar{x} = 7,9$ ) auf. Diese Aufregulation des ICAM-1 um das 2,7- (Negativkontrolle) bzw. 2,1fache (Gruppe I) zeigte (mit  $p < 0,05$ ) eine statistische Signifikanz (vgl. Tab. 8 u. Abb. 17).



**Abb. 17: Expressionsdichte von ICAM-1 auf caniner Mikroglia ex vivo**

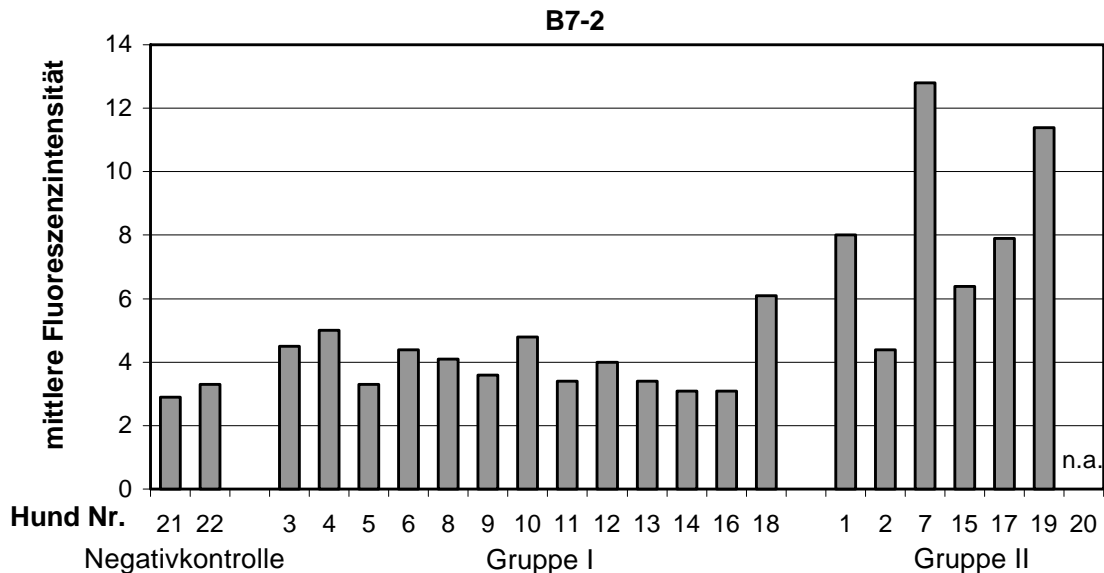
Die Hunde der Gruppe II zeigten eine deutlich aufregulierte Expression im Vergleich zu Gruppe I und zur Negativkontrolle. Die Werte für Hd. 20 waren nicht auswertbar (n.a.). Die höchsten Werte wurden bei Hund 1, 7 und 19 gemessen, die eine fulminante Demyelinisierung aufwiesen.

#### 4.2.5.5 B7-1 und B7-2

Da die Werte für B7-1 eine relativ große Streuung aufwiesen, wurde zur Auswertung der Ergebnisse der geometrische Mittelwert herangezogen. Der Anteil B7-1 exprimierender Mikrogliazellen lag im geometrischen Mittel aller Hunde bei 10,5%. Er wies bei Gruppe II wesentlich höhere Werte auf (geometrisches Mittel = gM: 40,8%) als die Gruppe I (gM: 8,0%) – somit war der Wert für Gruppe II um das 5,1fache höher. Gegenüber der Negativkontrolle (gM: 1,1%) lag der Wert für die Gruppe II um das 37,1fache höher. Wegen der großen Streuung der Werte innerhalb der Gruppen und des zu geringen Umfangs auswertbarer Ergebnisse konnte jedoch statistisch keine Signifikanz festgestellt werden. Die Expressionsdichte von B7-1 war sehr gering (gM: 4,5), zeigte jedoch eine Aufregulation bei Gruppe II gegenüber Gruppe I und der Negativkontrolle (vgl. Tab. 8), die eine statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) aufwies.

Für B7-2 wurde wieder der arithmetische Mittelwert verwendet, weil sich die Ergebnisse als homogen erwiesen. 77,0% ( $\bar{x} = 16,4$ ) der Mikrogliazellen aller Hunde exprimierten B7-2. In Bezug auf die Gruppenzugehörigkeit bestand keine Differenz in der Expression. Wie bei B7-1 zeigte sich für die Expressionsdichte von B7-2 ein vergleichbar niedriger Wert und eine

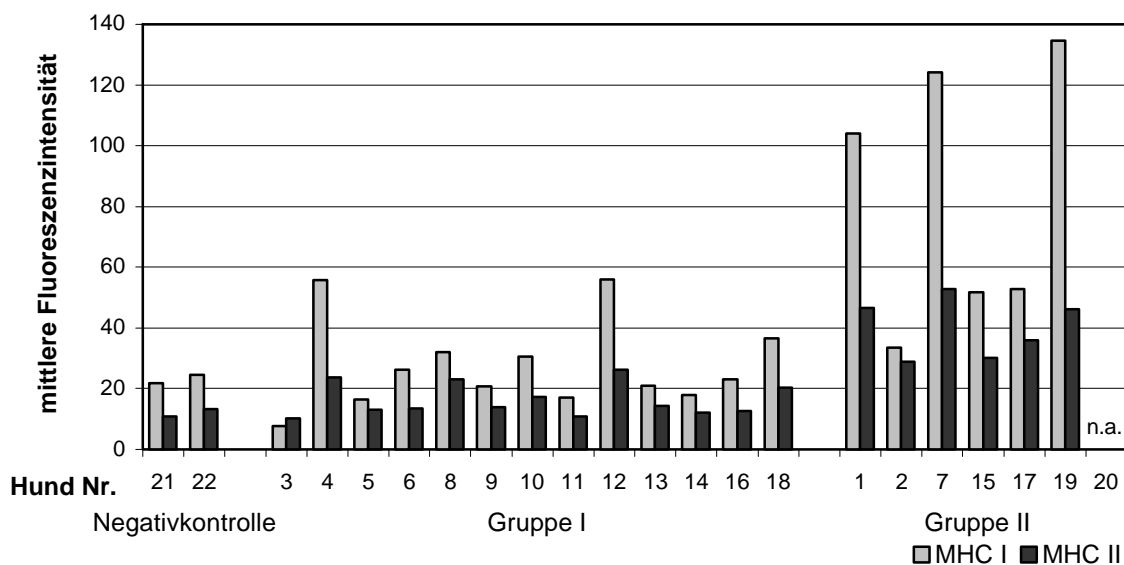
statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Aufregulation des Oberflächenmoleküls bei der Gruppe II – um den Faktor 2,1 im Vergleich zur Negativkontrolle und um den Faktor 2,7 im Vergleich zur Gruppe I (vgl. Tab. 8). Die höchsten Werte wurden wiederum bei den Hunden 1, 7 und 19 gesehen, die eine fulminante Demyelinisierung im ZNS aufwiesen.



**Abb. 18: Expressionsdichte von B7-2 auf caniner Mikroglia ex vivo**  
Die Hunde der Gruppe II zeigten eine deutlich aufregulierte Expression im Vergleich zu Gruppe I und zur Negativkontrolle. Die Werte für Hd. 20 waren nicht auswertbar (n.a.).

#### 4.2.5.6 MHC I und II

MHC I und II zeigten bei allen Hunden eine vergleichbar starke Expression von 95,6 % (MHC I) bzw. 93,4 % (MHC II) positiver Mikrogliazellen im arithmetischen Mittel. Dabei wies MHC I jedoch eine wesentlich höhere Expressionsdichte im Vergleich zu MHC II auf (ca. 2fach höher). Beide Oberflächenmoleküle sind auf der Mikroglia von Hunden mit Demyelinisierung (Gruppe II) deutlich aufreguliert im Vergleich zur Negativkontrolle (MHC I um das 3,6fache; MHC II um das 3,3fache) und den Hunden der Gruppe I (MHC I um das 3fache; MHC II um das 2,5fache). Die Aufregulation sowohl von MHC I als auch von MHC II (vgl. Tab. 8) wies eine statistische Signifikanz auf ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 19: Expressionsdichten von MHC I und MHC II auf caniner Mikroglia ex vivo**  
Die Hunde der Gruppe II zeigten eine deutlich aufregulierte Expression der beiden MHC-Moleküle. Auffällig ist zudem die höhere Expressionsdichte von MHC I im Vergleich zu MHC II. Die Werte für Hd. 20 waren nicht auswertbar (n.a.).

#### 4.2.5.7 CD14

Der durchflusszytometrisch gemessene Anteil CD14-positiver Mikrogliazellen betrug im arithmetischen Mittel 62,0 % (vgl. Tab. 8). In Bezug auf die mittlere Fluoreszenzintensität waren nur sehr niedrige Werte zu beobachten ( $\bar{x} = 3,7$ ). Die geringe Dichte des Oberflächenmoleküls war mit der von B7-1 (s. 4.2.5.5) vergleichbar.

#### 4.2.5.8 CD44

CD44 wurde bei den Mikrogliazellen unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Hunde nur zu einem geringen Prozentsatz exprimiert ( $\bar{x} = 9,0$  %; vgl. Tab. 8). Die Expressionsdichte zeigte relativ hohe Werte ( $\bar{x} = 24,1$ ).

#### 4.2.5.9 CD3, CD8a, CD21 und CD4

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen von CD3, CD8 $\alpha$  und CD21 erbrachte vergleichbare Resultate (vgl. Tab. 9). Die drei Oberflächenmoleküle wurden von Mikrogliazellen nicht exprimiert und dienten zur Kontrolle der gewonnenen Zellpopulation auf eine eventuelle Kontamination mit Lymphozyten (vgl. Tab. 8).

Hund Nr.	CD3 (%)	CD8 (%)	CD21 (%)	CD4 (%)
1	2,0	2,0	1,3	0,8
2	n.d.	n.d.	n.d.	2,8
3	1,3	1,4	0,6	1,4
4	7,8	6,0	0,5	1,8
5	3,4	2,4	1,3	2,3
6	1,7	2,0	0,5	1,1
7	4,2	7,7	4,3	1,8
8	4,1	2,5	0,6	1,3
9	2,5	1,1	0,8	0,9
10	4,7	1,7	1,6	1,4
11	2,5	1,8	0,7	2,1
12	5,6	3,7	0,7	2,0
13	3,7	1,9	0,2	1,7
14	4,8	3,5	2,1	2,1
15	n.d.	n.d.	n.d.	1,5
16	1,4	1,3	0,4	1,4
17	n.d.	n.d.	n.d.	5,7
18	2,7	0,9	0,3	2,1
19	n.d.	5,0	n.d.	8,7
20	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
21	3,0	4,7	0,5	2,5
22	2,0	1,8	1,1	0,2

**Tab. 9:** Anteil positiver Zellen für die Expression von CD3, CD8a, CD21 und CD4

Die Werte für Hd. 20 waren nicht auswertbar (n.a.), für Hd. 2, 15 und 17 wurden keine Werte ermittelt, für Hd. 19 wurden keine Werte für CD3 und CD21 ermittelt (n.d. = nicht durchgeführt). Für den CD4 konnte lediglich der Wert für Hd. 20 nicht ausgewertet werden (n.a.).

Der niedrige Anteil positiver Zellen für CD3 ( $\bar{x} = 3,4 \%$ ), CD8 $\alpha$  ( $\bar{x} = 2,9 \%$ ) und CD21 ( $\bar{x} = 1,0 \%$ ) spiegelt eine vernachlässigbar geringe Kontamination mit Lymphozyten wider und dokumentiert wiederum den Erfolg der Isolation einer möglichst reinen Mikroglia-population aufgrund der durchgeführten Arbeitsschritte von der Perfusion bis zur Dichte-gradientenzentrifugation. Die gute Perfusion konnte auch histopathologisch bestätigt werden.

Der Anteil positiver Zellen für CD4 lag im arithmetischen Mittel bei 2,2 % (vgl. Tab. 8 u. Tab. 9). Aufgrund des niedrigen Prozentsatzes exprimierender Zellen, der vergleichbar mit

dem von CD3, CD8 $\alpha$  und CD21 war, wurde vermutet, dass es sich bei den exprimierenden Zellen nicht um Mikroglia, sondern um Lymphozyten handelte. Canine Mikroglia ex vivo zeigte keine Expression von CD4.

#### 4.2.6 Vergleich der Immunphänotypen der Mikroglia ex vivo und der Monozyten am Tag der Euthanasie

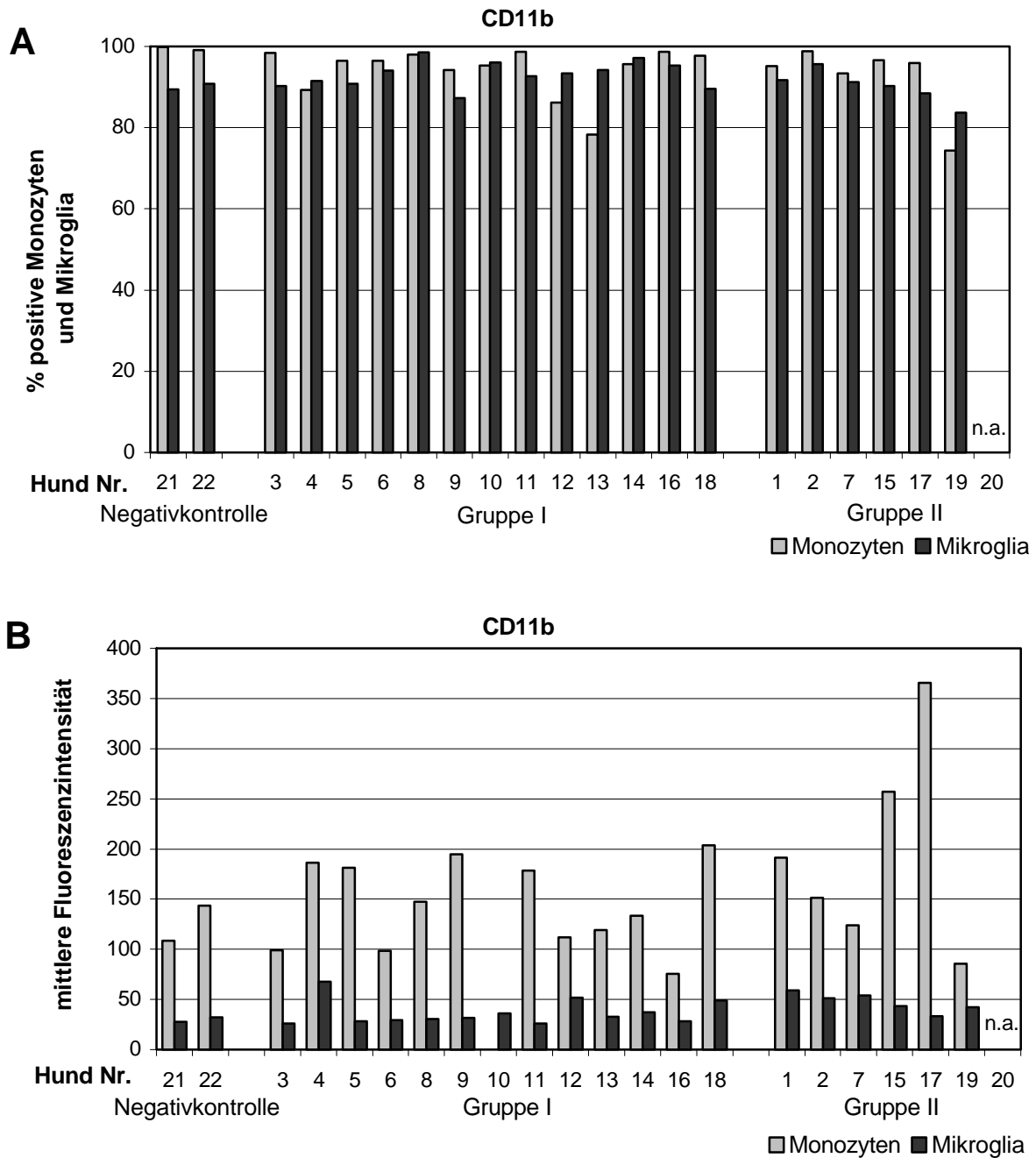
In der nachfolgenden Tabelle sind die Messergebnisse der Expression von Oberflächenantigenen von Mikroglia und Monozyten zum besseren Vergleich gegenübergestellt. Auf die einzelnen Resultate wird in den sich anschließenden Abschnitten eingegangen.

Exprimiertes Oberflächenmolekül	Mikroglia (%)	Monozyten (%)
CD18	Ja (93,3)	Ja (97,1)
CD11b	Ja (92,0)	Ja (94,1)
CD11c	Ja (92,1)	Ja (93,4)
CD11d	Nein	Nein
CD45	Ja (4,6)	Ja (94,2)
CD1c	Ja (75,6)	Ja (67,5)
1D11	Nein	Nein
ICAM-1	Ja (90,8)	Ja (3,8)
B7-1	Ja (10,5)	Ja (14,7)
B7-2	Ja (77,0)	Ja (77,4)
MHC I	Ja (95,6)	Ja (96,1)
MHC II	Ja (93,4)	Ja (71,7)
CD14	Ja (62,0)	Ja (72,8)
CD44	Ja (9,0)	Ja (98,4)
CD3	Nein	Nein
CD8 $\alpha$	Nein	Nein
CD21	Nein	Nein
CD4	Nein	nein

**Tab. 10: Vergleich der Expression von Oberflächenantigenen bei Mikroglia und Monozyten**  
Grau unterlegt wurden jene Oberflächenmoleküle, die durchflusszytometrisch eine Unterscheidung dieser beiden Zellarten aufgrund der Expression bzw. der Expressionsdichte ermöglichen.

## 4.2.6.1 CD18, CD11b und CD11c

Die Expression von CD18, CD11b und CD11c zeigte große Konformität bei Mikroglia und Monozyten.



**Abb. 20: Expression (A) und Expressionsdichte (B) von CD11b auf Monozyten und Mikroglia**  
Die Ergebnisse der Expressionen und Expressionsdichten von CD18 und CD11c zeigten nahezu identische Ergebnisse. Die Werte für Hd. 20 waren nicht auswertbar (= n.a.).

Der durchflusszytometrisch gemessene Anteil positiver Mikroglia und Monozyten war vergleichbar hoch (vgl. Abb. 20 A). Eine Aufregulation der Oberflächenmoleküle auf den Monozyten fand bei keiner der Versuchsgruppen statt. Eine Ausnahme bildeten die Hunde 15 und 17, deren Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität höhere Werte als für die anderen Hunde aufwiesen. Die Expressionsdichte der drei Oberflächenmoleküle war auf den Monozyten insgesamt deutlich höher als auf der Mikroglia (CD18: 2,7fach, CD11b: 4,1fach und CD11c: 1,9fach: vgl. Abb. 20 B).

#### 4.2.6.2 CD11d

Übereinstimmung wurde ebenfalls in Bezug auf die Expression des CD11d (alpha d) beobachtet. Die Monozyten zeigten wie die Mikroglia keine Expression dieses Oberflächenmoleküls (s. Tab. 10).

#### 4.2.6.3 CD45

Für die Expression des CD45 ergaben sich große Unterschiede zwischen Monozyten und Mikroglia (s. Abb. 7). Während die Mikroglia nur eine sehr geringe Expression von CD45 zeigte ( $\bar{x} = 4,6 \%$ ), reagierten die Monozyten zu einem sehr großen Prozentsatz positiv auf die Anfärbung mit dem Antikörper gegen dieses Oberflächenmolekül ( $\bar{x} = 94,2 \%$ , s. Tab. 10). Die Expressionsdichte war bei den Monozyten deutlich höher (im arithmetischen Mittel um das 3,5fache) gegenüber der Mikroglia. Eine Aufregulation der Expression nach Staupeinfektion war bei den Monozyten – wie bei der Mikroglia – nicht zu beobachten. Der Vergleich der Färbereigenschaften unterstreicht, dass der verwendete Antikörper in seiner Funktion nicht beeinträchtigt war.

#### 4.2.6.4 CD1c

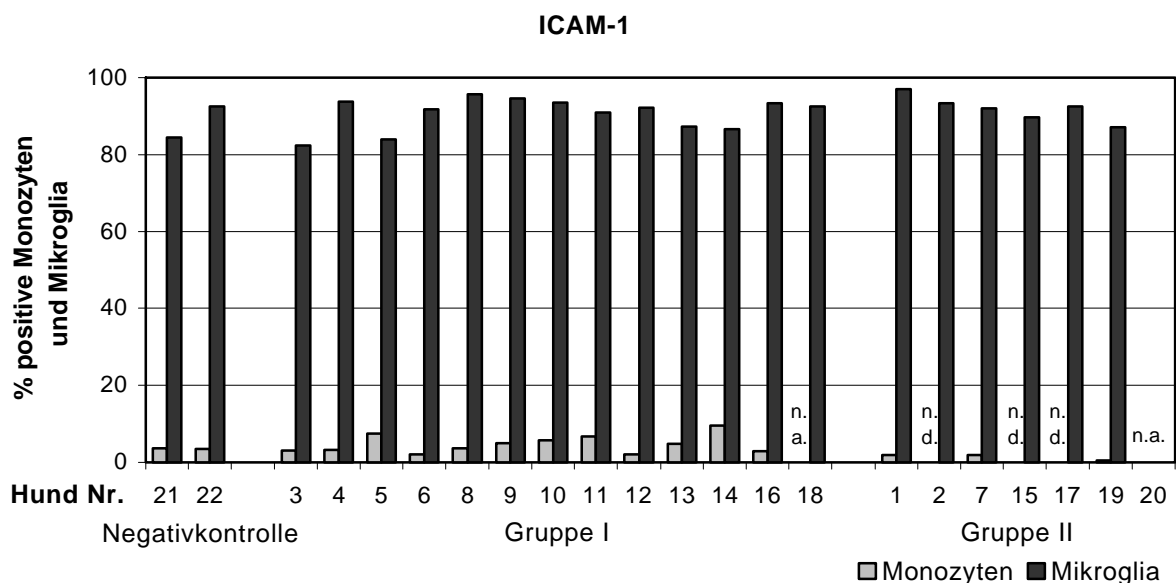
Der Prozentsatz CD1c-positiver Monozyten war geringer ( $\bar{x} = 67,5 \%$ ) als bei der Mikroglia ( $\bar{x} = 75,6 \%$ , s. 4.2.5.2). Im Gegensatz zu den Mikrogliazellen war bei den Monozyten keine Aufregulation des Oberflächenmoleküls bei Hunden der Gruppe II (im Vergleich zur Negativkontrolle und den Hunden der Gruppe I) zu verzeichnen. Die Expressionsdichte lag im arithmetischen Mittel über der der Mikroglia.

#### 4.2.6.5 1D11

Der Antikörper gegen 1D11 zeigte bei Monozyten wie bei der Mikroglia ein negatives Ergebnis in der Membranimmunfluoreszenz (s. Tab. 10).

#### 4.2.6.6 ICAM-1

Der Anteil positiver Monozyten war für den ICAM-1 mit 3,8 % im arithmetischen Mittel sehr gering. Dies stand im Gegensatz zur Expression des ICAM-1 bei der Mikroglia, die einen hohen Prozentsatz positiver Zellen aufwies ( $\bar{x} = 90,8 \%$ , s. Tab. 10). Weitere Unterschiede waren eine sehr geringe Expressionsdichte des ICAM-1 auf Monozyten und das Fehlen einer aufregulierten Expression bei Hunden mit Staupeläsionen im ZNS (Gruppe II), wie sie bei der Mikroglia zu beobachten war. Abb. 21 veranschaulicht die unterschiedliche Expression des ICAM-1 auf Monozyten und Mikroglia.



**Abb. 21: Expression von ICAM-1 auf Monozyten und Mikroglia**  
 Die Werte für Hd. 18 und 20 waren nicht auswertbar (n.a.), für Hd. 2, 15 und 17 fand keine Wertermittlung statt (n.d.).

#### 4.2.6.7 B7-1 und B7-2

Wegen der relativ großen Streuung der Werte für B7-1 wurde zur Auswertung der geometrische Mittelwert herangezogen. B7-1 wurde von den Monozyten im geometrischen Mittel zu 14,7 % exprimiert. Bei den Hunden der Gruppe II war der Anteil der exprimierenden

Monozyten im geometrischen Mittel mit 30,2 % höher als bei Hunden der Gruppe I und der Negativkontrolle. Dieser erhöhte Anteil B7-1 exprimierender Monozyten wies jedoch – wie bei der Mikroglia (s. 4.2.5.5) – keine statistische Signifikanz auf. Die Monozyten zeigten eine mit der Mikroglia vergleichbare minime Expressionsdichte von B7-1.

Für B7-2 zeigte sich in Bezug sowohl auf den prozentualen Anteil positiver Zellen (Monozyten:  $\bar{x} = 77,4 \%$ , Mikroglia:  $\bar{x} = 77,0 \%$ , s. 4.2.5.5, s. Tab. 10) als auch auf die Aufregulation der Expression bei Hunden der Gruppe II – im Vergleich zu Gruppe I und Negativkontrolle – eine große Übereinstimmung zwischen Monozyten und Mikroglia. Die Aufregulation der Monozyten war jedoch statistisch nicht signifikant.

#### 4.2.6.8 MHC I und II

Die Monozyten exprimierten MHC I zu einem mit der Mikroglia vergleichbar hohen Prozentsatz ( $\bar{x} = 96,1 \%$ , Mikroglia:  $\bar{x} = 95,6 \%$ ; s. Tab. 10). Für MHC II wurde ein Anteil von 71,7% ( $\bar{x}$ ) exprimierender Monozyten ermittelt. Dieser Wert war um ca. 20% ( $\bar{x}$ ) geringer als bei der Mikroglia. Bezüglich der Expressionsdichte wiesen die Monozyten für beide MHC-Moleküle höhere Werte auf als die Mikroglia (vgl. Abb. 19). Für MHC I war die Expressionsdichte auf den Monozyten um das 4,5fache und für MHC II um das 3,7fache höher. Eine Aufregulation wie bei der Mikroglia war bei den Monozyten nicht zu beobachten.

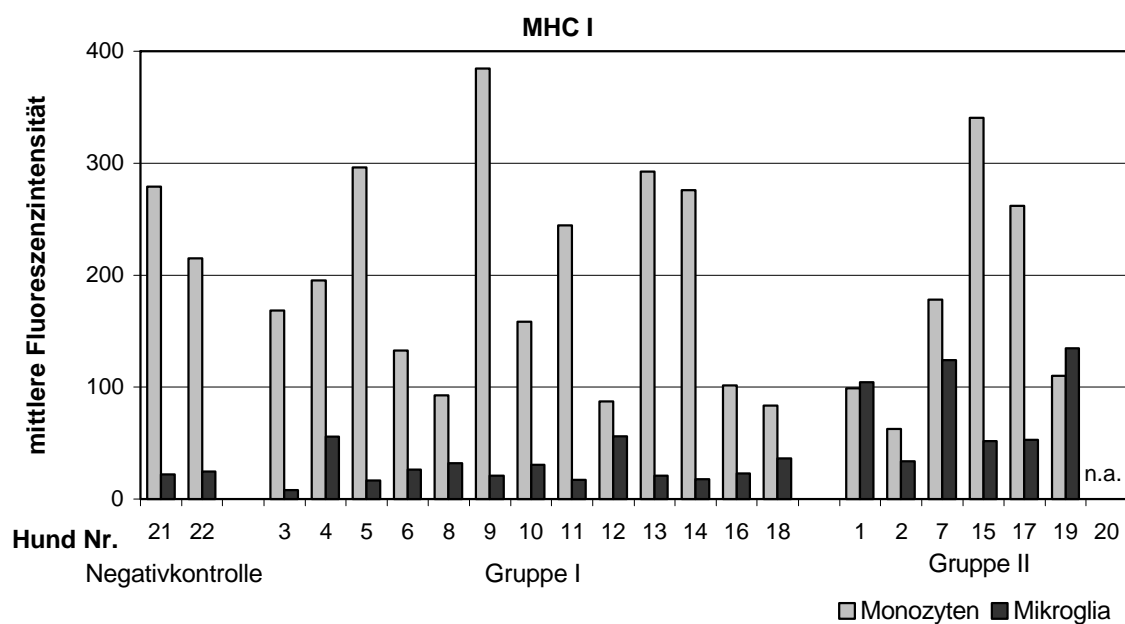


Abb. 22: Expressionsdichte von MHC I auf Monozyten und Mikroglia

#### 4.2.6.9 CD14

Der Anteil CD14 exprimierender Monozyten wies vergleichbar hohe Werte wie bei der Mikroglia auf (Monozyten:  $\bar{x} = 72,8 \%$ , Mikroglia:  $\bar{x} = 62,0 \%$ ; s. Tab. 10). Die Expressionsdichte von CD14 war auf Monozyten jedoch wesentlich höher (im arithmetischen Mittel etwa um das 52fache). Eine Aufregulation war nicht festzustellen.

#### 4.2.6.10 CD44

Der Anteil positiver Monozyten betrug für CD44 im arithmetischen Mittel 98,4 %. Damit lag er um das 10,9fache über dem Wert für die Mikroglia (s. Tab. 10). Hinsichtlich der Expressionsdichte wiesen die Monozyten einen 11,1fach höheren Wert auf. Eine Aufregulation der Expression des CD44 aufgrund der Staupinfektion fand nicht statt.

#### 4.2.6.11 CD3, CD8a und CD21

Der Anteil Zellen, die CD3, CD8 $\alpha$  und CD21 exprimieren, war sehr gering. Er betrug für CD3 im arithmetischen Mittel 2,5 %, für CD8 $\alpha$  2,7 % und für CD21 8,2 %. Weil die Expression dieser, für Lymphozyten charakteristischen Antigene gering war, kann von einer treffenden Definition der Monozytenpopulation bzw. einer nur geringen Kontamination des „Monozyten-Gates“ in der Durchflusszytometrie ausgegangen werden.

### 4.2.7 Funktionelle Charakterisierung der Mikroglia ex vivo

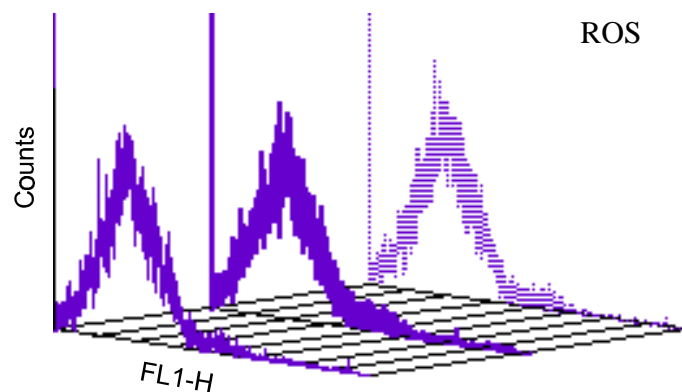
Im Folgenden sollte die Fähigkeit der caninen Mikroglia ex vivo zur Bildung von ROS und zur Phagozytose grundsätzlich und in Abhängigkeit von einer Staupvirusinfektion (mit typischen histopathologischen Veränderungen im ZNS) erfasst werden. Hierfür wurde die funktionelle Kapazität zur ROS-Bildung und zur Phagozytose von Negativkontrollen und den Hunden der Gruppe I und II verglichen.

#### 4.2.7.1 Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten

##### ROS (reactive oxygen species)

Für die Untersuchung der Bildung von ROS wurden Dreifach-Ansätze (= Triplikate) verwendet. Die Ergebnisse der Triplikate für den prozentualen Anteil ROS-positiver Mikro-

gliazellen sowie für die mittlere Fluoreszenzintensität wurden für jeden Hund verglichen und es konnte mit Hilfe des Variationskoeffizienten eine sehr große Übereinstimmung der Werte festgestellt werden (arithmetischer Mittelwert aller Variationskoeffizienten: 2,9 %).

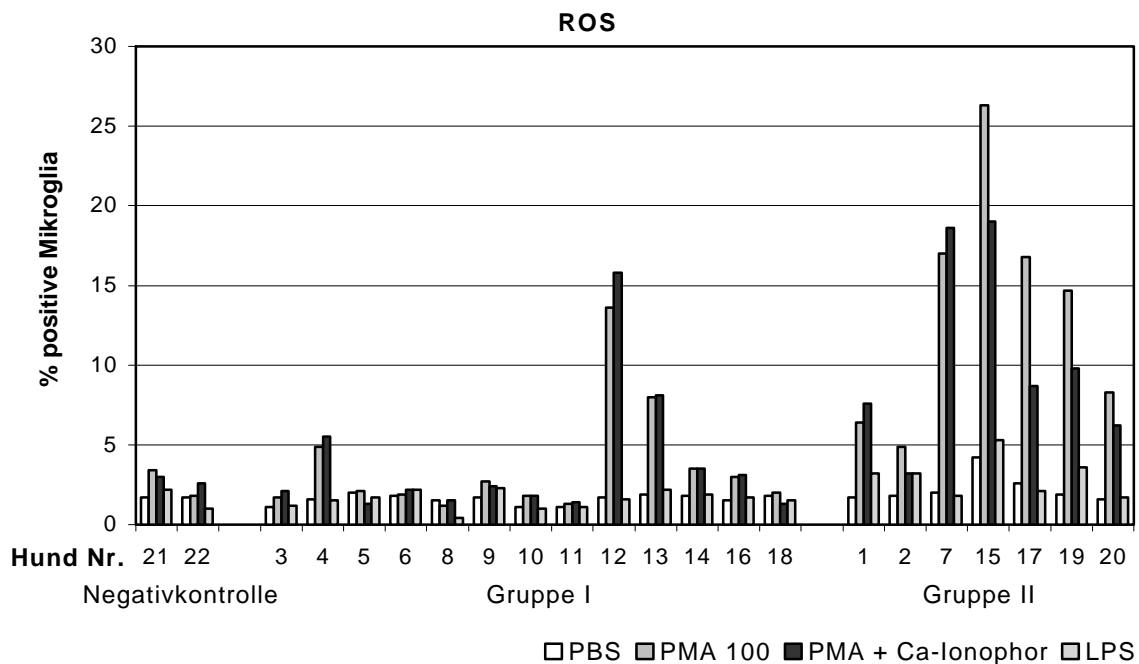


**Abb. 23:** Darstellung der Übereinstimmung der Werte der Triplikate

Aus den drei Ergebnissen pro Ansatz wurde jeweils der arithmetische Mittelwert errechnet und dieser für die weitere Auswertung verwendet.

Abb. 24 verdeutlicht die Resultate aus der Messung der ROS-Bildung unter Verwendung der verschiedenen Trigger. Die Ergebnisse dokumentieren, dass der prozentuale Anteil ROS bildender Mikroglia bei Hunden der Gruppe II deutlich höher war, als bei der Negativkontrolle und den Hunden der Gruppe I. Dieser Unterschied wies für alle drei Trigger eine statistische Signifikanz auf ( $p < 0,005$  bzw. für LPS  $p < 0,01$ ). Die Hunde 4, 12 und 13 der Gruppe I zeigten wie die Hunde der Gruppe II einen erhöhten Anteil ROS-positiver Mikroglia. Zwischen der Negativkontrolle und den Hunden der Gruppe I bestand kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Anteil ROS-bildender Mikroglia.

Die Effektivität der drei Trigger variierte: PMA 100 zeigte die stärksten Wirkungen, der Anteil ROS-positiver Mikrogliazellen war bei Hunden der Gruppe II im Vergleich zu den Negativkontrolltieren um den Faktor 5,7 höher, im Vergleich zu den Hunden der Gruppe I um den Faktor 3,6. Für PMA in Kombination mit Ca-Ionophor A 23187 war im Vergleich zu den Negativkontrollen ein um den Faktor 3,7 höherer Anteil positiver Mikrogliazellen zu beobachten, im Vergleich zu den Hunden der Gruppe I wurde ein 2,7fach erhöhter Anteil gemessen. LPS zeigte die geringste Effektivität; der Anteil positiver Mikroglia verdoppelte sich im Vergleich zu Negativkontrolle und Hunden der Gruppe I lediglich.

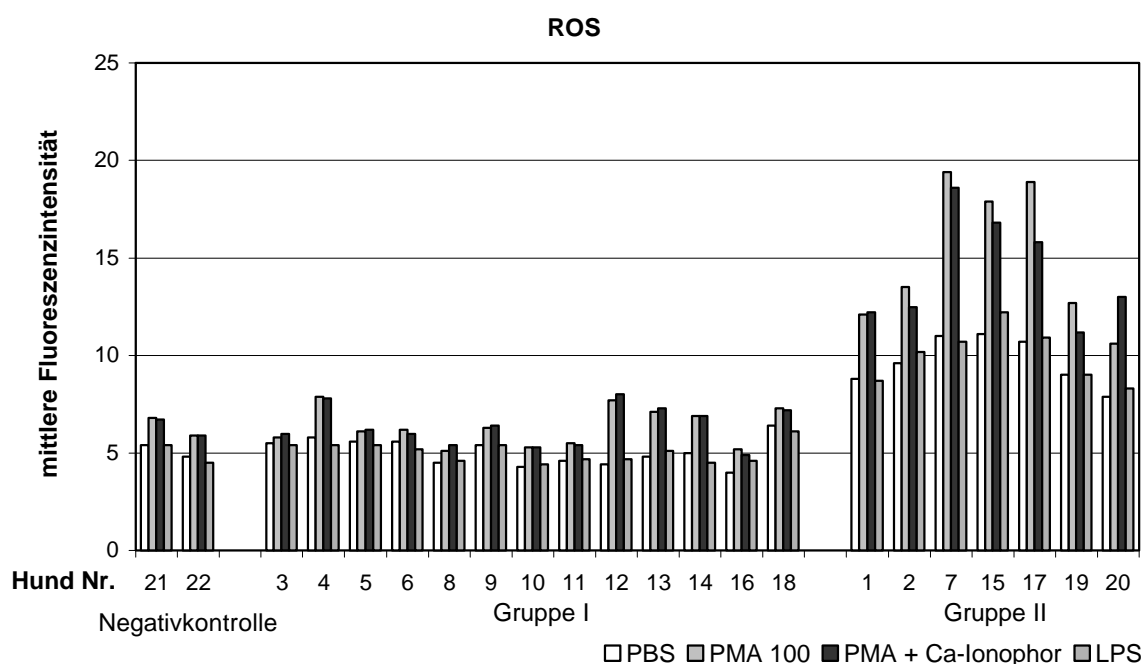


**Abb. 24:** Anteil ROS-positiver Mikroglia ex vivo

Gemessen wurde jeweils ein Ansatz mit PBS bzw. mit den Triggern PMA 100 (PMA in einer Endkonzentration von 100 nmol/l), PMA in Kombination mit Ca-Ionophor A 23187 und LPS. Der Anteil ROS-positiver Mikrogliazellen war bei Gruppe II deutlich höher als bei Gruppe I und Negativkontrolle.

Bei der Betrachtung der Fluoreszenzintensität – als relatives Maß für die Menge der ROS, die pro Mikrogliazelle gebildet wird – ergab sich eine dem Anteil ROS-positiver Mikrogliazellen vergleichbare Verteilung. Die Mikroglia der Hunde der Gruppe II entfaltete eine deutlich höhere Intensität der ROS-Bildung. Die erhöhte Intensität wies für alle drei Trigger eine statistische Signifikanz ( $p < 0,005$ ; für LPS  $p < 0,05$ ) auf (vgl. Abb. 25). In Bezug auf die Intensität der ROS-Bildung fielen die Hunde 4, 12 und 13 der Gruppe I nicht durch deutlich höhere Werte als ihre Gruppenmitglieder auf.

Bei Betrachtung der Intensität der ROS-Bildung erwiesen sich PMA 100 und PMA in Kombination mit Ca-Ionophor A 23187 als effektivste Trigger. LPS zeigte die geringsten Effekte auf die Intensität der ROS-Bildung durch Mikroglia.



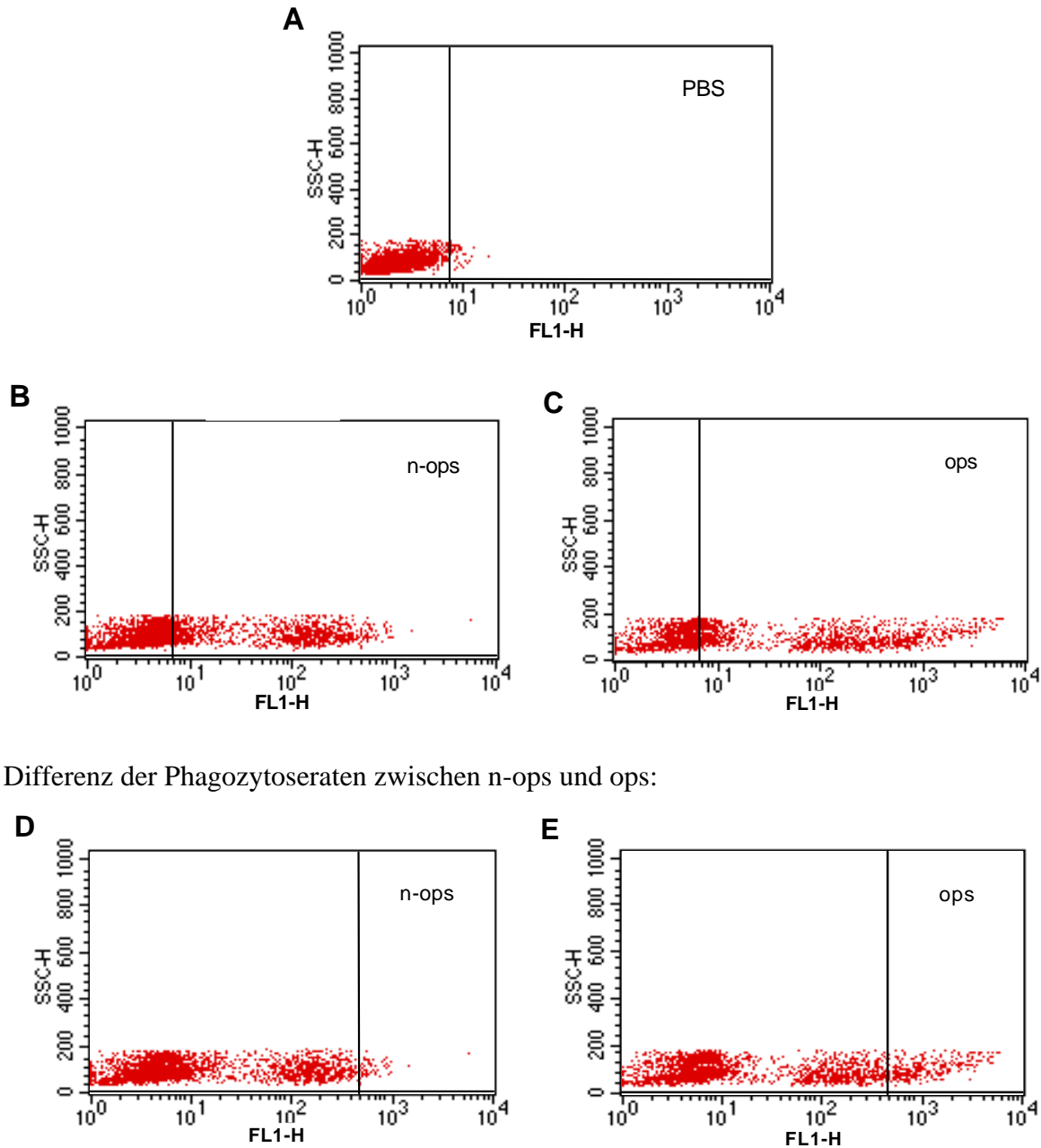
**Abb. 25: Intensität der ROS-Bildung der Mikroglia ex vivo**

Gemessen wurde jeweils ein Ansatz mit PBS bzw. mit den Triggern PMA 100 (PMA in einer Endkonzentration von 100 nmol/l), PMA in Kombination mit Ca-Ionophor A 23187 und LPS. Die Intensität zur ROS-Bildung war bei Gruppe II deutlich höher als bei Gruppe I und Negativkontrolle.

#### 4.2.7.2 Phagozytose-Test

Für die Untersuchung der Phagozytose durch Mikrogliazellen wurden Triplikate (= Dreifach-Ansätze) verwendet. Die Ergebnisse der Triplikate für den prozentualen Anteil Phagozytose-positiver Mikrogliazellen sowie für die mittlere Fluoreszenzintensität wurden – wie bei dem ROS-Bildungs-Test – für jeden Hund verglichen (s. Abb. 27). Dabei wurde mit Hilfe des Variationskoeffizienten eine sehr große Übereinstimmung der Werte festgestellt (arithmetischer Mittelwert aller Variationskoeffizienten: 5,7%). Aus den drei Ergebnissen pro Ansatz wurde jeweils der arithmetische Mittelwert errechnet und dieser für die weitere Auswertung verwendet. Abb. 26 zeigt exemplarisch ein durchflusszytometrisches Ergebnis des Phagozytose-Tests und veranschaulicht die Vorgehensweise bei der Auswertung.

Alle Hunde dieser Studie wiesen generell eine deutliche Phagozytoseaktivität auf, die der hohe Anteil Phagozytose-positiver Mikroglia nach Zugabe der nicht-opsonierten Staphylokokken (n-ops) dokumentiert. Dies wurde durch den Vergleich der Fluoreszenzen der Probe mit n-ops mit der Mikroglia population nach alleiniger Zugabe von PBS ermittelt.



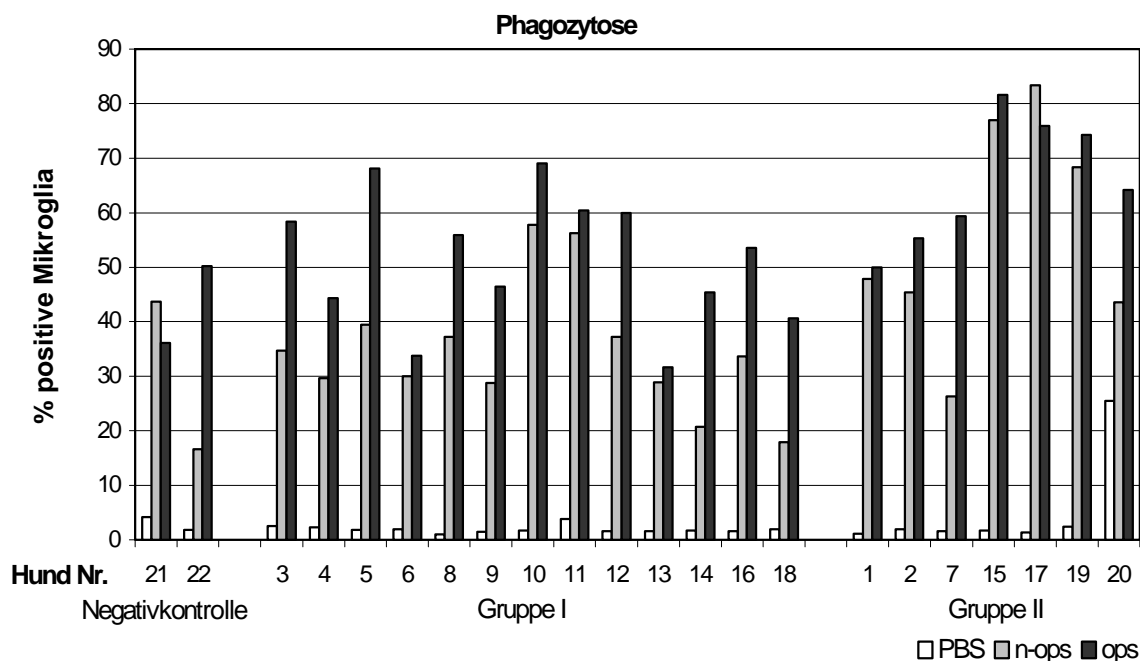
Differenz der Phagozytoseraten zwischen n-ops und ops:

**Abb. 26: Durchflusszytometrische Ergebnisse des Phagozytose-Tests**

Abb. 26A zeigt das durchflusszytometrische Messergebnis für die Mikroglia population nach Zugabe von PBS. Dieses Ergebnis diente als Negativkontrolle zu den Phagozytoseraten der Mikroglia für nicht-opsonisierte (n-ops, Abb. 26B) und opsonisierte (ops, Abb. 26C) Staphylokokken. Abb. 26D und E veranschaulichen den Auswertungsschritt zur Differenzierung der Phagozytoseraten für n-ops Staphylokokken gegenüber ops Staphylokokken.

Gleichwohl zeigte sich bereits bezüglich der Phagozytose der nicht-opsonisierten Staphylokokken eine Tendenz zur Unterscheidung der Versuchsgruppen. Der Anteil positiver Mikrogliazellen lag bei der Gruppe II im arithmetischen Mittel bei 56,0 % und somit um den

Faktor 1,6 höher als bei Hunden der Gruppe I und um den Faktor 1,9 höher als die Hunde der Negativkontrolle. Die erhöhte Phagozytoserate nicht-opsonierter Staphylokokken bei Hunden der Gruppe II wies statistisch jedoch keine Signifikanz auf.



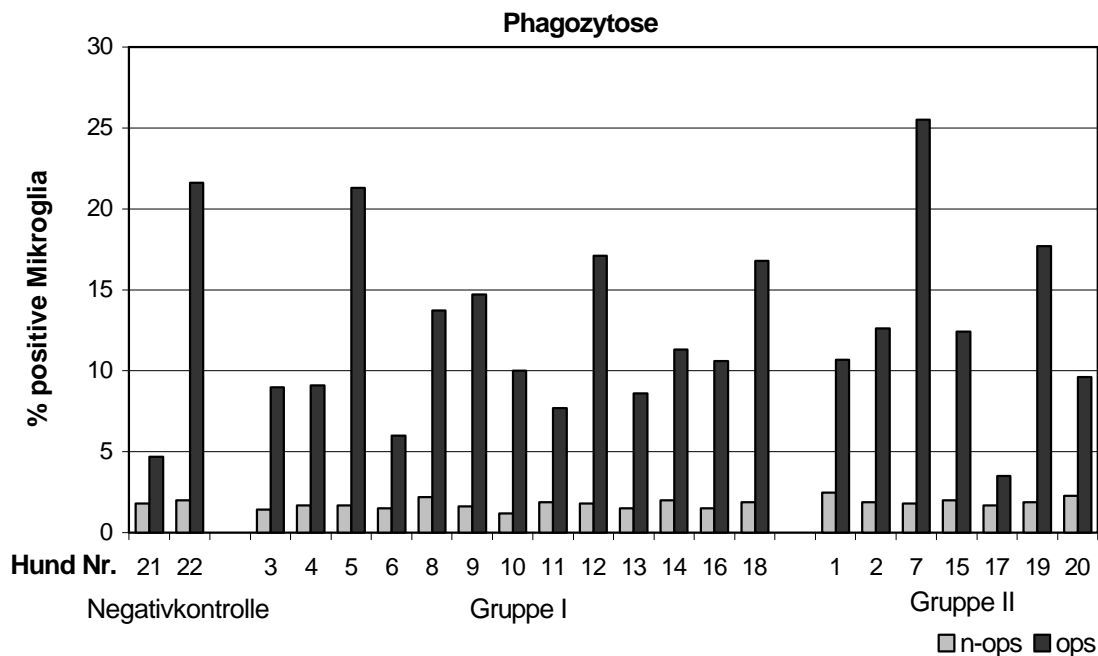
**Abb. 27: Anteil Phagozytose-positiver Mikrogliazellen ex vivo**

Als Vergleich der Phagozytoseraten für nicht-opsonierte (= n-ops) und opsonierte (= ops) Staphylokokken wurde ein Ansatz der Mikroglia mit PBS herangezogen. Der Anteil phagozytischer Mikrogliazellen war bei Gruppe II tendenziell höher als bei Gruppe I und der Negativkontrolle.

Für die Phagozytose der opsonierten Staphylokokken waren vergleichbare Resultate wie für die nicht-opsonierten zu verzeichnen. Die Phagozytoserate der Mikroglia von Hunden der Gruppe II war auch hier höher als die der Gruppe I (um den Faktor 1,3) und der Negativkontrolle (um den Faktor 1,5). Die höhere Phagozytoserate der Hunde der Gruppe II war jedoch auch hier nicht statistisch signifikant.

In einem weiteren Auswertungsschritt wurde der Unterschied in der Phagozytoserate von nicht-opsonierten zu opsonierten *Staphylococcus aureus* differenziert (vgl. Abb. 26). Dazu wurde im Auswerteprogramm Cell-Quest® die nicht-opsonierte Zellpopulation in der Darstellung als Dot Plot mit den Parametern F11 und SSC bis auf 2 % der Zellen ausgegrenzt. Das so gesetzte gate wurde für die erneute Auswertung des Anteils Phagozytose-positiver

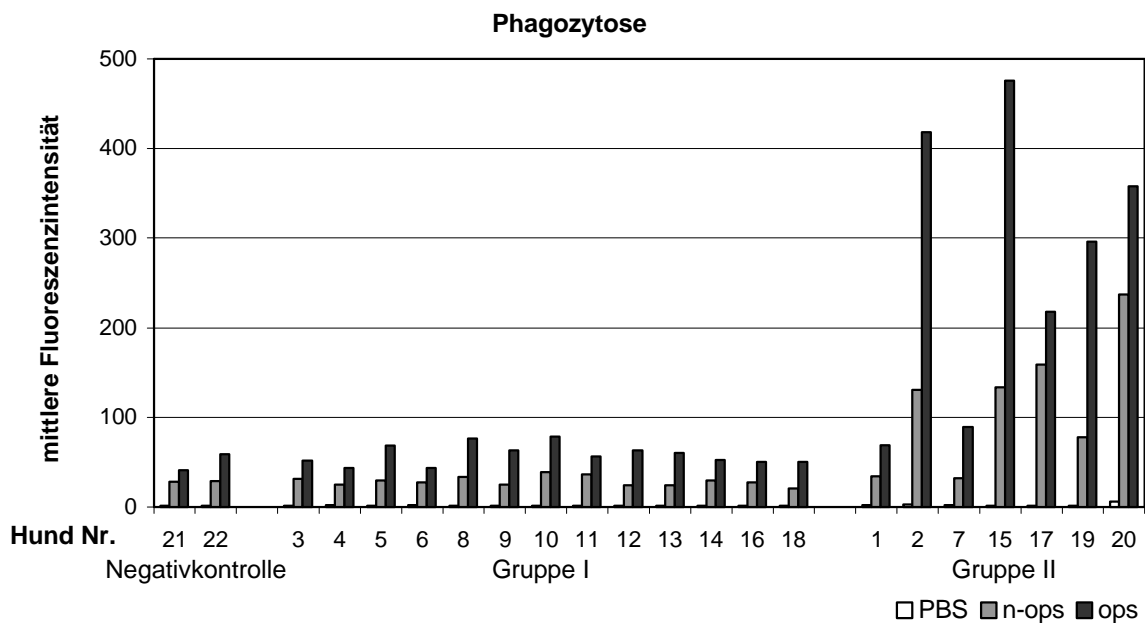
Mikroglia nach Opsonisierung der Bakterien beibehalten, um den Unterschied zu verdeutlichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 dargestellt.



**Abb. 28:** Differenz der Phagozytoseraten der Mikroglia für nicht-opsonierte (= n-ops) und opsonierte (= ops) *Staphylococcus aureus*

Die in Abb. 28 dargestellten Resultate dokumentieren, dass sich die Phagozytoseraten der drei Versuchsgruppen für opsonierte Staphylokokken im Vergleich zu den nicht-opsonierten kaum unterschieden. Vielmehr zeigten die Werte innerhalb aller Versuchsgruppen große Schwankungen, ohne dass eine Abhängigkeit von der Versuchsgruppenzugehörigkeit und somit der ZNS-Läsionen vorhanden ist. Die Opsonisierung der Bakterien führte bei allen Hunden zu einer stimulierten Phagozytose (Vergleich der Raten für opsonierte und nicht-opsonierte Bakterien). Im arithmetischen Mittel der Gruppe II war eine Steigerung der Rate um das 6,6fache, für die Gruppe I um das 7,1fache und für die Negativkontrolle um das 6,9fache zu verzeichnen.

Neben der Ermittlung des prozentualen Anteils phagozytischer Mikrogliazellen interessierte auch die Intensität der Phagozytose. Als ihr relatives Maß diente die Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität. Das Ergebnis ist in Abb. 29 dargestellt. In Bezug auf die Phagozytoseintensität fielen wiederum deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen II, I und der Negativkontrolle auf.



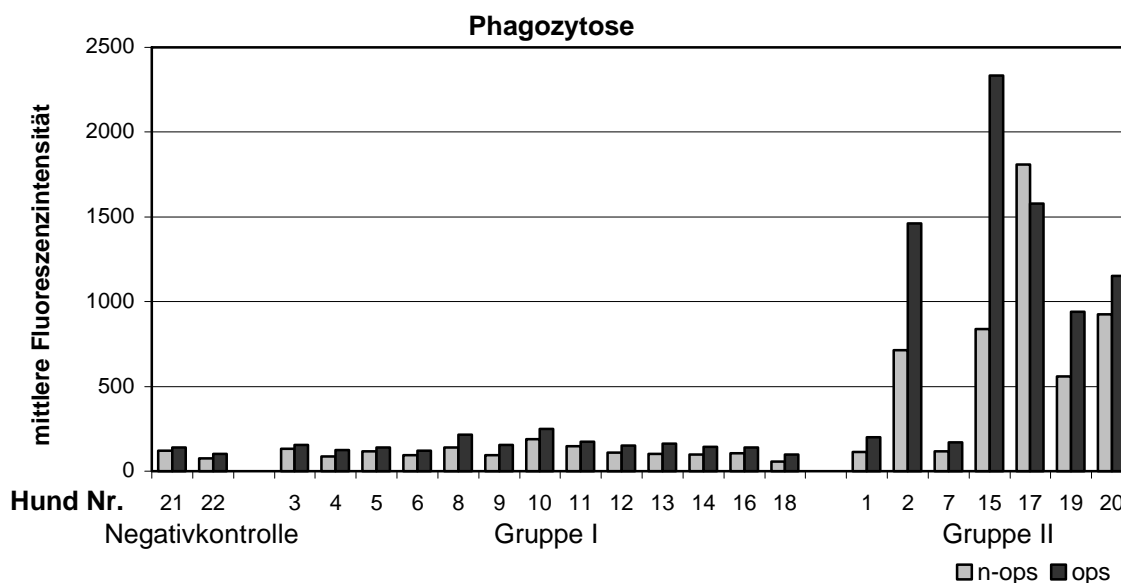
**Abb. 29: Phagozytoseintensität der Mikroglia ex vivo**

Als Vergleich der Phagozytoseintensität der Mikroglia für nicht-opsonisierte (= n-ops) und opsonisierte (= ops) Staphylokokken wurde ein Ansatz der Mikroglia mit PBS herangezogen. Die Phagozytoseintensität der Gruppe II war deutlich höher als bei Gruppe I und der Negativkontrolle.

Für die nicht-opsonisierten Staphylokokken zeigte sich bereits eine deutliche Phagozytoseintensität der Mikroglia. Dabei wies die Mikroglia der Hunde der Gruppe II die größte Phagozytoseintensität auf. Sie war im arithmetischen Mittel mit statistischer Signifikanz ( $p < 0,05$ ) um den Faktor 4 höher als bei den Hunden der Gruppe I und den Hunden der Negativkontrolle.

Bei den opsonisierten Staphylokokken entfaltete die Mikroglia der Hunde der Gruppe II wiederum die größte Phagozytoseintensität. Im Vergleich zu der Gruppe I war sie um das 4,7fache und im Vergleich mit der Negativkontrolle um das 5,5fache höher. Die aufregulierte Phagozytoseaktivität der Mikroglia der Hunde der Gruppe II war statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Um eine Steigerung der Phagozytoseintensität nach Opsonisierung beurteilen zu können, fand die Auswertung in analoger Weise zur Bestimmung der Phagozytoserate statt. Dementsprechend wurde das für die Differenzierung der Phagozytoserate von n-ops zu ops gesetzte gate erneut verwendet. Es diente somit auch als Grundlage der Differenzierung der Phagozytoseintensität der Mikroglia ohne (n-ops) und mit Opsonisierung (ops) der Bakterien. Das Resultat ist in Abb. 30 dargestellt.



**Abb. 30:** Differenz der Phagozytoseintensität der Mikroglia für nicht-opsonierte (= n-ops) und opsonierte (= ops) *Staphylococcus aureus*

Die Mikroglia der Hunde der Gruppe II wies eine deutlich höhere Phagozytoseintensität sowohl für nicht-opsonierte als auch für opsonierte Staphylokokken auf. Im Vergleich zur Negativkontrolle waren die Werte für die nicht-opsonierten um das 7,3fache und für opsonierte Staphylokokken um das 9,2fache höher. Es zeigten sich vergleichbare Werte im Verhältnis der Gruppe II zur Gruppe I (6,4fach höhere Werte für nicht-opsonierte und 7,2fach höhere Werte für opsonierte Staphylokokken). Für diese Intensitätssteigerung der Phagozytose konnte eine statistische Signifikanz ermittelt werden ( $p < 0,05$  %).

#### 4.2.8 Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen auf Monozyten im Verlauf des Challenge-Versuchs (Tag 6 p.i. bis zur Euthanasie)

Nach der Isolierung der PBMCs wurden die Monozyten anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert und in ein gate eingefasst. Die Expression folgender Oberflächenmoleküle auf Monozyten wurde vom 6. Tag nach Challenge/Belastungsinfektion im Abstand von zwei bis drei Tagen bis zur Euthanasie der Hunde gemessen: CD18, CD11b, CD45, CD44, CD14, CD1c, B7-1, B7-2 und MHC I.

Mittels der Expression von CD3, CD4, CD8 $\alpha$  und CD21 konnte eine Kontamination mit Lymphozyten bzw. die Genauigkeit des gesetzten gates um die zu untersuchenden Monozyten überprüft werden. Da der prozentuale Anteil positiver Zellen für diese Antigene jedoch sehr

niedrig war, kann von einer vernachlässigbar geringen Kontamination mit Lymphozyten ausgegangen werden.

Die Ergebnisse der Messtage wurden jeweils als arithmetischer Mittelwert für die Hunde der Gruppe I und der Gruppe II zusammengefasst und miteinander verglichen. Der Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen ist in Kurvendiagrammen dargestellt. Dazu wurden auf der Abszisse die Messtage, auf der Ordinate die Expressionsrate bzw. die Expressionsdichte verzeichnet.

Bei Betrachtung der durchflusszytometrischen Ergebnisse der indirekten Membranimmunfluoreszenz wird deutlich, dass der Anteil positiver Monozyten für die Expression von CD18, CD11b, CD45, CD44 (nur bis Tag 10 p.i. gemessen), CD14, B7-2, CD3, CD4, CD8 $\alpha$ , CD21 und MHC I von Tag 6 p.i. bis zur Euthanasie kaum eine Veränderung aufweist (s. auch SCHREINER 2001). Die nachfolgende Tabelle zeigt die arithmetischen Mittelwerte der Expression des jeweiligen Oberflächenmoleküls.

Auf Monozyten exprimiertes Antigen	Prozentualer Anteil exprimierender Monozyten ( $\bar{x}$ )
CD18	95,3
CD11b	92,8
CD45	95,7
CD44	93,2
CD14	68,7
B7-2	74,0
MHC I	93,9

**Tab. 11: Expression von Oberflächenantigenen auf Monozyten im Verlauf des Challenge-Versuchs**  
Die Werte für den Anteil exprimierender Monozyten entspricht dem arithmetischen Mittel aller Hunde an allen Messtagen.

Exemplarisch sind für MHC I und CD14 der Anteil positiver Monozyten im Verlauf des Challenge-Versuchs dargestellt (s. Abb. 31).

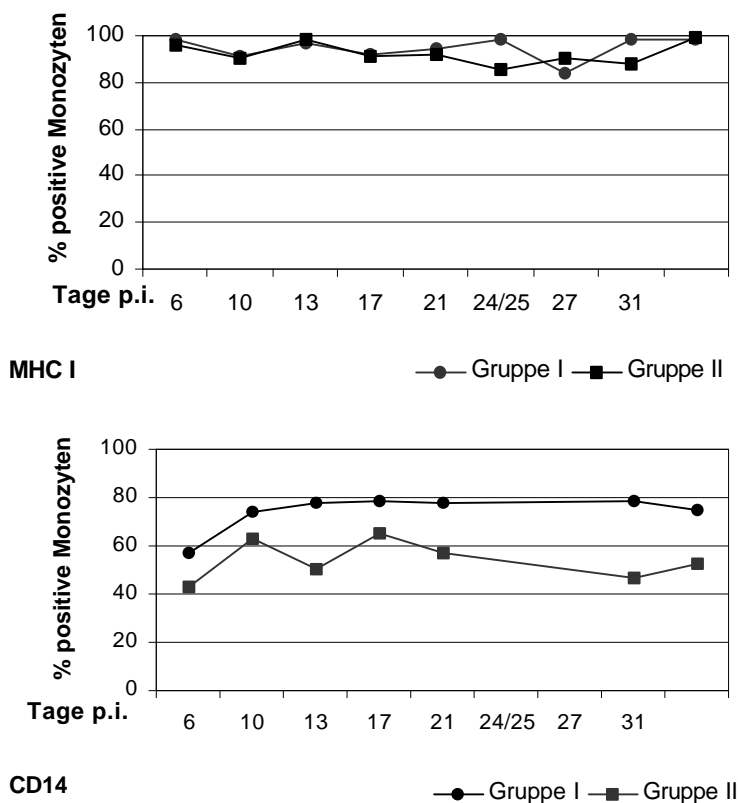


Abb. 31: Prozentualer Anteil MHC I und CD14 positiver Monozyten im Verlauf des Untersuchungszeitraumes vom Tag 6 p.i. bis zur Euthanasie

Der prozentuale Anteil positiver Monozyten für CD1c stieg bei der Gruppe I im Verlauf der Untersuchung vom Tag 6 p.i. (30,1 %) bis zum Tag 30 p.i. (97,0 %) kontinuierlich an.

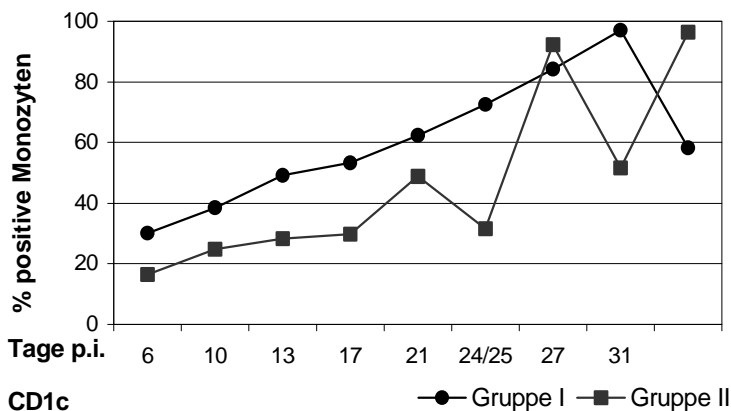
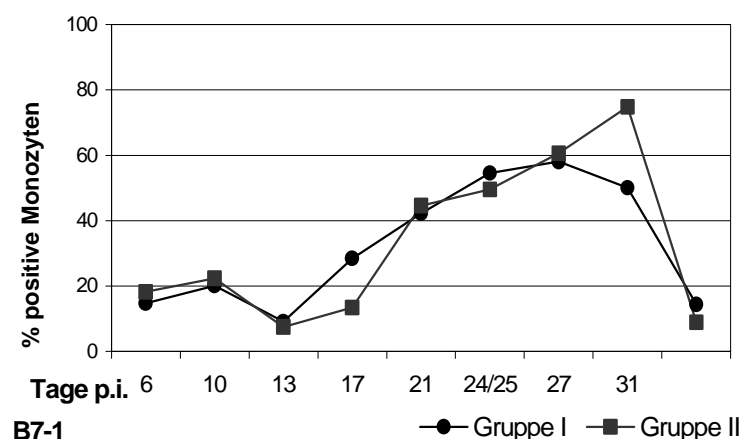


Abb. 32: Prozentsatz CD1c-positiver Monozyten von Tag 6 p.i. bis zur Euthanasie  
Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten der Gruppe I im Vergleich zu den Mittelwerten der Gruppe II.

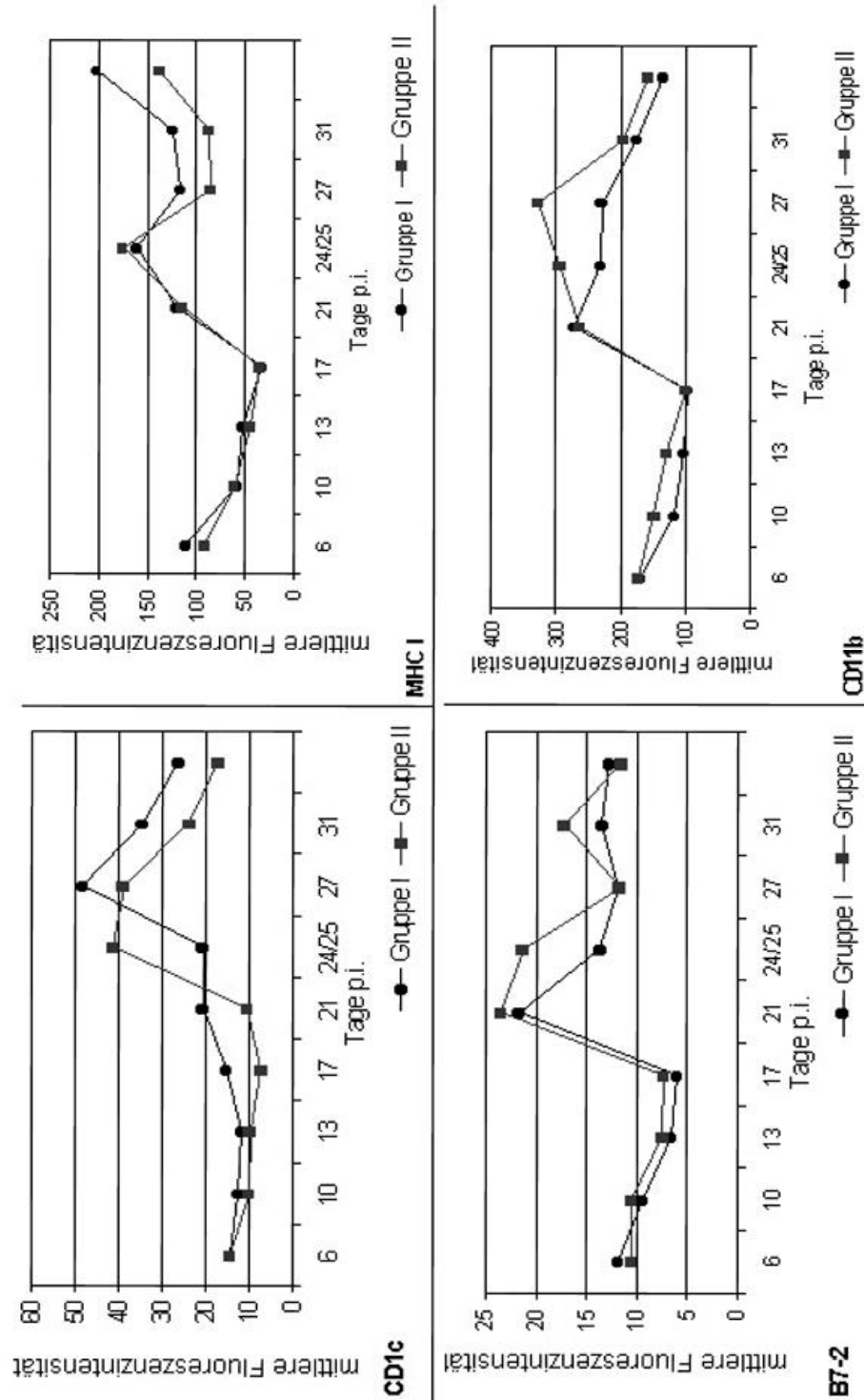
Am Tag der Euthanasie wiesen die Werte einen deutlichen Abfall im Vergleich zum Tag 30 p.i. auf (im arithmetischen Mittel aller Hunde der Gruppe I um 38,7 %). Insgesamt stiegen im Untersuchungszeitraum auch die Werte für die Gruppe II an, sie wiesen jedoch einige Schwankungen auf. Die Werte für die Gruppe I lagen im arithmetischen Mittel um 13,9 % höher als die Werte der Gruppe II (s. Abb. 32).

Der Anteil B7-1 exprimierender Monozyten erhöhte sich bei beiden Versuchsgruppen im Verlauf des Untersuchungszeitraumes vom 13. Tag p.i. bis zum Tag 27 bzw. 31 p.i. Die Werte stiegen bei Gruppe I von 9,1 % am Tag 13 p.i. bis auf 58,1 % am Tag 27 p.i. und für Gruppe II von 7,6 % am Tag 13 p.i. bis auf 75 % am Tag 30 p.i. – diese Zunahme B7-1 exprimierender Monozyten war jedoch nicht so stark ausgeprägt, wie für CD1c. Im Anschluss an Tag 27 bzw. 31 p.i. war für beide Versuchsgruppen ein Abfall der Werte zu verzeichnen (s. Abb. 33).



**Abb. 33: Prozentsatz B7-1-positiver Monozyten von Tag 6 p.i. bis zur Euthanasie**  
Die aufgetragenen Werte entsprechen den Mittelwerten der Gruppe I im Vergleich zu den Mittelwerten der Gruppe II.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für die mittlere Fluoreszenzintensität waren im Verlauf des Untersuchungszeitraumes für CD11b, CD1c, B7-2 und MHC I Schwankungen in der Expression der Oberflächenmoleküle zu verzeichnen. Im Allgemeinen war zunächst eine aufregulierte Expression bis Tag 24 bis 27 und daraufhin eine Abregulation der Expression zu verzeichnen (s. Abb. 34).



**Abb. 34:** Aufregulation der Expressionsdichte von CD1c, MHC I, B7-2 und CD11b auf Monozyten  
Die mittlere Fluoreszenzintensität gilt als relatives Maß der Expressionsdichte der Oberflächenmoleküle.

Für CD 18, CD 45, CD 44, CD 14 und B7-1 wurden keine Veränderungen in Bezug auf die Expressionsdichten der Oberflächenmoleküle im Untersuchungszeitraum beobachtet.

## 5 Diskussion

Mit der vorliegenden Arbeit sollten zwei Ziele erreicht werden: Neben der Etablierung einer Methode zur Isolierung caniner Mikroglia in Anlehnung an andere Spezies, sollte als Schwerpunkt die immunphänotypische und funktionelle Charakterisierung der Mikroglia ex vivo bei Hunden erfolgen, die nach Staupevirusinfektion typische ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung aufwiesen. Es konnten deutliche Unterschiede zu gesunden Hunden herausgestellt werden, auf deren Grundlage Rückschlüsse auf den Beitrag der Mikroglia zur Pathogenese der Staupe gezogen werden können.

Die Staupevirus-Studie fand im Rahmen eines Impfstoffversuchs mit Challenge-Infektion in der Schweiz statt. Als Probanden wurden 20 gleichaltrige Swiss-Beagle aus zwei Würfen der gleichen SPF-Zucht herangezogen, um eine alters- bzw. genetisch-bedingte Beeinflussung der Ergebnisse weitestgehend auszuschließen.

Während es inzwischen einige Studien über die Funktionen der Mikroglia anderer Spezies im normalen und erkrankten ZNS auf der Grundlage von In-vitro-Versuchen gibt, wurden Untersuchungen an ex vivo isolierten Mikrogliazellen bisher nur selten (HEIN et al. 1995) und beim Hund noch nicht durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde somit zum ersten Mal eine Untersuchung der Mikroglia ex vivo bei Hundestaupe durchgeführt. Dadurch sollten In-vitro-Studien ergänzt werden, um über pathogenetische Vorgänge in vivo Erkenntnisse zu gewinnen. Hundestaupe fungiert neben EAE bei Nagetieren (WEKERLE et al. 1986) als Tiermodell für Multiple Sklerose, um pathogenetische Vorgänge, die zur Demyelinisierung führen, zu erforschen. Staupe hat als Modell jedoch den Vorteil, eine natürliche Infektionskrankheit zu sein.

In der folgenden Diskussion wird zunächst auf die methodischen Aspekte der Isolierung caniner Mikroglia und deren phänotypische Charakterisierung eingegangen. Im Anschluss daran werden die Ergebnisse des Virusnachweises und der immunphänotypischen und funktionellen Untersuchung der Mikroglia ex vivo bei Hundestaupe sowie der Vergleich der Mikroglia mit den Monozyten bewertet. Abschließend wird die mögliche Beeinflussung der Pathogenese der ZNS-Läsionen durch die Mikroglia erörtert.

## 5.1 Methode der Mikrogliaisolierung

Die canine Mikroglia wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation nach dem Vorbild der Methoden von SEDGWICK et al. (1991) und FORD et al. (1995) zur Isolierung von Ratten-Mikroglia gewonnen. Diese Methoden wurden modifiziert und die Voraussetzungen und Parameter zur erfolgreichen Isolierung caniner Mikroglia im Rahmen von Vorversuchen festgelegt.

Zunächst wurde das Gehirngewebsmaterial in einem Dichtevorgradienten (bestehend aus den Percoll®-Dichten 1,124 und 1,030 g/ml) zur groben Vorreinigung und Eliminierung von Myelin und Zelldebris zentrifugiert. Zur differenzierten Aufreinigung wurde die aus dem Dichtevorgradienten oberhalb der 1,124 g/ml-Dichtestufe isolierte Zellpopulation auf den Dichtehauptgradienten aufgebracht. Wie in Vorversuchen aufgrund immunphänotypischer Identifizierung gezeigt werden konnte, sammelte sich die canine Mikroglia nach Zentrifugation oberhalb der Dichten von 1,077 und 1,066 g/ml Percoll® spezifisch an. Die Ansammlung der Mikroglia oberhalb zweier Dichten wurde auch bei anderen Spezies beobachtet und ist als Resultat ihrer unterschiedlichen Größe anzusehen (SEDGWICK et al. 1991; FORD et al. 1995; HEIN et al. 2000), die durch unterschiedliche Entwicklungs- bzw. Funktionsstadien bedingt sind.

Die Dichtegradientenzentrifugation stellt eine zuverlässige und sichere, jedoch arbeitsaufwendige Methode zur Isolierung caniner Mikroglia dar. Aus den 10-15 g eingesetztem Gehirngewebsmaterial konnten  $3 - 7 \times 10^6$  Mikrogliazellen mit einer Reinheit von 62 % bzw. – nach dem Setzen eines Auswertungsfensters – von 86-98 % isoliert werden. Dieses Resultat ist als gut zu bewerten und mit den bei anderen Spezies erhaltenen Resultaten vergleichbar. Allerdings müssen bei Versuchen an Nagetieren mehrere Gehirne gepoolt werden, um eine so hohe Zellzahl zu gewinnen (FORD et al. 1995; HANSEN, 1999). Beim Hund können gezielt Mikrogliazellen aus Gehirnregionen mit vermuteten Läsionen isoliert und untersucht werden. Eine parallele histopathologische Untersuchung der betroffenen Gehirnregion am selben Tier ist möglich.

## 5.2 Immunphänotypische Charakterisierung caniner Mikroglia

Die Mikroglia sollte – wie von FORD et al. (1995) beschrieben – durch die spezifische Expression von CD11b/c<sup>+</sup> und CD45<sup>low</sup> identifiziert werden. In den Vorversuchen wurde jedoch ermittelt, dass canine Mikroglia im Unterschied zu caninen Monozyten und zu Mikroglia anderer Spezies nur in sehr geringem Ausmaß CD45 exprimiert (s. 4.1.9.1), was eine Identifizierung der Mikrogliapopulation anhand dieses Charakteristikums ausschloss.

Daher wurde eine alternative Methode der Identifizierung caniner Mikroglia herangezogen. Die konstitutive Expression von CD18, CD11b und CD11c auf Mikroglia wurde bereits in der Literatur beschrieben und CD18 hatte sich in der Immunzytochemie als exzellenter Marker für Mikroglia erwiesen (AKIYAMA u. MCGEER 1990; TIPOLD et al. 1999). Daher wurde die gleichzeitige Expression von CD18, CD11b und CD11c als Merkmal zur Identifizierung herangezogen und ergab in der Durchflusszytometrie positive Ergebnisse für die isolierte homogene Zellpopulation relativ kleiner Zellen (s. 4.2.5.1). Immunhistochemisch wurde dieses Resultat durch zuverlässige Anfärbung der Mikrogliazellen mit CD18, CD11b und CD11c bestätigt.

Für die in dieser Studie ermittelte sehr geringe Expression von CD45 gibt es verschiedene Erklärungsansätze:

Ein defekter Antikörper als Grund für die geringe Anfärbung des CD45 auf Mikrogliazellen kann ausgeschlossen werden, da die indirekte Membranimmunfluoreszenz an Monozyten uneingeschränkt die erwarteten positiven Ergebnisse lieferte. Der arithmetische Mittelwert betrug 94,2 %. Die Funktionalität des Antikörpers gegen CD45 ist somit nachgewiesen und kann nicht als Grund für ein falsch-negatives Ergebnis herangezogen werden.

Eine sterische Behinderung des Antikörpers gegen CD45 aufgrund gleichzeitiger Zugabe des Antikörpers gegen CD18 bzw. CD11b oder CD11c kann nicht für die geringe bis fehlende Anfärbung des CD45 der caninen Mikroglia verantwortlich gemacht werden. In den Vorversuchen wurden zusätzlich Färbungen durchgeführt, bei denen der Antikörper gegen CD45 der einzige primäre Antikörper war. Auch mit dieser Methode war keine CD45-Expression der Mikroglia feststellbar.

FORD et al. (1995) stellen dar, dass CD45 auf der Mikroglia wesentlich geringer exprimiert wird als auf Leukozyten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Expression des CD45 auf

caniner Mikroglia so gering ist, dass die Detektionsgrenze mit den Methoden der indirekten MIF und der anschließenden Messung in der Durchflusszytometrie nicht erreicht wird. Als Reaktion auf entzündliche Veränderungen wurde jedoch eine Aufregulation der Expression des CD45 beobachtet, die vergleichbare Werte wie bei Leukozyten erreicht (FORD et al. 1995). In dieser Studie konnte jedoch keine aufregulierte Expression des CD45 bei Hunden mit virusinfizierten Mikrogliazellen und staupebedingten Läsionen im ZNS (=Gruppe II) beobachtet werden.

Da verschiedene epitoprestingierte Antikörper gegen CD45, die Leukozyten färben konnten, bei Mikroglia auch nur eine geringgradige Färbung erzeugten (Ergebnisse nicht gezeigt), liegt die Vermutung nahe, dass dieses Ergebnis nicht auf eine fehlende Epitoperkennung zurückzuführen ist.

Spezies-Unterschiede des Immunphänotyps der Mikroglia von Maus, Ratte und Mensch in der Expression einzelner Moleküle sind beschrieben (STREIT 1995). Daher ist anzunehmen, dass die sehr geringe Expression des CD45 auf caniner Mikroglia eine Spezifität des Hundes darstellt.

Die Verunreinigung der isolierten Mikrogliazellpopulation mit anderen Zellen, wie z.B. Leukozyten, kann aufgrund folgender Überlegungen und Ergebnisse ausgeschlossen werden:

Eine wichtige Voraussetzung um eine Verunreinigung zu vermeiden, war eine effektive Perfusion des Gehirns. Durch die Perfusion wurde der Großteil der Blutzellen entfernt, bevor ihre Diffusion aus der Blutbahn in das Gehirngewebe nach postmortaler Stase des Blutkreislaufs stattfinden konnte. Die Perfusion konnte durch das blass rosafarbene Aussehen und das Fehlen prominenter Blutgefäße bei Gehirnentnahme bzw. bei der histopathologischen Untersuchung bestätigt werden.

Durchflusszytometrisch konnte nachgewiesen werden, dass die isolierte Zellsuspension – außer der als Mikroglia identifizierten relativ homogenen Population – kaum andere Zellen mit abweichender Morphologie enthielt.

Eine differenzierte Unterscheidung von Mikrogliazellen und kontaminierenden Zellen bietet zudem die Betrachtung der Immunphänotypen. Monozyten exprimieren einen charakteristischen Phänotyp von CD11b/c<sup>+</sup> und CD45<sup>high</sup>, was sie deutlich von der Mikroglia unterscheidet (CD11b/c<sup>+</sup> und CD45<sup>low</sup>; FORD et al. 1995). Durchflusszytometrisch konnte das

Vorhandensein von Monozyten aufgrund des Fehlens von Zellen mit diesem Immunphänotyp ausgeschlossen werden. T-Lymphozyten zeigen eine Expression von CD3 und CD4 bzw. CD8 $\alpha$ , während B-Lymphozyten CD21 exprimieren. Der Anteil CD3-, CD4-, CD8 $\alpha$ - und CD21-exprimierender Zellen war jedoch sehr niedrig, so dass von einer vernachlässigbar geringen Kontamination der Mikrogliapopulation mit Lymphozyten ausgegangen werden kann (s. 4.2.5.9).

Das Vorhandensein von Gehirnzellen, wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen, kann ebenfalls anhand des Immunphänotyps ausgeschlossen werden. Keine dieser Zellen zeigt eine Expression von CD18, während die untersuchten Zellen im arithmetischen Mittel zu 93,3 % CD18 exprimierten. Astrozyten hätten zudem eine Aufregulation von CD44 gezeigt (ALLDINGER et al. 2000); die untersuchte Mikroglia wies jedoch nur eine marginale Expression und keine Aufregulation bei Staupe auf.

Anhand dieser Überlegungen kann als gesichert gelten, dass in den durchgeführten funktionellen Studien tatsächlich die von der Mikroglia vermittelten Funktionen untersucht wurden und keine Verfälschung durch andere Zellen vorliegt.

### **5.3 Staupevirusnachweis in Mikrogliazellen und Histopathologische Untersuchung**

Auf der Grundlage der histopathologischen Diagnose wurden die 20 Staupevirus infizierten Hunde in zwei Gruppen eingeteilt:

Gruppe I umfasste 13 Hunde, die sich nach anfänglicher Krankheitsphase erholten und bis auf vereinzelte Mikrogliaknötchen keine Veränderungen im ZNS aufwiesen. Zu den Hunden der Gruppe I zählte auch Hd. 18, der nicht-immunisierten Positivkontrollgruppe des Impfstoffversuchs. Die Genesung eines infizierten ungeimpften Hundes stimmt mit Beobachtungen aus vorhergehenden Studien mit experimentellen Staupeversuchen überein (TIPOLD et al. 1999), bei denen eine genetisch bedingte Resistenz als mögliche Begründung angeführt wurde. Als Abweichung von der physiologischen Norm wurden im ZNS von Hd. 18 - wie auch bei zwei anderen Hunden, die geimpft waren – histopathologisch Mikrogliaknötchen diagnostiziert. Auch diese Beobachtung korreliert mit Ergebnissen aus früheren Staupeinfektionsversuchen (TIPOLD et al. 1999). Obwohl bei keinem der drei Hunde Staupevirus nachgewiesen werden

konnte, spricht das Vorhandensein der Mikrogliaknötchen für eine transiente Präsenz des Virus im ZNS (TIPOLD et al. 1999).

Die übrigen sieben infizierten Hunde zeigten mittelgradige bis fulminante Staupe-Läsionen mit Demyelinisierung im ZNS, was zur Zuordnung zur Gruppe II führte. Sie wiesen zudem Symptome einer systemischen Staupe auf.

Zwei Hunde des gleichen Alters und dergleichen Rasse wurden als Negativkontrolle herangezogen. Ihr ZNS zeigte erwartungsgemäß keinen besonderen Befund.

Mittels des monoklonalen Antikörpers D110 konnte mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen Staupevirus in den ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung beobachtet werden (=Gruppe II). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen zu einem hohen Prozentsatz dabei Staupevirus infiziert sind. Immunhistochemisch wurde Virus nur im Bereich der Läsion gesehen. Nachdem die Mikrogliazellisolierung von einem größeren Bereich um den vierten Ventrikel erfolgte und nicht nur gezielt aus den Regionen mit Demyelinisierung, wurden die infizierten Mikrogliazellen sozusagen verdünnt. Es ist anzunehmen, dass direkt im Läsionsbereich der größte Teil der Mikrogliazellen infiziert ist. Bei den anderen Hunden (Negativkontrolle und Gruppe I) verlief der immunhistochemische und durchflusszytometrische Virusnachweis negativ. Das Vorhandensein virusinfizierter Mikrogliazellen bei Hunden der Gruppe II legt die Frage nahe, ob aus dieser Infektion eine veränderte Funktion der Mikroglia resultiert und infolge dessen die Pathogenese der Staupe-Läsionen und Demyelinisierung durch die Mikroglia beeinflusst wird.

Staupevirusnachweis mit Hilfe der Durchflusszytometrie bei permeabilisierten Zellen ist eine praktikable Methode und konnte durch immunhistochemische Untersuchungen bestätigt werden. Der Vorteil der Durchflusszytometrie liegt jedoch in der Einzelzelluntersuchung. So konnte in dieser Studie erstmals nachgewiesen werden, dass neben Astrozyten Mikrogliazellen im Läsionsbereich hochgradig virusinfiziert sind.

#### 5.4 Immunphänotypische Charakterisierung der Mikroglia ex vivo bei Staupe

Das ZNS wurde lange als immunologisch privilegiertes Organ angesehen. Dendritische antigenpräsentierende Zellen waren bisher im Gegensatz zu anderen Organen nicht identifiziert (PERRY u. GORDON 1988). In den letzten Jahren wurde dieses Konzept kontrovers diskutiert, nachdem unter anderem die Expression von MHC gefunden wurde. Als Zelle, die vorrangig MHC exprimierte, konnte die Mikroglia identifiziert werden (STREIT 1989). Anhand verschiedener Forschungsergebnisse hat sich das Bild vom immunologisch privilegierten ZNS weiter gewandelt.

Mikrogliazellen werden als grundsätzliche Immuneffektorzellen des Gehirngewebes (GIULIAN 1987) angesehen. Im Rahmen pathologischer Veränderungen des ZNS entfalten sie ihr immunologisches Potential. Dabei zeigen sie charakteristische Aktivitäten von Makrophagen (in Form unspezifischer Phagozytose von Antigen) und von professionellen antigenpräsentierenden Zellen. Diese funktionellen Merkmale spiegeln sich auch in dem charakteristischen Phänotyp der Mikroglia wider (ULVESTAD et al. 1994a).

Die Mikroglia wird als wichtigste **antigenpräsentierende Zelle** (APC = antigen presenting cell) des ZNS angesehen. Beim Menschen scheint sie gemäß WILLIAMS et al. (1992) und ULVESTAD et al. (1994a) als Effektor und Regulator der Demyelinisierung eine zentrale Rolle zu spielen. Als professionelle antigenpräsentierende Zelle muss sie verschiedene Voraussetzungen erfüllen: Sie muss befähigt sein, Antigen zu internalisieren und zu prozessieren, um auf beiden Klassen von MHC-Molekülen Antigen präsentieren zu können. Zusätzlich zu MHC I und II muss die Mikroglia als antigenpräsentierende Zelle co-stimulierende Signale (B7-1 und B7-2) exprimieren, die die Proliferation der T-Zellen als immunkompetente Zellen und ihre Differenzierung zu Effektorzellen steuern. Eine Expression von Molekülen für die Bindung von T-Zellen ist Voraussetzung für die sich anschließenden adhäsiven Interaktionen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Untersuchung der Mikroglia ex vivo im Hinblick auf die Funktion als APC betrachtet werden.

Der Anteil **MHC I-** und **MHC II-**exprimierender Mikrogliazellen ex vivo war mit 95,6 % (MHC I) und 93,4 % (MHC II) im arithmetischen Mittel für alle Hunde sehr groß (s. 4.2.5.6). Dabei war kein Unterschied zwischen Hunden mit ZNS-Läsionen aufgrund der Staupe-

infektion (Gruppe II) im Vergleich zu Hunden ohne besonderen Befund im ZNS (Gruppe I) feststellbar. In Bezug auf die Expressionsdichte war jedoch eine signifikante Aufregulation für MHC I und MHC II bei Hunden der Gruppe II feststellbar. Diese Aufregulation wurde auch bei Virusinfektionen und pathologischen Veränderungen des ZNS anderer Ätiologie beobachtet (MCGEER et al. 1988; STREIT et al. 1988; SEDGWICK et al. 1991; THOMAS 1992; DAVIS et al. 1994; GEHRMANN u. KREUTZBERG 1995).

Als Ausnahmen zeigten auch Hd. 12 und Hd. 18 der Gruppe I eine aufregulierte Expression der beiden Oberflächenmoleküle, allerdings nicht so ausgeprägt, wie bei den Hunden der Gruppe II. Dies ist im Zusammenhang mit der vermuteten transienten Infektion des ZNS der beiden Hunde mit Staupevirus zu betrachten. Die Aufregulation der MHC-Moleküle spricht für eine verstärkte Präsentation von Antigenen durch die Mikroglia.

Die Expression der MHC-Moleküle ist ein Hinweis dafür, dass es sich bei Mikrogliazellen um immunkompetente Zellen des Nervensystems handelt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Antigen-Präsentation zur Vermittlung der T-Zellantwort im Rahmen der immunologischen Effektorfunktion der Mikroglia (STOLL u. JANDER 1999). Mit Hilfe von MHC I kann die Mikroglia Staupeviren aus dem Zytosol prozessieren und die Peptide den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentieren, die bei Hundestaupe sehr frühzeitig vor allem in der weißen Substanz auftreten (TIPOLD et al. 1999; WUNSCHMANN et al. 1999). Mittels MHC II kann von Mikrogliazellen phagozytiertes Antigen prozessiert und eine Interaktion mit den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen induziert werden. Eine Aufregulation von MHC II konnte immunhistochemisch bereits von ALLDINGER et al. (1996) bei Staupeenzephalitis gezeigt werden.

Auch im gesunden ZNS ist das Vorhandensein einer Zellpopulation, die konstitutiv MHC II exprimiert, wichtig für die Kapazität von T-Zellen, Fremd- oder Autoantigene zu erkennen (WEKERLE et al. 1986). Eine konstitutive Expression von MHC II wird durch den hohen Prozentsatz MHC II-exprimierender Mikrogliazellen bei den Hunden 21 und 22 nahegelegt.

Neben den klassischen Molekülen zur Antigenpräsentation (MHC I und II) exprimiert die canine Mikroglia ex vivo außerdem **CD1c** (75,6% im arithmetischen Mittel, s. 4.2.5.2), von dem angenommen wird, dass es der Präsentation nicht-peptidischer Lipid- und Glykolipid-Antigene dient (JANEWAY u. TRAVERS 1997; BUSSHOF et al. 2001).

In Bezug auf die Dichte des exprimierten CD1c konnte bei Hunden der Gruppe II eine signifikante Aufregulation im Vergleich zur Negativkontrolle und zur Gruppe I festgestellt werden und zwar vor allem bei den Hunden mit fulminanter Demyelinisierung. Eine Aufregulation der Expression wurde auch bei EAE gefunden (BUSSHOFF et al. 2001), die ein oft genutztes Modell für Studien von ZNS-Entzündungen mit Demyelinisierung und ein gut etabliertes Modell für MS ist (WEKERLE et al. 1986). Die Aufregulation der Expression von CD1c spricht für eine Aktivierung der Mikroglia und weist auf das Potential als antigenpräsentierende Zelle hin. Die präsentierten Lipid- oder Glykolipid-Antigene in dieser Studie könnten aus zwei Quellen stammen: Die aufregulierte Expression von CD1c korrelierte mit einem positiven Staupevirusnachweis in der Mikroglia, so dass das präsentierte Antigen zum einen von Bestandteilen der Virus-Lipidhülle stammen könnte. Zum anderen könnten die präsentierten Antigene Myelinbestandteile darstellen, die im Rahmen der Demyelinisierung bei nervaler Staupe an Integrität verlieren und von der Mikroglia als Myelindebris phagozytiert werden. Der Umstand, dass bei Hunden mit histopathologisch diagnostizierter Demyelinisierung eine signifikante Aufregulation der Expressionsdichte von CD1c feststellbar war, unterstreicht diese These. Aus der Präsentation von Myelinbestandteilen durch die Mikroglia lässt sich überdies ein Erklärungsansatz für das Auftreten von Autoantikörpern gegen Myelin in der chronischen Phase der nervalen Hundestaupe (KRAKOWKA et al. 1973) herleiten.

Die übereinstimmenden Ergebnisse der Aufregulation von CD1c auf Mikrogliazellen ex vivo bei EAE (BUSSHOFF et al. 2001) und – hier – bei Hundestaupe legen ein Modell nahe, das für CD1c eine wichtige Rolle bei Erkrankungen des ZNS mit Demyelinisierung vorsieht. Weitere Studien bei Erkrankungen anderer Ätiologie sind nötig, um abzuklären, ob dieses Reaktionsmuster für demyelinisierende Erkrankungen spezifisch ist.

Die canine Mikroglia exprimierte ex vivo **B7-2** und zu einem geringeren Prozentsatz **B7-1**, wobei der Anteil B7-1-positiver Mikrogliazellen bei Hunden der Gruppe II um den Faktor 5,1 höher war als bei der Gruppe I. Für die Expressionsdichte der beiden B7-Moleküle konnte für die Hunde der Gruppe II eine signifikante Aufregulation im Vergleich zur Gruppe I und zur Negativkontrolle ermittelt werden. Rattenmikroglia zeigte im Unterschied dazu ex vivo keine Expression von B7-1 und B7-2 (FORD et al. 1995, s. auch 4.2.5.5).

Eine Expression von B7-1 und die Aufregulation dieses Antigens bei Aktivierung mit IFN- $\gamma$  sowie in MS-Läsionen wurde auch bei humanen Mikrogliazellen *in vitro* gefunden (WILLIAMS et al. 1994a). In Co-Kultivierungsversuchen mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurde ein Clustering der T-Zellen um die aktivierte Mikroglia beobachtet (WILLIAMS et al. 1994a; ULVESTAD et al. 1994a). Eine deutliche, diffuse Ansammlung von T-Zellen wurde in Übereinstimmung dazu auch in demyelinisierten ZNS-Läsionen bei Hundestaupe beobachtet (TIPOLD et al. 1999) und zwar vermehrt dort, wo die Mikroglia eine eindeutige Aktivierung aufwies (TIPOLD et al. 1999). Diese Resultate reflektieren die Fähigkeit der caninen Mikroglia, costimulatorische Moleküle zur Differenzierung der T-Zellen zu exprimieren, und sprechen mit den Ergebnissen der Expression von MHC I, MHC II und CD1c für eine zentrale Rolle der Mikroglia in der Vermittlung der zellulären Immunantwort, die bei Hunden mit Staupevirus-infizierten Mikrogliazellen deutlich verstärkt ist.

Als Adhäsionsmolekül auf antigenpräsentierenden Zellen wird unter anderem das Oberflächenmolekül **ICAM-1** beschrieben (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Es bindet an das T-Zell-Integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) und vermittelt so die Adhäsion, die zur Abtastung der Zelle auf von MHC-Molekülen prozessiertem Antigen wichtig ist. ICAM-1 wurde in dieser Ex-vivo-Studie zu 90,8 % im arithmetischen Mittel aller Hunde auf der caninen Mikroglia exprimiert. Die Expressionsdichte war bei Hunden der Gruppe II im Vergleich zu Gruppe I signifikant aufreguliert. Die Hunde 4, 12 und 18 der Gruppe I zeigten ebenfalls eine leicht erhöhte Expressionsdichte (s. 4.2.5.4). Bei den beiden zuletzt genannten Hunden handelt es sich um die Probanden, die in der histopathologischen Untersuchung Mikrogliaknötchen aufwiesen, was als eine transiente Virusinfektion des ZNS gedeutet werden kann (TIPOLD et al. 1999). Auch die aufregulierte Expressionsdichte des ICAM-1 bei den Hunden 12 und 18 kann somit als Indiz der transienten Infektion gelten. Der hohe Anteil ICAM-1 exprimierender Mikroglia spricht – wie die Aufregulation der Expressionsdichte bei Hunden der Gruppe II – für eine Funktion der Mikroglia als antigenpräsentierende Zelle, die im Rahmen einer Virusinfektion die Anzeichen einer Aktivierung aufweist. Die Expression von ICAM-1 vermag zusätzlich die Ansammlung von T-Zellen an Stellen mit aktivierter Mikroglia (TIPOLD et al. 1999) zu erklären. ICAM-1 wird zudem auf

Endothelzellen exprimiert (JANEWAY u. TRAVERS 1997), was die T-Zelle nach Bindung befähigt, die Blutgefäßwände zu durchqueren.<sup>3</sup>

Zur Adhäsion von T-Zellen dienen unter anderem die Integrine (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Canine Mikroglia exprimiert konstitutiv die Integrine **CD18**, **CD11b** und **CD11c**, wie von AKIYAMA u. MCGEER (1990) für andere Spezies dargestellt. Während in der Literatur für alle drei Integrine eine aufregulierte Expression bei pathologischen Veränderungen im Gehirngewebe beschrieben wird (STREIT et al 1989; AKIYAMA u. MCGEER 1990), ist in dieser Studie lediglich die Aufregulation der Expression von CD11b beobachtet worden. Sie konnte erwartungsgemäß nur bei Hunden der Gruppe II festgestellt werden (s. 4.2.5.1).

Durch die Aufregulation des Oberflächenmoleküls CD11b auf der Mikroglia gibt es vermehrte Bindungsstellen, z.B. für Leukozyten aus dem Blut, die im Rahmen der Immunabwehr aus der Blutbahn zu den Entzündungsherden migrieren. Auch die aufregulierte Expression von CD11b kann als Erklärung für das in früheren Versuchen bei Hundestaube beobachtete Clustering der T-Zellen um aktivierte Mikroglia (TIPOLD et al. 1999) herangezogen werden.

Alle Oberflächenmoleküle, die bei Hunden mit staupevirusinfizierter Mikroglia und ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung eine Aufregulation ihrer Expressionsdichte aufwiesen (MHC I und II, CD1c, B7-1 und B7-2, ICAM-1 und CD11b), erfüllen Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr. Sie sind charakteristische Merkmale für eine klassische antigenpräsentierende Zelle und zudem wichtig für die Einwanderung und Adhäsion von Lymphozyten und Monozyten aus dem Blut. Obwohl die Funktion der Mikroglia als antigenpräsentierende Zelle *in vivo* noch nicht gesichert ist (THOMAS 1992) weist der *ex vivo* ermittelte charakteristische Phänotyp sehr stark auf diese Aktivität der Mikroglia hin.

Im Rahmen der Immunantwort wird der Mikroglia zudem **Makrophagen-Aktivität** zugeschrieben, die sich im Immunphänotyp der Mikroglia widerspiegelt (ULVESTAD et al. 1994a). Makrophagen sind zur Phagozytose durch Antikörper oder Komplement opsonisierter sowie zur Erkennung und Phagozytose nicht-opsonisierter Pathogene fähig. Dazu besitzen sie

---

<sup>3</sup> Die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen wurde in der hier präsentierten Studie nicht gemessen.

verschiedene Oberflächenrezeptoren, mit denen sie sowohl die opsonisierten Partikel als auch Elemente, die in vielen Pathogenen enthalten sind, erkennen können. Diese Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen sind z. B. CD11b/CD18 (= CR3 oder Mac-1), CD11c/CD18 (=CR4) und CD14. Sowohl CR4 als auch CD14 binden spezifisch bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Im Folgenden soll die Aktivität der Mikroglia als Makrophage diskutiert werden.

In dieser Studie wurde die Expression von **CD14** auf caniner Mikroglia untersucht. Im arithmetischen Mittel aller Hunde lag der Anteil exprimierender Mikrogliazellen bei 62,0%. Die Expression auf humaner Mikroglia wurde von BECHER u. ANTEL (1996) dargestellt, wobei die Expressionsdichte als gering beschrieben wird. Auch auf caniner Mikroglia war die Expressionsdichte von CD14 im Unterschied zu den für canine Makrophagen berichteten Werten (TIPOLD et al. 1998) sehr gering. Über eine Aufregulation konnte aufgrund von Problemen in der Versuchsdurchführung keine Aussage getroffen werden (s. 4.2.5.7). In Bezug auf den Anteil CD14 exprimierender Zellen besteht eine große Ähnlichkeit zwischen Makrophagen und Mikroglia, bezüglich der Expressionsdichte besteht jedoch eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung der beiden Zellpopulationen.

Die Expression von **CD44** fungiert als Zielsignal für Lymphozyten, indem sie die Lymphozyten über Interaktionen mit Hyaluronsäure zu spezifischen Effektorlokalisationen führt. Von der caninen Mikroglia wird CD44 nur zu einem geringen Prozentsatz exprimiert, was in Übereinstimmung zu Angaben in der Literatur steht (ALLDINGER et al. 2000). Dabei war kein Unterschied zwischen den Hunden der Gruppen I und II und der Negativkontrolle vorhanden. In Bezug auf die Expressionsdichte war auch keine Aufregulation bei Hunden der Gruppe II feststellbar (s. 4.2.5.8). Dieses Resultat stimmt ebenfalls mit den Beobachtungen von ALLDINGER et al. (2000) überein, die eine Aufregulation von CD44 in Staupeläsionen mit Demyelinisierung nur für Astrozyten beschreiben. Die hier fehlende Aufregulation dient somit auf der einen Seite dem Ausschluss einer Kontamination mit Astrozyten, auf der anderen Seite kann eine Beteiligung von CD44 auf Mikrogliazellen am Prozess der frühen Demyelinisierung weitestgehend ausgeschlossen werden.

Der Nachweis von **CD11d** verlief – wie auch in vorangegangenen Untersuchungen des ZNS bei Staupe (TIPOLD et al. 1999) – negativ (s. 4.2.5.1). CD11d scheint auf caniner Mikroglia

nicht exprimiert zu sein. Ebenso verlief auch der Nachweis von **ID11** negativ (s. 4.2.5.3). Dieses Oberflächenmolekül ist vor allem auf interstitiellen, dendritischen Zellen vorhanden. Entgegen der Beschreibung des Immunphänotyps aktivierter Mikroglia bei Ratten (FLARIS et al. 1993) wies die canine Mikroglia in dieser Studie keine Expression von **CD4** auf (s. 4.2.5.9).

Insgesamt bestätigen die immunphänotypischen Untersuchungen, dass Mikroglia viele morphologische und phänotypische Charakteristika mit Makrophagen und antigen-präsentierenden Zellen teilt. Ihre dendritische Morphologie, die Phagozytose-Kapazität (s. 5.5.2) und ihr Potential zur T-Zell-Stimulation befähigen die Mikroglia hervorragend dazu, Funktionen im Rahmen einer immunologischen Überwachung zur Aufrechterhaltung der Homöostase, wie auch als immunologische Effektorzelle bei pathologischen Veränderungen innerhalb des ZNS wahrzunehmen (ULVESTAD et al. 1994a). Die immunphänotypischen Eigenschaften zusammen mit der Fähigkeit, als Makrophage zu fungieren und immun-modulatorische Substanzen zu produzieren, legen nahe, dass Mikrogliazellen tatsächlich eine zentrale Rolle in einer Art intrinsischem Immunsystem des Nervensystems spielen.

## **5.5 Funktionelle Charakterisierung der Mikroglia ex vivo bei Staupe**

Bei Aktivierung im Rahmen pathologischer Veränderungen im ZNS zeigen Mikrogliazellen – als die Immuneffektorzellen des Gehirngewebes – neben den Eigenschaften als APC zusätzlich charakteristische Funktionen von Makrophagen (DEL RIO-HORTEGA 1932; GIULIAN 1987; ULVESTAD et al. 1994a). Diese umfassen neben der Phagozytose die Synthese einer Vielzahl potentiell schädlicher Faktoren (NATHAN 1987), wie z. B. reaktive Sauerstoffintermediate (ROS = reactive oxygen species; RUULS et al. 1995), deren Bildung in dieser Studie untersucht wurde. Die Abgabe der ROS erfolgt nach entsprechender Stimulation in einer explosionsartigen Kaskade, dem sogenannten „respiratory burst“ (auch „oxidative burst“).

### 5.5.1 Bildung reaktiver Sauerstoffmetaboliten ROS (reactive oxygen species)

Ziel der Untersuchung der ROS-Bildung war es, eine als Folge der Hundestaupe vorhandene funktionelle Aktivierung der Mikroglia anhand eines erhöhten „respiratory-burst“ mit Freisetzung von ROS nachzuweisen. Dazu musste zunächst eine unterschiedliche Voraktivierung der Mikroglia als Konsequenz ihrer Isolierung (z. B. mechanisches Reiben durch ein Sieb, Erwärmung auf 37 °C), die eine gewisse Stimulation hervorrufen könnte, ausgeschlossen bzw. ausgeglichen werden (s. 3.2.13.1). Obwohl bei allen Hunden die Methode der Isolierung der Mikroglia in gleicher Weise vorgenommen wurde, erfolgte vor Zugabe der Trigger für 15 min bei 37 °C eine Vorinkubation der Mikroglia aller Hunde, um die Vergleichbarkeit der ROS-Bildung sicherzustellen. Die in dieser Studie gemessenen Unterschiede in Bezug auf die Bildung von ROS sind somit als Folge der Staupevirusinfektion *in vivo* anzusehen.

Die Ergebnisse des ROS-Bildungs-Tests veranschaulichen sehr deutlich, dass die Mikroglia nach Aktivierung durch Staupevirusinfektion eine potente Quelle reaktiver Sauerstoffintermediate darstellt. Die Hunde der Gruppe II (mit typischen ZNS-Läsionen und Demyelinisierung) wiesen für den Anteil ROS-positiver Mikrogliazellen an der untersuchten Population signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Hunden der Gruppe I und der Negativkontrolle auf (s. 4.2.7.1).

Als Ausnahmen erwiesen sich die Hunde 4, 12 und 13 der Gruppe I, die für den prozentualen Anteil ROS-positiver Mikroglia relativ hohe Werte aufwiesen, die vergleichbar mit denen der Gruppe II waren. Die Hunde 12 und 13 fielen in der histopathologischen Untersuchung durch das Vorhandensein von Mikrogliaknötchen auf, die für eine transiente Infektion des ZNS mit Staupevirus sprechen: Die erhöhten Werte für den Anteil ROS-positiver Mikroglia könnten die noch bestehende Aktivierung der Mikroglia reflektieren.

Auch bezüglich der Intensität der ROS-Bildung wurden signifikant höhere Werte für die Hunde der Gruppe II ermittelt. Während die Hunde 4, 12 und 13 der Gruppe I bei der Bestimmung des Anteils ROS-positiver Mikroglia von den Ergebnissen ihrer Gruppenmitglieder abwichen, stimmten sie bezüglich der Intensität mit ihnen überein. Bei diesen Hunden bildeten also viele Zellen ROS, jedoch mit einer geringen Intensität. Die Intensität der ROS-Bildung dokumentiert entsprechend noch deutlicher die unterschiedliche funktionelle

Aktivierung der Mikroglia aufgrund der Staupevirusinfektion mit histopathologisch diagnostizierter Demyelinisierung.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Mikroglia eine deutliche und ausgeprägte Kapazität zur Bildung von ROS aufweist. Diese ist nach Aktivierung der Mikroglia bei Hunden mit staupevirus-infizierten Mikrogliazellen und typischen ZNS-Läsionen mit Demyelinisierung sowohl durch einen signifikant höheren Anteil ROS-produzierender Mikrogliazellen als auch – und vor allem – durch eine signifikant erhöhte Intensität der ROS-Bildung gekennzeichnet. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Studien der mit Demyelinisierung einhergehenden EAE bei Mäusen erzielt. Hier war eine signifikant erhöhte, spontane und durch Triggerung mit PMA induzierte ROS-Bildung im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachtet worden (RUULS et al. 1995). Die verstärkte Bildung von ROS führt zur Peroxidation von Lipiden und Glykolipiden, die Bestandteile von Myelin sind, was wiederum eine Degeneration der Myelinscheiden zur Folge hat. Dabei kann das Vorhandensein von – in der Mikroglia nachgewiesenen – Eisen-Ionen eine katalytische Rolle spielen (GRIOT et al. 1990). Für canine Makrophagen wurde nach Infektion mit Staupevirus *in vitro* kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Bildung von ROS festgestellt (BRUGGER et al. 1992), sie waren jedoch trotz Virusinfektion funktionell aktiv. Die in dieser Studie im Unterschied dazu *ex vivo* untersuchten Mikrogliazellen, die auf natürlichem Wege virusinfiziert waren, zeigen sogar eine gesteigerte Aktivität. Die Infektion der Mikroglia bewirkt also nicht deren Suppression, wie es für Lymphozyten beobachtet werden konnte (SCHREINER 2001).

In Bezug auf die Intensität der ROS-Bildung ist eine quantitative und qualitative Unterscheidung der eingesetzten Trigger möglich. Für alle drei eingesetzten Trigger finden sich Beschreibungen in der Literatur, die sie als effektive Stimulatoren der ROS-Bildung bei Monozyten/Makrophagen oder der Mikroglia beschreiben (HETIER et al. 1988; SUZUMURA et al. 1991; AGULLO et al. 1995; RUULS et al. 1995; SMITH et al. 1998; TIPOLD et al. 1998; POSSEL et al. 2000; FRANK 2000). Wie bereits in Zellkulturversuchen beobachtet, können Mikroglia und periphere Makrophagen dabei jedoch unterschiedliche Reaktionen auf die gleichen stimulierenden Signale zeigen (SMITH et al. 1998). So sind markante Unterschiede anhand der Ergebnisse für die Trigger feststellbar. Jeweils die stärksten Effekte (Anteil positiver Mikroglia und Intensität der ROS-Bildung) zeigte PMA in

einer Konzentration von 100 nmol/l, gefolgt von PMA in Kombination mit Ca-Ionophor A 23187. LPS stellte sich als am wenigsten effektiver Trigger heraus. Im Vergleich dazu wird LPS bei caninen Makrophagen als guter Trigger beschrieben (TIPOLD et al. 1998).

Die minime Reaktion der Mikroglia auf Triggerung mit LPS könnte in Zusammenhang mit der beobachteten geringen Expressionsdichte von CD14 stehen, der einen Rezeptor für LPS darstellt (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Die höhere Expressionsdichte von CD14 auf Makrophagen in Kombination mit der berichteten Effektivität des LPS für deren Triggerung ist als Beweis hierfür heranzuziehen. Eine Aufregulation von CD14 konnte aufgrund von Problemen in der Versuchsdurchführung nicht beobachtet werden. Erkrankungen des ZNS aufgrund bakterieller Infektionen könnten diesen Mechanismus im Rahmen einer Immunantwort der Mikrogliazellen verstärkt ansprechen. In diesem Fall wäre auch eine stärkere Effektivität der Triggerung der Mikroglia durch LPS zu erwarten.

### 5.5.2 Phagozytose-Test

Zunächst wurden die Mikrogliazellen – wie bei den Untersuchungen zur ROS-Bildung – für 15 min bei 37 °C vorinkubiert, um eine Beeinflussung des Phagozytose-Tests durch eine mögliche Aktivierung der Mikroglia bei ihrer Isolierung (ex vivo) auszuschließen (s. 3.2.13.2). Die Ergebnisse der unterschiedlichen Phagozytoseaktivität sind daher wahrscheinlich auf eine Aktivierung der Mikrogliazellen in vivo aufgrund der stattgefundenen Staupevirusinfektion zurückzuführen.

Die canine Mikroglia zeichnete sich durch eine intensive Phagozytose der FITC-markierten *Staphylococcus aureus* aus (s. 4.2.7.2). Diese war bereits sehr stark ausgeprägt, ohne dass die Bakterien durch Serum opsonisiert waren. Das kann zum einen bedeuten, dass die Mikroglia mit gleicher Herkunft wie die Monozyten als Makrophage per se eine starke Phagozytosekapazität aufweist, zum anderen, dass der Vorgang der Isolierung zu einer weiteren Aktivierung der Mikroglia und infolge dessen zu einer verstärkten Phagozytoseaktivität geführt hat.

Durch die Opsonisierung wurde generell eine weitere Steigerung der Phagozytoseintensität und des prozentualen Anteils phagozytischer Mikrogliazellen erreicht. Das Ausmaß der jeweiligen Steigerung war jedoch unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Hunde.

Der Anteil phagozytischer Mikrogliazellen als auch die Intensität der Phagozytose ist bei Hunden der Gruppe II signifikant höher als bei den Hunden der Gruppe I und der Negativkontrolle. Dieses Resultat gibt die Aktivierung der Mikroglia in vivo als Antwort auf die Staupevirusinfektion wider und dokumentiert, dass die Mikroglia wahrscheinlich schon in vivo eine verstärkte Phagozytoseaktivität aufwies und sich zum dritten Funktionsstadium, der „phagozytischen Mikroglia“ (STREIT et al. 1988, KREUTZBERG 1996), entwickelt hat. Für canine Makrophagen wurde nach Infektion mit Staupevirus in vitro kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Phagozytoseaktivität festgestellt (BRUGGER et al. 1992), was die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen auf Staupevirusinfektion zeigt, bzw. die Limitation von reinen In-vitro-Experimenten, wo die komplexe Zusammenarbeit von verschiedenen Zellpopulationen fehlt.

Die Stimulierung der Phagozytose bei der Opsonisierung wird über Fc- und Komplementrezeptoren vermittelt (ULVESTAD et al. 1994b u. c). Die letztgenannten erkennen spezifisch auf Pathogenen gebundene Komplementkomponenten, binden sie und erleichtern so die anschließende Phagozytose (VAN DER LAAN et al. 1996; JANEWAY u. TRAVERS 1997).

Rezeptoren für den Fc-Teil von Immunglobulinen sind auf phagozytischen Zellen, einschließlich Monozyten und insbesondere Mikroglia, sehr stark exprimiert. Es wird geschätzt, dass pro Mikrogliazelle  $10^4$  oder mehr Fc $\gamma$ RI-Rezeptor-Moleküle vorhanden sind (MCGEER et al. 1993).

Die Integrine CD18, CD11b und CD11c, die die Komplementrezeptoren CR3 und CR4 bilden, sind auf der caninen Mikroglia konstitutiv exprimiert. CR3 und CR4 binden spezifisch an inaktive Formen der Komplementkomponente C3b und stimulieren so die Phagozytose (JANEWAY u. TRAVERS 1997). Die konstitutive Expression dieser Antigene, besonders des CR3, spricht für eine generelle Befähigung der Mikroglia zur Phagozytose von opsonierten und nicht-opsonierten Pathogenen (ULVESTAD et al. 1994b; VAN DER LAAN et al. 1996). Das konnte durch Versuche mit dem Antikörper gegen CR3 gezeigt werden, wobei aus der Bindung des Antikörpers eine Inhibition der Phagozytose resultierte (MOSLEY u. CUZNER 1996).

Für CD11b war eine aufregulierte Expression bei Hunden der Gruppe II zu beobachten. Bei ihnen wies die Mikroglia zudem eine verstärkte Phagozytoserate und einen höheren Anteil

phagozytischer Mikrogliazellen auf. Die aufregulierte Expression des CR3 kann als Grundlage für eine verstärkte Phagozytose herangezogen werden, da aufgrund der effizienteren Bindung von opsonierten Pathogenen die Phagozytose erleichtert ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Mikroglia im Rahmen der Immunantwort bei Hundestaupe als aktiver Makrophage fungiert. Das impliziert eine gesteigerte Phagozytose der bei Hundestaupe vermehrt vorhandenen geschädigten Zellen und Myelinbestandteile.

## **5.6 Vergleich der Immunphänotypen von Mikroglia ex vivo und Monozyten**

Für die Expression der Mehrzahl der Oberflächenmoleküle wurde für Monozyten und Mikroglia eine große Übereinstimmung festgestellt (s. 4.2.6). Für CD45, CD44 und ICAM-1 wurde jedoch eine unterschiedliche Expression ermittelt. Während der prozentuale Anteil CD45- und CD44-exprimierender Monozyten wesentlich höher lag als bei der Mikroglia, verhielt es sich für ICAM-1 umgekehrt. Die unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen – insbesondere des CD45 – ermöglicht eine Differenzierung zwischen Monozyten ( $CD11b/c^+$  und  $CD45^{high}$ , FORD et al. 1995) und Mikroglia ( $CD11b/c^+$  und  $CD45^{low}$ , FORD et al. 1995). Sie bestätigt, dass bei der durchflusszytometrischen Messung Mikrogliazellen und keine perivaskulären Makrophagen untersucht wurden bzw. die Mikrogliapopulation nicht mit Monozyten kontaminiert war, da Zellen mit entsprechender Expression nicht gemessen wurden.

Die Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 vermittelt die Adhäsion der Monozyten an andere immunkompetente Zellen. Das ist für verschiedene Interaktionen im Rahmen der Immunabwehr von Bedeutung. Zudem wird eine Adhäsion an vaskuläres Endothel vermittelt, die (im Rahmen der Immunantwort) die Voraussetzung zur Extravasation und Migration zu Entzündungsherden schafft. CD44 ist somit ein Aktivitätsmarker. Die gemessene hohe Expression in dieser Studie kann Voraussetzung für das rasche Einwandern von Monozyten in das ZNS bei Hundestaupe sein.

Ein weiteres Adhäsionsmolekül ist ICAM-1, das auf den Monozyten jedoch nur in sehr geringem Maße exprimiert wird. Es vermittelt die Interaktionen mit T-Zellen und ist wichtig für die Antigen-Erkennung auf den MHC-Molekülen (JANEWAY u. TRAVERS 1997). In

der Anfangsphase der Erkrankung wird bei Hundestaupe eine starke Immunsuppression, auch der T-Zellantwort (SCHREINER 2001) gesehen. Trotzdem kommt es zu einem frühen Einwandern dieser Lymphozyten (TIPOLD et al. 1999) und zu einem Auftreten von aktivierten T-Zellen (SCHREINER 2001). Die Aktivierung der wenigen verbliebenen Zellen kann daher durch die Beeinflussung der Monozyten bedingt sein.

### **5.7 Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen auf Monozyten im Verlauf des Challenge-Versuchs**

Die Oberflächenantigene CD18, CD11b, CD45, CD44, CD14, B7-2 und MHC I wurden konstant von einem hohen Anteil Monozyten aller Hunde exprimiert (s. 4.2.8). Diese Expression spricht für eine wichtige Rolle der Monozyten im Rahmen der Immunantwort.

Für den Anteil CD1c- und B7-1-exprimierender Monozyten wurde im Verlauf der Studie bei Gruppe I und Gruppe II ein Anstieg festgestellt. Dieses Ergebnis spricht für eine verstärkte Rolle der Monozyten bei der Präsentation (glyko-) lipider Antigene (CD1c) sowie bei der Co-Stimulation von T-Lymphozyten (B7-1) im Rahmen einer stattgefundenen Staupevirusinfektion.

In Bezug auf die Expressionsdichte wurden für CD18, CD45, CD44, CD14 und B7-1 keine Änderungen im Verlauf des Challenge-Versuchs festgestellt. Für CD11b, CD1c, B7-2 und MHC I wurden jedoch zunächst Auf- und schließlich Abregulationen der Expressionsdichten der Monozyten beider Versuchsgruppen beobachtet. Dieser Immunphänotyp legt eine Funktion der Monozyten im Rahmen der zellulären Immunabwehr bei Staupevirusinfektion nahe. Dementsprechend wurde im Verlauf der Studie von den Monozyten vermutlich verstärkt sowohl peptidisches als auch (glyko-) lipides Antigen präsentiert (MHC I und CD1c). Die aufregulierte Expression von CD11b spricht für eine effizientere Adhäsion von T-Zellen zur Erkennung präsentierter Antigene. Außerdem vermittelt eine aufregulierte Expression von CD11b eine erleichterte Phagozytose von Pathogenen. Durch eine aufregulierte Expression von B7-2 kann vermutlich eine verstärkte Co-Stimulation von T-Zellen erreicht werden.

Im Ergebnis zeigten auch die Monozyten im Verlauf des Challenge-Versuchs Zeichen einer Aktivierung. Sie sind als immunologische Antwort der systemischen Staupevirusinfektion zu

deuten und bestätigen die Resultate von BRUGGER et al., der Makrophagen in vitro nach Staupevirusinfektion untersuchte (1992).

### **5.8 Beeinflussung der Pathogenese von Staupe-Läsionen im ZNS durch die Mikroglia**

Im Allgemeinen wird angenommen, dass eine direkte Interaktion von CDV mit Astrozyten und Oligodendrozyten das initiale Ereignis in dem bei akuter Hundestaupe zu beobachtenden demyelinisierenden Prozess ist (VANDEVELDE et al. 1982b; ZURBRIGGEN et al. 1998). Anhand von In-vitro-Studien beim Menschen wird überdies vermutet, dass die Mikroglia aufgrund ihrer makrophagenähnlichen Funktion als Effektor und Regulator für die Demyelinisierung von zentraler Wichtigkeit ist (WILLIAMS et al. 1992; ULVESTAD et al. 1994a).

Der in der vorliegenden Studie beobachtete Immunphänotyp der Mikroglia spiegelt ihre Funktionen als APC und intrinsischer Makrophage des ZNS wider (s. 5.4). Möglichkeiten zur Beeinflussung der Pathogenese der Demyelinisierung durch die Mikroglia sollen hier anhand der ermittelten Ergebnisse diskutiert werden.

Die Mikroglia exprimiert wichtige Oberflächenmoleküle zur Interaktion mit T-Zellen: die beiden MHC-Moleküle und CD1c zur Antigenpräsentation, B7-1 und B7-2 als co-stimulierende Moleküle sowie ICAM-1 und die Integrine zur Vermittlung der Zelladhäsion. Im Rahmen der Staupevirusinfektion weist die Mikroglia Anzeichen einer Aktivierung auf, die unter anderem durch die aufregulierte Expression dieser Oberflächenmoleküle dokumentiert wird. Eine Aufregulierung der Mikroglia sowie eine aufregulierte Expression von MHC II bei Staupe wurde bereits bei vorhergehenden Studien beschrieben (ALLDINGER et al. 1996; TIPOLD et al. 1999).

Die Aufregulation der Expressionsdichte der genannten Oberflächenmoleküle bildet die Grundlage der Vermittlung einer T-Zellantwort. Eine solche Interaktion der Mikroglia mit T-Zellen ist in vitro beobachtet worden. In Co-Kultivierungsversuchen mit CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten resultierte ein Clustering der T-Zellen um die Mikroglia und es wurde eine gemischte Lymphozyten-Reaktion initiiert (WILLIAMS et al. 1994a; ULVESTAD et al. 1994a). Eine deutliche diffuse Ansammlung von T-Zellen wurde in Übereinstimmung dazu

auch in demyelinisierten ZNS-Läsionen bei Hundestaupe beobachtet (TIPOLD et al. 1999). Diese frühe T-Zellantwort, die wahrscheinlich gegen CDV im ZNS gerichtet ist, existiert, obwohl zu diesem Zeitpunkt eine ausgeprägte Immunsuppression dominiert (TIPOLD et al. 1999).

Inwiefern die T-Zellen zur Demyelinisierung beitragen können, ist zur Zeit noch nicht bekannt. Denkbar ist eine Sekretion von Zytokinen, die den Prozess der direkten Gewebszerstörung durch das CD-Virus noch verstärken (TIPOLD et al. 1999). Eine solche Mikroglia vermittelte Zytotoxizität ist auch in klinischen Fällen von MS entscheidend in Gewebsschäden mit Funktionsverlust involviert (Übersicht bei SMITH 1999). Dabei wird vermutet, dass die Sekretion von TNF- $\alpha$  durch aktivierte T-Zellen (CHABOT et al. 1997) einen wesentlichen Beitrag leistet. In vitro wurde gezeigt, dass TNF- $\alpha$  einen zytotoxischen Effekt auf Myelin und Oligodendrozyten, die myelin-formierenden Zellen, ausübt (SELMAJ u. RAINE 1988).

Die Akkumulation von Immunzellen im ZNS in den frühen Stadien der Erkrankung erleichtert zudem die spätere Entwicklung einer lokalen Immunantwort und damit in Verbindung stehender immunpathologischer Komplikationen (TIPOLD et al. 1999). Die Expression der B7-Moleküle auf der Mikroglia befähigt sie dazu, eine T-Zell-Aktivierung zu initiieren und fortzuführen (WILLIAMS et al. 1994a) um Virusclearance zu erreichen. Bei einer länger andauernden viralen Infektion können neben der antiviralen Antwort auch T-Zellen z.B. für Myelinproteine sensibilisiert werden. Das kann zur Bildung von Autoantikörpern gegen Myelin führen (CERRUTI-SOLA et al. 1983; VANDEVELDE et al. 1986). Ähnlich wie bei Staupe wird auch bei EAE eine autoreaktive Myelinzerstörung beobachtet, verursacht durch zytotoxische T-Zellen.

Im Rahmen pathologischer Veränderungen im ZNS weist die Mikroglia typische Eigenschaften gewebspezifischer Makrophagen auf (DEL RIO-HORTEGA 1932; GIULIAN 1987; ULVESTAD et al. 1994a). Diese Eigenschaften umfassen die Synthese einer Vielzahl potentiell schädlicher Faktoren (NATHAN 1987). In der vorliegenden Studie wurde für die Hunde der Gruppe II eine deutliche Aktivität der ROS-Bildung der Mikroglia ermittelt, die signifikant die Aktivität bei den Hunden der Gruppe I und der Negativkontrolle überschritt. Eine verstärkte Kapazität der Mikrogliazellen zur ROS-Bildung wurde auch bei EAE

beobachtet. Das legt eine Beteiligung an der Pathogenese der Demyelinisierung bei EAE nahe (RUULS et al. 1995). Die Synthese von ROS durch Mikrogliazellen wird zudem als eine Ursache der fortlaufenden Pathologie im ZNS von AIDS-Patienten in Betracht gezogen (WILLIAMS et al. 1994b).

Myelin besteht vorwiegend aus Lipiden. In Reaktion mit ROS erfolgt eine Lipid-Peroxidation und somit die Zerstörung des Myelins. Dies kann als Erklärung der selektiven Verletzlichkeit der Oligodendrozyten und der durch sie formierten Myelinscheiden dienen (GRIOT et al. 1990). Die erhöhte ROS-Synthese durch Mikrogliazellen konnte in vorliegender Studie bei Hundestaupe erstmals ex vivo bewiesen werden. Bei Hundestaupe kommt es im Vergleich zu anderen viralen Enzephalitiden des Hundes zu einer überwiegenden Infektion der weißen Substanz. Die beeinflussenden Komponenten – Oligodendrozyten, Myelin, Astrozyten und virusinfizierte, aktivierte Mikroglia – sind allesamt an dieser Lokalisation im Gehirn vorhanden, wo auch die Demyelinisierung dominiert.

Als typischer Makrophage zeigt die Mikroglia zudem Phagozytoseaktivität, die bei Hunden mit Demyelinisierung aufgrund CDV-Infektion des ZNS gesteigert ist. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die demyelinisierenden Erkrankungen EAE und MS gefunden, bei denen die Mikroglia eine Phagozytose von Myelin zeigte (SMITH et al. 1998).

Für die Entfaltung der pathophysiologischen Phagozytoseaktivität spielen die Expressionen von Fc- und Komplementrezeptoren eine wichtige Rolle (VAN DER LAAN et al. 1996; JANEWAY u. TRAVERS 1997). Die Expressionen dieser Rezeptoren werden aber auch mit Demyelinisierungen in Verbindung gebracht, da im erkrankten ZNS auf Oligodendrozyten gebundenes IgG und Komplement gefunden wurde (ULVESTAD et al. 1994b und c).

Die Phagozytoseaktivität ist zudem in Zusammenhang mit einer Stimulation zur Aufrechterhaltung der Aktivierung der Mikroglia zu sehen. So wird die Phagozytose zum einen als effizientester Stimulus zur Induktion der APC-Kompetenz von Mikrogliazellen beschrieben (CASH u. ROTT 1994), zum anderen stellt sie einen potenten Trigger der „respiratory burst“-Aktivität der Mikroglia dar (WILLIAMS et al. 1994c; MOSLEY u. CUZNER 1996), die wiederum zur Demyelinisierung beiträgt. Diese Zusammenhänge spiegeln einen Zustand der fortgeführten Aktivierung der Mikroglia wider, in dem ein offensichtlicher negativer Feedback-Mechanismus zu fehlen scheint.

Die genauen Vorgänge, die in der akuten Phase der nervalen Staupen zur Demyelinisierung führen, sind nicht eindeutig identifiziert. Eine Beteiligung der Mikroglia an der Pathogenese (der Demyelinisierung) im Rahmen eines „Bystander-Mechanismus“ erscheint anhand der in der vorliegenden Studie ermittelten Ergebnisse als gesichert. Dabei ist besonders die gesteigerte ROS-Bildung und die Beeinflussung von T-Zellen, die bei Hundestaupen gehäuft im ZNS beobachtet werden, hervorzuheben. Als Immuneffektorzelle im Rahmen der Infektionsabwehr scheint nur ein sehr schmaler Grad der Balance zwischen den protektiven, den defensiven und den destruktiven Eigenschaften der Mikroglia zu bestehen.

Die vorliegende Studie unterstreicht, dass Hundestaupen ein wichtiges Tiermodell für Pathogenesestudien der Demyelinisierung bleibt. Im Unterschied zu EAE hat dieses Modell den Vorteil, eine natürlich vorkommende Erkrankung zu sein. Bei Hunden sind zudem am selben Tier Verlaufsuntersuchungen und Therapiestudien möglich.

Für die Spezifität dieser Resultate für Hundestaupen und Demyelinisierung spricht die Tatsache, dass die stärkste Mikrogliaaktivierung bei Hunden mit fulminanter Demyelinisierung auftrat, wohingegen bei erst beginnenden Läsionen bzw. bei genesenen Hunden die Aktivierung etwas weniger ausgeprägt war. Weitere Studien bei anderen Erkrankungen müssten allerdings diese Vermutung bestätigen.

## 6 Zusammenfassung

Die Staupevirusinfektion des Hundes ist eine durch ein Morbillivirus verursachte hochkontagiöse Infektionskrankheit. Die nervale Form geht im akuten Stadium mit einer Demyelinisierung ohne Entzündungsreaktion einher. Die Pathogenese der Demyelinisierung ist noch weitestgehend unklar.

Mikrogliazellen sind wichtige Immuneffektorzellen im ZNS. Im Rahmen pathologischer Vorgänge entfalten sie ihr immunologisches Potential. Diese Zellart könnte somit bei der Pathogenese der Demyelinisierung bei Staupeläsionen im ZNS eine entscheidende Rolle spielen. Ziel der Arbeit war es daher, im Rahmen eines Challenge-Experiments die Mikroglia von Hunden mit staupetypischer Demyelinisierung im ZNS ex vivo in der Durchflusszytometrie immunphänotypisch und funktionell zu charakterisieren und Unterschiede im Vergleich zu nach Virusinfektion genesenen Hunden ohne besonderen Befund im ZNS bzw. zu gesunden Hunden herauszustellen.

Zunächst wurde die Methode der Isolierung caniner Mikroglia etabliert. Das Gehirn wurde nach Perfusion und Entnahme in einem ersten Schritt mechanisch dissoziiert und anschließend enzymatisch aufgeschlossen. Nach Zentrifugation der so gewonnenen Gewebesuspension in einem Percoll®-Dichtevor- und -hauptgradienten sammelte sich die canine Mikroglia oberhalb der Dichten 1,077 und 1,066 g/ml spezifisch an. Mikroglia wurde über die durchflusszytometrisch ermittelte Expression von CD18 und CD11b/c identifiziert. Dieses Expressionsmuster wurde mittels immunhistochemischer Untersuchung bestätigt. Die Expression von CD45 auf caniner Mikroglia erwies sich im Unterschied zu anderen Spezies als sehr gering.

Im Rahmen einer Impfstudie wurde die Mikroglia von 20 Hunden nach Challenge-Infektion mit Staupevirus immunphänotypisch und funktionell untersucht. Die Hunde wurden anhand der histopathologischen Untersuchung des ZNS in zwei Gruppen eingeteilt; Hunde mit staupetypischen ZNS-Läsionen und Demyelinisierung und genesene Hunde ohne histopathologische Veränderungen bzw. mit vereinzelt Mikrogliaknötchen im Bereich des ZNS, die vermutlich eine transiente Virusinfektion widerspiegeln. Als Kontrollgruppe dienten zwei gleichaltrige gesunde Hunde derselben Rasse und desselben Wurfs. Für die Gewinnung von

Mikrogliazellen standen 10 bis 15 g Gehirngewebe aus dem Bereich des Kleinhirnbrückenwinkels zur Verfügung. Mittels Dichtegradientenzentrifugation konnten aus diesem Material  $3 - 7 \times 10^6$  Mikrogliazellen mit einer Reinheit von 62 % bzw. – nach dem Setzen eines Auswertungsfensters – von 86-98 % gewonnen werden.

Bei Hunden mit staupetypischen Läsionen und Demyelinisierung im ZNS konnte Staupevirus mittels des monoklonalen Antikörpers D110 in ex vivo-isolierter Mikroglia nachgewiesen werden. Dieser Staupevirusnachweis korrelierte mit dem immunhistochemischen Virusnachweis im ZNS. Zudem wies die Mikroglia bei diesen Hunden das immunphänotypische Profil einer aktivierten Zelle mit einer aufregulierten Expression von CD11b, CD1c, ICAM-1, B7-1 und B7-2, sowie MHC I und II auf. Dieses immunphänotypische Profil lässt auf folgende Effektorfunktionen der Mikroglia schließen: Antigenpräsentation, Co-Stimulation von T-Zellen und Beteiligung bei der Einwanderung und Vermittlung der Adhärenz von Lymphozyten und Monozyten.

Vergleichende Untersuchungen des immunphänotypischen Profils von Monozyten aus dem peripheren Blut und der Mikroglia ergaben eine unterschiedliche Expression von CD44, CD14, CD45 und ICAM-1. Im Verlauf der Challenge-Infektion konnte bei Monozyten eine Auf- und anschließende Abregulation der Oberflächenmoleküle CD11b, CD1c, B7-2 und MHC I beobachtet werden. Dieser Immunphänotyp spiegelt die Funktionen der Monozyten, wie Antigenpräsentation, Interaktion mit Lymphozyten, Extravasation und Migration zum Entzündungsherd, im Rahmen der Immunantwort nach Staupevirusinfektion wider.

Funktionell wurden bei der aktivierten Mikroglia bei Hunden mit Demyelinisierung sowohl ein größerer Anteil ROS-bildender und phagozytischer Mikrogliazellen als auch deutlich erhöhte Werte für die Intensität der ROS-Bildung und der Phagozytose festgestellt als bei Hunden ohne besondere Befunde im ZNS. Diese Ergebnisse sprechen für eine Funktion der Mikroglia als intrinsischer Makrophage des ZNS, dessen Funktion im Rahmen pathophysiologischer Zustände, wie die in dieser Studie untersuchte Staupe, verstärkt ist.

Die Ergebnisse der immunphänotypischen und funktionellen Charakterisierung der Mikroglia ex vivo lassen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Demyelinisierung bei Hundestaube vermuten. Mikrogliazellen sind virusinfiziert, können Antigen präsentieren – sowohl Virus über MHC I als auch vermutlich Glykolipide über CD1c, können über eine Co-

Stimulation zur T-Zell-Aktivierung beitragen und über verstärkte ROS-Bildung Myelin oder die sehr empfindlichen myelinbildenden Oligodendrozyten direkt schädigen. Um die Spezifität dieser Funktionen für Hundestaupe bzw. Demyelinisierung feststellen zu können, wären weiterführende vergleichende Studien mit anderen Krankheiten nötig, auf deren Grundlage vielleicht auch alternative Therapiestrategien für bisher nicht therapierbare Erkrankungen mit Demyelinisierung entwickelt werden könnten.

## 7 Summary

Veronika M. Stein: **Characterization of microglia in canine distemper**

Canine distemper (CD) is a highly contagious infection caused by a morbillivirus. In the acute phase of the disease CDV-infection (canine distemper virus infection) can lead to severe demyelination in the central nervous system (CNS). As shown in former studies this might be a direct effect of the virus infection. However, the influence of the immune system is not completely understood. An early T-cell response was described, in the chronic phase macrophages/monocytes enhance the lesions. As microglial cells show great phenotypic and functional similarities to this cell-lineage their contributing role in the pathogenesis of demyelination might be crucial. Studies to elucidate this question are lacking so far. Therefore, the aim of this study was to isolate canine microglial cells to determine their antigenic phenotype by using various surface markers and to characterize their functional features in dogs with distemper in comparison to healthy animals.

In the course of a vaccine-challenge-experiment 20 dogs were infected with CDV and euthanized 20-36 days after the infection. Two additional healthy dogs of the same age and race served as negative controls. Following perfusion the brain was removed and 10 – 15 g of periventricular brain tissue was dissociated by mincing through a stainless-steel sieve and enzymatically digested. By the use of density gradient centrifugation microglial cells could be collected on the surface of the 1.077 and 1.066 densities as shown in preliminary studies. Using this method we obtained about  $3 - 7 \times 10^6$  cells at a purity of 62,0 % and ranging from 80 to 98 % after gating.

Histopathologically the dogs were divided into three groups: group I consisted of 13 infected dogs without changes in the CNS except a few microglial nodules. These dogs recovered after initial mild systemic symptoms of distemper. Group II consisted of 7 dogs with distinct lesions and different degrees of demyelination due to distemper. The third group consisted of two non-infected control-dogs with normal brains. The following ex vivo studies were performed:

Using the monoclonal antibody D110 CDV could be demonstrated in microglial cells in dogs with histopathologically diagnosed demyelination due to distemper.

Various different dog-specific antibodies against surface molecules were used to characterize the immuno-phenotype of microglial cells *ex vivo*. Canine microglial cells expressed CD18 and CD11b but despite description in other species expression of CD45 was very low. Striking results were the increased expression of CD11b, CD1c, ICAM-1, B7-1 and B7-2, MHC I und II in dogs with demyelination compared to controls.

Microglial cells can be differentiated from monocytes by their different expression of CD44, CD14, ICAM-1 and CD45. A contamination with perivascular macrophages could be excluded in this study. However, in the course of the challenge experiment also monocytes revealed an upregulation followed by downregulation of the surface molecules CD11b, CD1c, B7-2 and MHC I reflecting the multiple functions of monocytes during CDV infection such as antigen presentation, interaction with lymphocytes, extravasation and migration to the lesion site.

Release of reactive oxygen species (ROS) was measured by flow cytometry techniques. Dogs with demyelination due to distemper virus infection showed increased ROS-generation compared to healthy control dogs.

Phagocytic activity of microglial cells was determined by measuring the ingestion of FITC-labelled *Staphylococcus aureus* by flow cytometry. In dogs with demyelinating lesions in the CNS due to distemper virus infection phagocytosis was enhanced.

The results of our *ex vivo* examinations point at a pivotal role for microglia in the pathogenesis of demyelination in the acute phase of CDV infection. Microglial cells show a distinct activation by means of functionality and immuno-phenotype: they are infected with CDV, are capable to present antigen (through MHC-molecules as well as through CD1c), express co-stimulatory molecules for T-cells activation and can contribute directly to myelin destruction or oligodendroglial pathology through increased release of ROS. Therefore the contribution to demyelination in the acute phase of the disease is highly probable. Whether this functional and immuno-phenotypical pattern of microglia is specific for demyelination due to CDV infection or corresponds to other CNS-diseases remains to be explored. In conclusion these results could offer new perspectives for therapeutic approaches.

## 8 Literaturverzeichnis

**ACHIM, C. L. u. C. A. WILEY (1996):**

Inflammation in AIDS and the role of the macrophage in brain pathology.  
Curr. Opin. Neurol. 9, 221-225

**AGULLO, L., M. A. BALTRONS u. A. GARCIA (1995):**

Calcium-dependent nitric oxide formation in glial cells.  
Brain Res. 686, 160-168

**AKIYAMA, H. u. P. L. MC GEER (1990):**

Brain microglia constitutively express beta-2 integrins.  
J. Neuroimmunol. 30, 81-93

**AKIYAMA, H., I. TOOYAMA, H. KONDO, K. IKEDA, H. KIMURA, E. G. MCGEER u. P. L. MCGEER (1994):**

Early response of resident microglia to kainic acid-induced hippocampal lesions.  
Brain Res. 635, 257-268

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

Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis.  
Acta Neuropathol. 92, 273-280

**ALLDINGER, S., S. FONFARA, E. KREMMER u. W. BAUMGARTNER (2000):**

Up-regulation of the hyaluronate receptor CD 44 in canine distemper demyelinated plaques.  
Acta Neuropathol. 99, 138-146

**APPEL, M. J. G. (1970):**

Distemper pathogenesis in dogs.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 156, 1681-1684

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

Canine distemper virus.  
In: HORZINEK, M. C. M. (Hrsg.): Virus infections of vertebrates. Vol. 1.  
Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, S. 133-159

**APPEL, M. J. G. (1991):**

Where next for canine virus?  
Nature 353, 508

**APPEL, M. J. G. u. J. H. GILLESPIE (1972):**

Canine distemper virus.  
In: GARD, S., C. HALLAUER u. K. F. MEYER (Hrsg.): Virology Monographs.  
Springer Verlag, New York 11, 1-96

**APPEL, M. J. G., L. T. GLICKMAN, C. S. RAINE u. W. W. TOURTELLOTTE (1981):**

Canine viruses and multiple sclerosis.  
Neurology 31, 944-949

**APPEL, M.J. G., R. A. YATES, G. L. FOLEY, J. J. BERNSTEIN, S. SANTINELLI, L. H. SPELMAN, L. D. MILLER, L. H. ARP, M. ANDERSON, M. BARR, S. PEARCE-KELLING u. B. A. SUMMERS (1994):**

Canine distemper epizootic in lions, tigers and leopards in North America.  
J. Vet. Diagn. Invest. 6, 277-288

**BANATI, R. B., D. HOPPE, K. GOTTMANN, G. W. KREUTZBERG u. H. KETTENMANN (1991):**

A subpopulation of bone marrow-derived macrophage-like cells shares a unique ion channel pattern with microglia.  
J. Neurosci. Res. 30, 593-600

**BANATI, R. B., G. ROTHE, G. W. KREUTZBERG u. G. VALET (1993a):**

Detection of lysosomal cysteine proteinase in microglia: flow cytometric measurement and histochemical localization of cathepsin B and L.  
Glia 7, 183-191

**BANATI, R. B., J. GEHRMANN, P. SCHUBERT u. G. W. KREUTZBERG (1993b):**

Cytotoxicity of microglia.  
Glia 7, 111-118

**BANATI, R. B., J. GEHRMANN, C. CZECH, U. MÖNNING, L. L. JONES, G. KÖNIG, K. BEYREUTHER u. G. W. KREUTZBERG (1993c):**

Early and rapid de novo-synthesis of Alzheimer  $\beta$ A4-amyloid precursor protein (APP) in activated microglia.  
Glia 9, 199-210

**BANATI, R. B. u. K. BEYREUTHER (1995):**

Alzheimer's disease.  
In: KETTENMANN, H. u. B.R. RANSOM (Hrsg.): Neuroglia.  
Oxford University Press, New York, Oxford, S. 1027-1043

**BAUMGARTNER, W., R. W. BOYCE, S. ALLDINGER, M. K. AXTHELM, S. E.**

**WEISBRODE, S. KRAKOWKA u. K. GAEDKE (1995):**

Metaphyseal bone lesions in young dogs with systemic canine distemper virus infection.  
Vet. Microbiol. 44, 201-209

**BAUMGARTNER, W., C. J. KETZ RILEY, G. SCHLERKA, M. SCHUH, G. SCHUSSER, A. SCOPE, J. THALHAMMER, A. TIPOLD u. L. VASICEK (1999):**

Morphologische Blutuntersuchung (Blutstatus, Blutbild).  
In: BAUMGARTNER, W. (Hrsg.): Klinische Propädeutik der inneren Krankheiten und Hautkrankheiten der Haus- und Heimtiere.  
Parey Buchverlag Berlin, S. 298-308

**BECHER, B. u. J. P. ANTEL (1996):**

Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia.  
*Glia* 18, 1-10

**BLEVINS, G. u. S. FEDOROFF (1995):**

Microglia in colony-stimulating factor-1 deficient op/op mice.  
*J. Neurosci. Res.* 40, 535-544

**BLINZINGER, K. u. G. KREUTZBERG (1968):**

Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells.  
*Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 85, 145-157

**BLUMBERG, R. S., D. GERDES, A. CHOTT, S. A. PORCELLI u. S. P. BALK (1995):**

Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins.  
*Immunol. Rev.* 147, 5-29

**BOENIG, D. M., W. D. JOHNSON u. R. W. STORTS (1974):**

Canine distemper: The present status of the disease including some new considerations concerning its pathogenesis.  
*Southw. Vet.* 12, 37-44

**BOLLO, E., A. ZURBRIGGEN, M. VANDEVELDE u. R. FANKHAUSER (1986):**

Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination.  
*Acta Neuropathol.* 72, 69-73

**BOTTERON, C., A. ZURBRIGGEN, C. GRIOT u. M. VANDEVELDE (1992):**

Canine distemper virus-immune complexes induce bystander degeneration of oligodendrocytes.  
*Acta Neuropathol.* 83, 402-407

**BRENNEMANN, D. E., G. L. WESTBROOK, S. P. FITZGERALD, D. L. ENNIST, K. L. ELKINS, M. R. RUFF u. C. B. PERT (1988):**

Neuronal killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide.  
*Nature* 335, 639-642

**BRENNER T., S. BROCKE S., F. SZAFER, R. A. SOBEL, J. F. PARKINSON, D. H. PEREZ u. L. STEINMAN (1997):**

Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis.  
*J. Immunol.* 158, 2940-2946

**BRUCE-KELLER, A. J. (1999):**

Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery.  
*J. Neurosci. Res.* 58, 191-201

**BRUGGER, M., T. W. JUNGI, A. ZURBRIGGEN u. M. VANDEVELDE (1992):**

Canine distemper virus increases procoagulant activity of macrophages.  
*Virology* 190, 616-623

**BUDKA, H. (1991):**

Neuropathology of human immunodeficiency virus infection.  
*Brain Pathol.* 1, 163-175

- BUSSHOFF, U., A. HEIN, A. IGLESIAS, R. DÖRRIES u. A. RÉGNIER-VIGOUROUX (2001):**  
CD1 expression is differentially regulated by microglia, macrophages and T cells in the central nervous system upon inflammation and demyelination.  
J. Neuroimmunol. 113, 220-230
- CASH, E. u. O. ROTT (1994):**  
Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the central nervous system.  
Clin. Exp. Immunol. 98, 313-318
- CASTELLANO, B., B. GONZALEZ, B. R. FINSEN u. J. ZIMMER (1990):**  
Histochemical demonstration of purine nucleoside phosphorylase (PNPase) in microglial and astroglial cells of adult rat brain.  
J. Histochem. Cytochem. 38, 1535-1539
- CASTELLANO, B., B. GONZALEZ, I. DALMAU u. J. M. VELA (1991):**  
Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: a histochemical study.  
J. Comp. Neurol. 311, 434-444
- CERRUTI-SOLA, S., F. KRISTENSEN, M. VANDEVELDE, P. BICHSEL u. U. KIHM (1983):**  
Lymphocyte responsiveness to lectin and myelin antigens in canine distemper infection in relation to the development of demyelinating lesions.  
J. Neuroimmunol. 4, 77-90
- CHABOT, S., G. WILLIAMS u. V. W. YONG (1997):**  
Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferonbeta-1b  
J. Clin. Invest. 100, 604-612
- CHAO, C. C., G. GEKKER, S. HU u. P. K. PETERSON (1994):**  
Human microglia cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines.  
J. Immunol. 152, 1246-1252
- CHAO, C. C., S. HU, W. S. SHENG u. P. K. PETERSON (1995):**  
Tumor necrosis factor-alpha production by human fetal microglial cells: regulation by other cytokines.  
Dev. Neurosci. 17, 97-105
- CHAO, C. C., G. GEKKER, S. HU, W. S. SHENG, K. B. SHARK, D. F. BU, S. ARCHER, J. M. BIDLACK u. P. K. PETERSON (1996):**  
Kappa opioid receptors in human microglia downregulate human immunodeficiency virus 1 expression.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 8051-8056
- CHAO, C. C., S. HU, K. B. SHARK, W. S. SHENG, G. GEKKER u. P. K. PETERSON (1997):**  
Activation of  $\mu$ -receptors inhibits microglial chemotaxis.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 281, 998-1004

**CHENG, B. u. M. P. MATTSON (1991):**

NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis.  
Neuron 7, 1031-1041

**CHERPILLOD, P., A. TIPOLD, M. GRIOT-WENK, C. CARDOZO, I. SCHMID, R. FATZER, M. SCHOBESBERGER, R. ZURBRIGGEN, L. BRUCKNER, F. ROCH, M. VANDEVELDE, R. WITTEK, u. A. ZURBRIGGEN (2000):**

DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper.  
Vaccine 18, 2927-2936

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

Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens:  
Summary of the first international canine leukocyte antigen workshop (CLAW).  
Tissue Antigens 43, 137-154

**DA CUNHA, A., J. J. JEFFERSON, W. R. TYOR, J. D. GLASS, F. S. JANOTTA, J. R. COTTREL u. J. H. RESAU (1997):**

Transforming growth factor-beta 1 in adult human microglia and its stimulated production by interleukin-1.  
J. Interferon Cytokine Res. 17, 655-664

**DANGOND, F., A. WINDHAGEN, C. J. GROVES u. D. A. HAFLER (1997):**

Constitutive expression of costimulatory molecules by human microglia and its relevance to CNS autoimmunity.  
J. Neuroimmunol. 76, 132-138

**DANILENKO, D. M., P. V. ROSSITTO, M. VAN DER VIEREN, H. LE TRONG, S. P. MCDONOUGH, V. K. AFFOLTER u. P. F. MOORE (1995):**

A novel canine leukointegrin, alpha d beta 2, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8+ lymphocyte subpopulation in peripheral blood.  
J. Immunol. 155, 35-44

**DAVIS, E. J., T. D. FOSTER u. W. E. THOMAS (1994):**

Cellular forms and functions of brain microglia.  
Brain Res. Bull. 34, 73-78

**DEGROOT, C. J. A., W. HUPPES, T. SMINIA, G. KRAAL u. C. D. DIJKSTRA (1992):**

Determination of the origin and nature of brain macrophages and microglial cells in mouse central nervous system, using non-radioactive in situ hybridisation and immunoperoxidase techniques.  
Glia 6, 301-309

**DEL RIO-HORTEGA, P. (1932):**

Microglia.  
In: PENFIELD, E. W. (Hrsg.): Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System.  
Hoeber, New York, S. 481-534

**DE SIMONE, R., A. GIAMPAOLO, B. GIOMETTO, P. GALLO, G. LEVI, C. PESCHLE u. F. ALOISI (1995):**

The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 54, 175-187

**DEWITT, D. S., D. L. KONG, B. G. LYETH, L. W. JENKINS, R. L. HAYES u. E. D. WOOTEN, D. S. PROUGH (1988):**

Experimental traumatic brain injury elevates brain prostaglandin E2 and thromboxane B2 levels in rats.

J. Neurotrauma. 5, 303-313

**DICKSON, D. W., L. A. MATTIACE, K. KURE, K. HUCHINS, W. D. LYMEN u. C. F. BROSAN (1991):**

Biology of disease. Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome.

Lab. Invest. 64, 135-156

**DIJKSTRA, C. D., E. A. DOPP, P. JOLING u. G. KRAAL (1985):**

The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophages subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED 1, ED 2 und ED 3.

Immunol. 54, 589-599

**DING, M. u. J. E. MERRILL (1997):**

The kinetics and regulation of the induction of type II nitric oxide synthase and nitric oxide in human fetal glial cell cultures.

Mol. Psychiatry 2, 117-119

**DING, M., S. T. PIERRE, B. A., J. F. PARKINSON, P. MEDBERRY, J. L. WONG, N. E. ROGERS, L. J. IGNARRO u. J. E. MERRILL (1997):**

Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in human fetal astrocytes and microglia: a kinetic analysis.

J. Biol. Chem. 272, 11327-11335

**DYRKS, T., E. DYRKS, T. HARTMANN, C. MASTERS u. K. BEYREUTHER (1992):**

Amyloidogenicity of  $\beta$ A4 and  $\beta$ A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation.

J. Biol. Chem. 267, 18210-18217

**EHRlich, L. C., S. HU, W. S. SHENG, R. L. SUTTON, G. L. ROCKSWOLD, P. K. PETERSON u. C. C. CHAO (1998):**

Cytokine regulation of human microglial cell IL-8 production.

J. Immunol. 160, 1944-1948

**ESPEY, M. G., O. N. CHERNYSHEV, J. F. REINHARD, M. A. NAMBOODIRI u. C. A. COLTON (1997):**

Activated human microglia produce the excitotoxin quinolinic acid.

Neuroreport 8, 431-434

**FANKHAUSER, R. (1982):**

Hundestaupe – Geschichte einer Krankheit.  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 245-256

**FEDOROFF, S. (1995):**

Development of microglia.  
In: KETTENMANN, H. u. B.R. RANSOM (Hrsg.): Neuroglia.  
Oxford University Press, New York, Oxford, S. 162-181

**FEDOROFF, S., C. HAO, I. AHMED u. L. J. GUILBERT (1993):**

Paracrine and autocrine signalling in regulation of microglial survival.  
In: FEDOROFF, S., B. H. J. JUURLINK u. R. DOUCETTE (Hrsg.):  
Biology and Pathology of Astrocyte-Neuron Interactions.  
Plenum Press, New York, S. 247-261

**FERRARI, D., M. VILLALBA, P. CHIOZZI, S. FALZONI, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI u. F. DI VIRGILIO (1996):**

Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP.  
J. Immunol. 156, 1531-1539

**FERRARI, D., P. CHIOZZI, S. FALZONI, M. DAL SUSINO, G. COLLO, G. BUELL u. F. DI VIRGILIO (1997):**

ATP-mediated cytotoxicity in microglial cells.  
Neuropharmacology 36, 1295-1301

**FLARIS, N. A., T. L. DENSMORE, M. C. MOLLESTON u. W. F. HICKEY (1993):**

Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and four models of parenchymal reaction.  
Glia 7, 34-40

**FORD, A. L., A. L. GOODSALL, W. F. HICKEY u. J. D. SEDGWICK (1995):**

Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting  
J. Immunol. 154, 4309-4321

**FRANK, J. H. M. (2000):**

Wanderungsverhalten neutrophiler Granulozyten in einem Transmigrationsverfahren.  
Hannover, tierärztl. Hochsch., Diss.

**FREI, K., C. SIEPL, P. GROSCURTH, S. BODMER, C. SCHWERDEL u. A. FONTANA (1987):**

Antigen presentation and tumour cytotoxicity by interferon-g-treated microglial cells.  
Eur. J. Immunol. 17, 1271-1278

**FUJIMOTO, E., A. MIKI u. H. MIZOGUTI (1987):**

Histochemical studies of the differentiation of microglial cells in the cerebral hemispheres of chick embryos and chicks.  
Histochemistry 87, 209-216

- GASQUE, P., S. K. SINGHRAO, J. W. NEAL, O. GÖTZE u. B. P. MORGAN (1997):**  
Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is upregulated on reactive astrocytes, microglia and endothelial cells in the inflamed human central nervous system.  
Am. J. Pathol. 150, 31-41
- GEHRMANN, J. u. G. W. KREUTZBERG (1991):**  
Characterization of two monoclonal antibodies directed against rat microglia.  
J. Comp. Neurol. 313, 409-430
- GEHRMANN, J. u. G. W. KREUTZBERG (1995):**  
Microglia in experimental neuropathology.  
In: KETTENMANN, H. u. B.R. RANSOM (Hrsg.): Neuroglia.  
Oxford University Press, New York, Oxford, S. 883-904
- GEHRMANN, J., S. MONACO u. G. W. KREUTZBERG (1991):**  
Spinal cord microglial cells and DRG satellite cells rapidly respond to transection of the rat sciatic nerve.  
Rest. Neurol. Neurosci. 2, 181-198
- GEHRMANN, J., P. BONNEKOH, T. MIYAZAWA, K.-A. HOSSMANN u. G. W. KREUTZBERG (1992):**  
Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia.  
J. Cereb. Blood Flow Metab. 12, 257-269
- GIULIAN, D. (1987):**  
Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system.  
J. Neurosci. Res. 18, 155-171
- GIULIAN, D. (1992):**  
Microglia and disease of the nervous system.  
Curr. Top. Neurol. 12, 23-54
- GIULIAN, D. (1995):**  
Microglia and neuronal dysfunction.  
In: KETTENMANN, H. u. B.R. RANSOM (Hrsg.): Neuroglia.  
Oxford University Press, New York, Oxford, S. 671-684
- GIULIAN, D. u. T. J. BAKER (1986):**  
Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain.  
J. Neurosci. 6, 2163-2178
- GIULIAN, D. u. J. E. INGEMAN (1988):**  
Colony-stimulating factors as promoter of amoeboid microglia.  
J. Neurosci. 8, 4707-4717
- GIULIAN, D., K. VACA u. C. NOONAN (1990):**  
Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1.  
Science 250, 1593-1596
- GIULIAN, D., B. JOHNSON, J. F. KREBS, J. GEORGE u. M. TAPSCOTT (1991):**  
Microglial mitogens are produced in the developing and injured mammalian brain.  
J. Cell Biol. 112, 323-333

- GIULIAN, D., K. VACA u. M. CORPUZ (1993a):**  
Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival.  
J. Neurosci. 13, 29-37
- GIULIAN, D., E. WENDT, K. VACA u. C. NOONAN (1993b):**  
The envelope glycoprotein of HIV-1 stimulates monocyte release of neurotoxins.  
Proc. Nat. Acad. Sci. 90, 2769-2773
- GIULIAN, D., J. LI, X. LI, J. GEORGE u. P. A. RUTECKI (1994):**  
The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS.  
Dev. Neurosci. 16, 128-136
- GIULIAN, D., J. LI, S. BARTEL, J. BROKER, X. LI, J. B. KIRKPATRICK (1995):**  
Cell surface morphology identifies microglia as a distinct class of mononuclear phagocyte.  
J. Neurosci. 15, 7712-7726
- GONZÁLEZ-SCARANO, F. u. G. BALTUCH (1999):**  
Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases.  
Annu. Rev. Neurosci. 22, 219-240
- GORDON, M. T., D. C. ANDERSON u. P. T. SHARPE (1991):**  
Canine distemper virus localised in bone cells of patients with Paget's Disease.  
Bone 12, 195-201
- GRAEBER, M. B. u. W. J. STREIT (1990):**  
Microglia: immune network in the CNS.  
Brain Pathol. 1, 2-5
- GRAEBER, M. B., W. J. STREIT u. G. W. KREUTZBERG (1988a):**  
Axotomy of rat facial nerve leads to increased CR 3 complement receptor expression by activated microglia cells.  
J. Neurosci. Res. 21, 18-24
- GRAEBER, M. B., W. J. STREIT u. G. W. KREUTZBERG (1988b):**  
The microglial cytoskeleton: Vimentin is localized within activated cells in situ.  
Neurocytol. 17, 573-580
- GREENE, C. E. u. M. J. APPEL (1998):**  
Canine distemper.  
In: GREENE, C. E. (Hrsg.): Infectious diseases of the dog and cat.  
W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo,  
S. 9-22
- GRIOT, C., T. BÜRGE, S. BRIGGER, A. RICHARD, E. PETERHANS u. M. VANDEVELDE (1989):**  
Makrophagen bei der zentralnervösen Hundestaupe; Freunde oder Feinde?  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 131, 351-359
- GRIOT, C., M. VANDEVELDE, A. RICHARD, E. PETERHANS u. R. STOCKER (1990):**  
Selective degeneration of oligodendrocytes mediated by reactive oxygen species.  
Free Radic. Res. Commun. 11, 181-193

**HANSEN, R. (1999):**

Untersuchungen zur Pathogenese einer durch murine Leukämie-Viren induzierten Neurodegeneration in Ratten.  
München, Tierärztl. Fak. d. L-M-Univ., Diss.

**HAYS, S. J. (1998):**

Therapeutic approaches to the treatment of neuroinflammatory diseases.  
Curr. Pharmaceutical Design 4, 335-348

**HEIN, A., S. CZUB, L. X. XIAO, S. SCHWENDER, R. DÖRRIES u. M. CZUB (1995):**

Effects of adoptive immune transfers on murine leukemia virus-infection of rats.  
Virology 211, 408-417

**HEIN, A., J.-P. MARTIN, F. KOEHREN, A. BINGEN u. R. DÖRRIES (2000):**

In vivo infection of ramified microglia from adult cat central nervous system by feline immunodeficiency virus.  
Virology 268, 420-429

**HETIER, E., J. AYALA, P. DENEFFLE, A. BOUSEAU, P. ROUGET, M. MALLAT u. A. PROCHIANTZ (1988):**

Brain macrophages synthesize interleukin-1 and interleukin-1 mRNAs in vitro.  
J. Neurosci. Res. 21, 391-397

**HICKEY, W. F., K. VASS u. H. LASSMANN (1992):**

Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 51, 246-256

**HIGGINS, R. J., S. G. KRAKOWKA, A. E. METZLER u. A. KOESTNER (1981):**

Canine distemper virus-associated cardiac necrosis in the dog.  
Vet. Pathol. 18, 472-486

**HIGGINS, R. J., S. G. KRAKOWKA, A. E. METZLER u. A. KOESTNER (1982):**

Experimental canine distemper encephalomyelitis in neonatal gnotobiotic dogs. A sequential ultrastructural study.  
Acta Neuropathol. 57, 287-295

**JACOBSEN, C. N., B. AASTED, M. K. BROE u. J. L. PETERSEN (1993):**

Reactivities of 20 anti-human monoclonal antibodies with leucocytes from ten different animal species.  
Vet. Immunol. and Immunopathol. 39, 467-473

**JANEWAY, C. A. u. P. TRAVERS (1997):**

Immunologie.  
2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford

**JARANOWSKA, A., F. BUSSOLINO, V. SOGOS, M. ARESE, G. M. LAURO u. F. GREMO (1995):**

Platelet activating factor production by human fetal microglia: effect of lipopolysaccharides and tumor necrosis factor- $\alpha$ .  
Mol. Chem. Neuropathol. 24, 95-106

**JOHNSON, P., A. MAITI u. D. H. W. NG (1996):**

CD-45: A family of leukocyte-specific cell surface glycoproteins.

In: HERZENBERG, L. A., D. M. WEIR, L. A. HERZENBERG u. C. BLACKWELL. Weir's Handbook of experimental immunology 5<sup>th</sup> Edition. Volume II (Cell Surface and Messenger Molecules of the Immune System).

Blackwell Science, Oxford, Chapter 62, S. 1-16

**JORDAN, F. L. u. W. E. THOMAS (1988):**

Brain macrophages; question of origin and interrelationships.

Brain Res. Rev. 13: 165-178

**JORDAN, C. A., B. A. WATKINS, C. KUFTA u. M. DUBOIS-DALCQ (1991):**

Infection of brain microglial cells by HIV-1 is CD4 dependent.

J. Virol. 65, 736-742

**JUNE, C. H., J. A. BLUESTONE, L. M. NADLER u. C. B. THOMPSON (1994):**

The B7 and CD28 receptor families.

Immunol. Today 15, 321-331

**KANEKO, Y., T. KITAMOTO, J. TATEISHI u. K. YAMAGUCHI (1989):**

Ferritin immunohistochemistry as a marker for microglia.

Acta Neuropathol. 79, 129-136

**KETTENMANN, H. u. R. B. RANSOM (1995):**

Neuroglia.

Oxford University Press, New York, Oxford.

**KETTENMANN, H., D. HOPPE, K. GOTTMANN, R. B. BANATI u. G. KREUTZBERG (1990):**

Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages.

J. Neurosci. Res. 26, 278-287

**KETTENMANN, H., R. B. BANATI u. W. WALZ (1993):**

Electrophysiological behaviour of microglia.

Glia 7, 93-101

**KRAKOWKA, S., B. MCCULLOUGH, A. KOESTNER, R. OLSEN (1973):**

Myelin-specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection.

Infect. Immunity 8, 819-827

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

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

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

**KREUTZBERG, G. W. (1987):**

Microglia.

In: ADELMAN, G. (Hrsg.): Encyclopedia of Neuroscience.

Birkhäuser, Boston, S. 661-662

**KREUTZBERG, G. W. (1996):**

Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.  
Trends Neurosci. 19, 312-318

**LAI, L., N. ALAVERDI, Z. CHEN, F. G. M. KROESE, N. A. BOS u. E. C.-M. HUANG (1996):**

Monoclonal antibodies to human, mouse, and rat cluster of differentiation (CD) antigens.  
In: HERZENBERG, L. A., D. M. WEIR, L. A. HERZENBERG u. C. BLACKWELL. Weir's Handbook of experimental immunology 5<sup>th</sup> Edition. Volume II (Cell Surface and Messenger Molecules of the Immune System).  
Blackwell Science, Oxford, Chapter 57, S. 1-2

**LANGEDIJK, J. P., F. J. DAUS u. J. T. VAN OIRSCHOT (1997):**

Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin.  
J. Virol. 71, 6155-6167

**LAWETZKY, A. G. TIEFENTHALER, R. KUBO u. T. HÜNIG (1990):**

Identification and characterization of rat T cell subpopulations expressing T cell receptors alpha/beta and gamma/delta  
Eur. J. Immunol. 20, 343-349

**LAWSON, L. J., V. H. PERRY, P. DRI u. S. GORDON (1990):**

Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain.  
Neurosci. 39, 151-170

**LAWSON, L. J., V. H. PERRY u. S. GORDON (1992):**

Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain.  
Neurosci. 48, 405-415

**LAWSON, L. J., M. K. MTYSZAK u. V. H. PERRY (1993):**

Lessons from microglia in special sites.  
Clin. Neuropathol. 12, 310-313

**LEE, S. C., W. LIU, P. ROTH, D. W. DICKSON, W. BERMAN u. C. F. BROSANAN (1992):**

Macrophage colony stimulating factor (CSF-1) in human fetal astrocytes and microglia in cultures.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 51, 338

**LEE, S. C., W. LIU, D. W. DICKSON, C. F. BROSANAN u. J. W. BERMAN (1993):**

Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1beta.  
J. Immunol. 150, 2659-2667

**LEE, S. C., W. LIU, C. F. BROSANAN u. D. W. DICKSON (1994):**

GM-CSF promotes proliferation of human fetal and adult microglia in primary cultures  
Glia 12, 309-318

**LEONHARDT, H. (1990):**

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

**LING, E. A. u. W. C. WONG (1993):**

The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts.  
*Glia* 7, 9-18

**LING, E. A., D. PENNEY u. C. P. LEBLOND (1980):**

Use of carbon labelling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the "amoeboid cells" in the corpus callosum of postnatal rats.  
*J. Comp. Neurol.* 193, 631-657

**LIU, W., C. F. BROSANAN, D. W. DICKSON u. S. C. LEE (1994):**

Macrophage colony stimulating factor mediates factor-induced microglial ramification in human fetal central nervous system culture.  
*Am. J. Pathol.* 145, 48-53

**LIU, J. S., T. D. AMARAL, C. F. BROSANAN u. S. C. LEE (1998):**

IFNs are critical regulators of IL-1 receptor antagonist and IL-1 expression in human microglia.  
*J. Immunol.* 161, 1989-1996

**LORD, K. E. u. I. D. DUNCAN (1987):**

Early postnatal development of glial cells in the canine cervical spinal cord.  
*J. Comp. Neurol.* 265, 34-46

**MATSUMOTO, Y. u. M. FUJIWARA (1987):**

Absence of donor-type major histocompatibility complex class I antigen bearing microglia in the rat CNS of radiation bone marrow chimeras.  
*J. Comp. Neurol.* 17, 71-82

**MCGEER, P. L., S. ITAGAKI u. E. G. MCGEER (1988):**

Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease.  
*Acta Neuropathol.* 76, 550-557

**MCLARNON, J. G., R. XU, Y. B. LEE u. S. U. KIM (1997):**

Ion channels of human microglia in culture.  
*Neurosci.* 78, 1217-1228

**MERRILL, J. E. (1992):**

Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 and related cytokines in brain development: normal and pathological.  
*Dev. Neurosci.* 14, 1-10

**MOORE, S. u. S. THANOS (1996):**

The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration.  
*Prog. Neurobiol.* 48, 441-460

**MOORE, P. F., P. V. ROSSITTO, D. M. DANILENKO, J. J. WIELENGA, R. F. RAFF u. E. SEVERNS (1992):**

Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils.  
*Tissue Antigens* 40, 75-85

**MOSLEY, K. u. M. L. CUZNER (1996):**

Receptor-mediated phagocytosis of myelin by macrophages and microglia: effect of opsonization and receptor blocking agents.  
Neurochem. Res. 21, 481-487

**MURABE, Y. u. Y. SANO (1982):**

Morphological studies on Neuroglia: V. Microglia cells in the cerebral cortex of the rat, with special reference to their possible involvement in synaptic function.  
Cell Tissue Res. 223, 493-506

**MURPHY, F. A., E. P. J. GIBBS, M. C. HORZINEK u. M. J. STUDDERT (1999):**

Veterinary virology.  
Third Edition.  
Academic Press. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto

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

Astrozytic infection in canine distemper virus-induced demyelination.  
Acta Neuropathol. 77, 333-335

**NAKAJIMA, K., M. SHIMOJO, M. HAMANOUE, S. ISHIURA, H. SUGITA u. S. KOHSAKA (1992):**

Identification of elastase as a secretory protease from cultured rat microglia.  
J. Neurochem. 58, 1401-1408

**NATHAN, C. F. (1987):**

Secretory products of macrophages.  
J. Clin. Invest. 79, 319-326

**NAVIA, B. A., E.-S. CHO, C. K. PETITO u. R. W. PRICE (1986):**

The AIDS dementia complex. II. Neuropathology.  
Ann. Neurol. 19, 525-535

**NIEMAND, H. G. u. P. F. SUTER (2001):**

Hundestaupe  
In: SUTER, F.: Praktikum der Hundeklinik.  
Parey, Berlin, S. 327-330

**NORENBERG, W., J. M. LANGOSCH, P. J. GEBICKE-HAERTER u. P. ILLES (1994):**

Characterization and possible function of adenosine 5'-triphosphate receptors in activated microglia.  
J. Pharmacol. 111, 942-950

**NOVIKOFF, A. B. u. S. GOLDFISCHER (1961):**

Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 802-810

**OEHMICHEN, M. (1980):**

Enzyme-histochemical differentiation of neuroglia and microglia: a contribution to the cytogenesis of microglia and globoid cells.  
Pathol. Res. Pract. 168, 344-373

**OSTERHAUS, A. D. M. E., R. L. DE SWART, H. W. VOS, P. R. ROSS, M. J. H. KENTER u. T. BARRETT (1995):**

Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus.  
Vet. Microbiol. 44, 219-227

**PARKER, A. J. (1978):**

The many faces of canine distemper.  
Canine Practice 14, 25-28

**PERLMUTTER, L. S., S. A. SCOTT, E. BARRON u. H. C. CHUI (1992):**

MHC class II-positive microglia in human brain: association with Alzheimer lesions.  
J. Neurosci. Res. 33, 549-558

**PERRY, V. H. (1998):**

A revised view of the central nervous system microenvironment and major histocompatibility complex class II antigen presentation.  
J. Neuroimmunol. 90, 113-121

**PERRY, V. H. u. S. GORDON (1988):**

Macrophages and microglia in the nervous system.  
Trends Neurol. Sci. 11, 273-277

**PERRY, V. H. u. S. GORDON (1991):**

Macrophages and the nervous system.  
Int. Rev. Cytol. 125, 203-244

**PERRY, V. H., D. A. HUME u. S. GORDON (1995):**

Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain.  
Neurosci. 15, 313-326

**PETERSON, P. K., G. GEKKER, S. HU, W. S. SHENG, W. R. ANDERSON, R. J. ULEVITCH, P. S. TOBIAS, K. V. GUSTAFSON, T. W. MOLITOR u. C. C. CHAO (1995):**

CD14-receptor mediated uptake of monopsinised mycobacterium tuberculosis by human microglia.  
Infect. Immun. 63, 1598-1602

**PIANI, D., K. FREI, K. Q. DO, M. CUENOD u. A. FONTANA (1991):**

Murine brain macrophages induced NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate.  
Neurosci. Lett. 133, 159-162

**POSSEL, H., H. NOACK, J. PUTKE, G. WOLF u. H. SIES (2000):**

Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies.  
Glia 32, 51-59

**PRESTA, M., C. URBINATI, P. DELL'ERA, G. M. LAURO, V. SOGOS, L. BALACI, M. G. ENNAS u. F. GREMO (1995):**

Expression of basic fibroblast growth factor and its receptors in human fetal microglia cells.  
Int. J. Dev. Neurosci. 13, 29-39

**PRINGLE, C. R. (1991):**

Paramyxoviridae.

In: FRANCKI, R. I. B., C. M. FAUQUET, D. L. KNUDSON u. D. L. BROWN (Hrsg.):

Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. Arch. Virol. (Suppl 2).

Springer-Verlag, Wien & New York, S. 242-246

**PRINGLE, C. R. (1997):**

The order Mononegavirales – current status.

Arch. Virol. 142, 2321-2326

**PULLIAM, L., B. G. HERNDLER, N. M. TENG u. M. S. MCGRATH (1991):**

Human immunodeficiency virus-infected macrophages produce soluble factors that cause histological and neurochemical alterations in cultured human brains.

J. Clin. Invest. 87, 503-512

**RAIVICH, G., M. T. MORENO-FLORES, J. C. MOLLER u. G. W. KREUTZBERG (1994):**

Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse.

Eur. J. Neurosci. 6, 1615-1618

**RANSOM, P. A. u. W. E. THOMAS (1991):**

Pinocytosis as a select marker of ramified microglia in vivo and in vitro.

J. Histochem. Cytochem. 39, 853-858

**REZAIIE, P. u. D. MALE (1999):**

Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review.

Microscopy research and technique. 45, 359-382

**ROITT, I. M., J. BROSTOFF u. D. K. MALE (1991):**

Kurzes Lehrbuch der Immunologie.

Verlag Georg Thieme, Stuttgart, New York

**RUULS, S. R., J. BAUER, K. SONTROP, I. HUITINGA, B. A. HART, C. D. DIJKSTRA (1995):**

Reactive oxygen species are involved in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats.

J. Neuroimmunol. 56, 201-217

**SATO, J., Y. B. LEE u. S. U. KIM (1995):**

T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture.

Brain Res. 704, 92-96

**SAWADA, M., A. SUZUMURA, H. YAMAMOTO u. T. MARUNOUCHI (1990):**

Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C.

Brain Res. 509, 119-124

**SCHREINER, N. M. S. (2001):**

DNS-Vakzine kodierend für Staupevirus-Proteine und antigenspezifische

Lymphozytenproliferation beim Hund.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

**SCHULZ, L.-C. (1991):**

Pathologie der Haustiere. Bd. II. Krankheiten und Syndrome.  
Fischer Verlag, Jena, S. 146

**SCHWARCZ, R., W. O. WHETSELL JR. u. R. M. MANGANO (1983):**

Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain.  
*Science* 219, 316-318

**SEDGWICK, J. D. , S. SCHWENDER, H. IMRICH, R. DÖRRIES, G. W. BUTCHER u. V. TEUR MEULEN (1991):**

Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system.  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7438-7442

**SELMAJ, K. W. u. C. S. RAINE (1988):**

Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocytes damage in vitro.  
*Ann. Neurol.* 23, 339-346

**SHELL, L. G. (1990):**

Canine distemper.  
*Compend. Cont. Ed. Pract. Vet.* 12. 172-179

**SIEVERS, J., R. PARWARESCH u. H. U. WOTTGE (1994):**

Blood monocytes and spleen macrophages differentiate into microglia-like cells on monolayers of astrocytes.  
*Glia* 12, 245-258

**SMINIA, T., C. J. A. DEGROOT, C. D. DIJKSTRA, J. C. KOETSIER u. C. H. POLMAN (1987):**

Macrophages in the central nervous system of the rat.  
*Immunobiol.* 174, 443-450

**SMITH, M. E. (1999):**

Phagocytosis of myelin in demyelinating disease: a review.  
*Neurochem. Res.* 24, 261-268

**SMITH, M. E., K. VAN DER MAESEN, F. P. SOMERA u. R. A. SOBEL (1998):**

Effects of phorbol myristate acetate (PMA) on functions of macrophages and microglia in vitro.  
*Neurochem. Res.* 23, 427-34

**SOMBERG, R. L., J. P. ROBINSON u. P. J. FELSBURG (1992):**

Detection of canine interleukin-2 receptors by flow cytometry.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* 33, 17-24

**STOLL, G. u. S. JANDER (1999):**

The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS.  
*Progress in Neurobiol.* 58, 233-247

**STREIT, W. J. (1995):**

Microglial cells.  
In: KETTENMANN, H. u. B. R. RANSOM (Hrsg.): Neuroglia.  
Oxford University Press, New York, Oxford, S. 85-97

**STREIT, W. J. (1996):**

The role of microglia in brain injury.  
Neurotoxicology 17(3-4), 671-678

**STREIT, W. J. u. M. B. GRAEBER (1993):**

Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm.  
Glia 7, 68-74

**STREIT, J. W. u. G. W. KREUTZBERG (1987):**

Lectin binding by resting and reactive microglia.  
J. Neurocytol. 16, 249-260

**STREIT, W. J., M. B. GRAEBER u. G. W. KREUTZBERG (1988):**

Functional plasticity of microglia: a review.  
Glia 1, 301-307

**STREIT, W. J., M. B. GRAEBER u. G. W. KREUTZBERG (1989):**

Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system.  
J. Neuroimmunol. 21, 117-123

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

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

**SUMMERS, B. A., J. F. CUMMINGS u. A. DE LAHUNTA (1994):**

Canine distemper encephalomyelitis.  
In: Veterinary Neuropathology.  
Mosby, St. Louis, S. 102-110

**SUZUMURA, A., M. SAWADA, H. YAMAMOTO u. T. MARUNOUCHI (1990):**

Effects of colony-stimulating factors on isolated microglia in vitro.  
J. Neuroimmunol. 30, 111-120

**SUZUMURA, A., T. MARUNOUCHI u. H. YAMAMOTO (1991):**

Morphological transformations of microglia in vitro.  
Brain Res. 545, 301-306

**TERRY, R. D. (1985):**

Alzheimer's disease: clinical aspects, function, and frequency.  
In: DAVIES, R.L. u. D. M. ROBERTSON (Hrsg.): Textbook of neuropathology.  
Williams & Wilkins, Baltimore, S. 824-840

**THOMAS, W. E. (1992):**

Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions.  
Brain Res. Rev. 17, 61-74

**TIPOLD, A. (1995):**

Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study.  
J. Vet. Intern. Med. 9, 304-314

**TIPOLD, A. (1996):**

Die neurologische Form der Hundestaupe – Eine Übersicht.  
Prakt. Tierarzt 5, 399-405

**TIPOLD, A. (1997):**

Hundestaupe.  
In: Entzündungen im Zentralnervensystem  
Enke Verlag, Stuttgart, S. 32-40

**TIPOLD, A., H. PFISTER, A. ZURBRIGGEN u. M. VANDEVELDE (1994):**

Intrathecal synthesis of major immunoglobulin classes in inflammatory diseases of the canine CNS.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 42, 149-159

**TIPOLD, A., A. ZURBRIGGEN, P. MOORE, V. SCHIJNS u. T. W. JUNGI (1998):**

Generation and functional characterisation of canine bone marrow-derived macrophages.  
Res. Vet. Sci. 64, 125-132

**TIPOLD, A., P. MOORE, A. ZURBRIGGEN, I. BURGNER, G. BARBEN u. M. VANDEVELDE (1999):**

Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection.  
Acta Neuropathol. 97, 45-56

**TIZARD, I. R. (2000):**

Veterinary immunology: an introduction.  
6. Aufl. W. B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo

**ULVESTAD, E., K. WILLIAMS, R. BJERKVIG, K. TIEKOTTER, J. ANTEL u. R. MATRE (1994a):**

Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells.  
J. Leuk. Biol. 56, 732-740

**ULVESTAD, E., K. WILLIAMS, R. MATRE, H. NYLAND, A. OLIVER u. J. ANTEL (1994b):**

Fc receptors for IgG on cultured human microglia mediate cytotoxicity and phagocytosis of antibody-coated targets.  
J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 27-36

**ULVESTAD, E., K. WILLIAMS, C. VEDELER, J. ANTEL, H. NYLAND, S. MORK u. R. MATRE (1994c):**

Reactive microglia in multiple sclerosis lesions have an increased expression of receptors for the Fc part of IgG.  
J. Neurol. Sci. 121, 125-131

**VAN DER LAAN, L. J., S. R. RUULS, K. S. WEBER, I. J. LODDER, E. A. DOPP, C. D. DIJKSTRA (1996):**

Macrophage phagocytosis of myelin in vitro determined by flow cytometry: phagocytosis is mediated by CR3 and induces production of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide.  
J. Neuroimmunol. 70, 145-152

**VANDEVELDE, M. u. C. MEIER (1980):**

Multiple sclerosis and canine distemper encephalitis – an epidemiological approach.  
J. Neurol. Sci. 47, 255-260

**VANDEVELDE, M. u. A. ZURBRIGGEN (1995):**

The neurobiology of canine distemper virus infection.  
Vet. Microbiol. 44, 271-280

**VANDEVELDE, M., R. J. HIGGINS, B. KRISTENSEN, F. KRISTENSEN, A. J. STECK, u. U. KIHM (1982a):**

Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathologic, and immunohistological studies.  
Acta Neuropathol. 56, 285-293

**VANDEVELDE, M., F. KRISTENSEN, B. KRISTENSEN, A. J. STECK, u. U. KIHM (1982b):**

Immunological and pathological findings in demyelinating encephalitis associated with canine distemper virus infection.  
Acta Neuropathol. 56, 1-8

**VANDEVELDE, M., A. ZURBRIGGEN, R. J. HIGGINS, u. D. PALMER (1985):**

Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper.  
Acta Neuropathol. 67, 211-218

**VANDEVELDE, M., A. ZURBRIGGEN, A. STECK u. P. BICHSEL (1986):**

Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis.  
J. Neuroimmunol. 11, 41-51

**VAN FURTH, R. (1989):**

Origin and turnover of monocytes and macrophages: cell kinetics of the inflammatory reaction.  
Curr. Top. Pathol. 79, 125-150

**VAN MOLL, P. (1994):**

Immunhistologischer Nachweis von Staupevirus-Antigen bei Wildkarnivoren unter besonderer Berücksichtigung der Antigenverteilung im Gehirn.  
Gießen, Vet. Med. Diss.

**VOLLMER, T. L. u. S. G. WAXMAN (1991):**

Multiple sclerosis and other demyelinating disorders.  
In: ROSENBERG, R. N. (Hrsg.): Comprehensive neurology.  
Raven Press, New York, S. 489-523

**VON ZAHN, J., T. MOLLER, H. KETTENMANN u. C. NOLTE (1997):**

Microglial phagocytosis is modulated by pro- and anti-inflammatory cytokines.  
Neuroreport 8, 3851-3856

**WALKER, D. G., O. YASUHARA, P. A. PATSON, E. G. MC GEER u. P. L. MC GEER (1995):**

Complement C1 inhibitor is produced by brain tissue and is cleaved in Alzheimer's disease.  
Brain Res. 675, 75-82

**WASHINGTON, R. A., B. BECHER, R. BALABANOV, J. ANTEL u. P. DORE-DUFFY (1996):**

Expression of the activation marker urokinase plasminogen-activator receptor in cultured human central nervous system microglia.

J. Neurosci. Res. 45, 392-399

**WATKINS, B. A., H. H. DORN, W. B. KELLY, R. C. ARMSTRONG, W. B. POTTS, F. MICHAELS, C. V. KUFTA u. M. DUBOIS-DALCQ (1990):**

Specific tropism of HIV-1 for microglial cells in primary human brain cultures.

Science 249, 549-553

**WEKERLE, H., C. LININGTON, H. LASSMANN u. R. MEYERMANN (1986):**

Cellular immune reactivity within the CNS.

Trends Neurosci. 9, 271-277

**WESSELINGH, S. L., K. TAKAHASHI, J. D. GLASS, J. C. MC ARTHUR, J. W. GRIFFIN u. D. E. GRIFFIN (1997):**

Cellular localization of tumor necrosis factor mRNA in neurological tissue from HIV-infected patients by combined reverse transcriptase/polymerase chain reaction in situ hybridization and immunohistochemistry.

J. Neuroimmunol. 74, 1-8

**WILEY, C. A., R. D. SCHRIER, J. A. NELSON, P. W. LAMPERT u. M. B. A. OLDSTONE (1986):**

Cellular localization of HIV infection in the brains of AIDS patients.

Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 7089-7093

**WILLIAMS, K., A. BAR-OR, E. ULVESTAD, A. OLIVIER, J. P. ANTEL u. V. W. YONG (1992):**

Biology of adult human microglia in culture: comparisons with peripheral blood monocytes and astrocytes.

J. Neuropathol. Exp. Neurol. 51, 538-549

**WILLIAMS, K., E. ULVESTAD u. J. P. ANTEL (1994a):**

B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ.

Eur. J. Immunol. 24, 3031-3037

**WILLIAMS, K., E. ULVESTAD u. J. P. ANTEL (1994b):**

Immune regulatory and effector properties of human adult microglia studies in vitro and in situ.

Adv. Neuroimmunol. 4, 273-281

**WILLIAMS, K., E. ULVESTAD, A. WAAGE, J. P. ANTEL u. J. MCLAURIN (1994c):**

Activation of adult human derived microglia by myelin phagocytosis in vitro.

J. Neurosci. Res. 38, 433-443

**WISNIEWSKI, H. M., J. WEIGIEL, K. C. WANG, M. KUJAWA u. B. LACH (1989):**

Ultrastructural studies of the cells forming amyloid fibers in classical plaques.

Can J. Neurol. Sci. 16, 535-542

**WRIGHT, N. G., A. J. CORNWELL, H. THOMPSON u. I. M. LAUDER (1974):**

Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis.

Vet. Rec. 94, 86-92

**WUNDERLI, P. S. u. P. J. FELSBURG (1989):**

An improved method for the isolation of enriched canine peripheral blood mononuclear cell and peripheral blood lymphocyte preparations.  
Vet. Immunol. Immunopathol. 20, 335-344

**WÜNSCHMANN, A., S. ALLDINGER, E. KREMMER u. W. BAUMGARTNER (1999):**

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

**ZURBRIGGEN, A., C. MULLER u. M. VANDEVELDE (1993a):**

In situ hybridization of virulent canine distemper virus in brain tissue using digoxigenin labeled probes.  
Am. J. Vet. Sci. 54, 1457-1461

**ZURBRIGGEN, A., M. YAMAWAKI u. M. VANDEFELDE (1993b):**

Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes.  
Lab. Invest. 68, 277-284

**ZURBRIGGEN, A., H. U. GRABER, A. WAGNER u. M. VANDEVELDE (1995):**

Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread  
J. Virol. 69, 1678-1686

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

Oligodendroglial pathology in canine distemper.  
Acta Neuropathol. 95, 71-77

## Danksagung

---

Bei Frau Prof. Dr. Andrea Tipold möchte ich mich für die Überlassung des Themas und ihre engagierte wissenschaftliche und freundschaftliche Unterstützung bedanken, mit der sie mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit gefördert und aufrecht erhalten hat. Die stets von ihr erübrigte Zeit und ihre Hilfe bei Fragen und Problemen waren für das Gelingen dieser Dissertation unersetzlich.

Herrn Prof. Dr. W. Leibold danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung dieser Dissertation und das Einbringen konstruktiver Ideen.

Der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover, insbesondere Herrn PD Dr. H.-J. Schuberth danke ich für die beratende Unterstützung insbesondere bei Fragen zu den Funktionstests der Mikroglia und die Bereitstellung der Streptokokken.

Bei dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover bedanke ich mich für das zur Verfügung gestellte Ultraschallgerät.

Herrn Prof. Dr. I. Nolte danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Frau Regina Carlson. Ihre Hilfsbereitschaft und große Geduld sowie ihr Interesse und ihr Optimismus haben die Zusammenarbeit mit ihr zu einer Freude werden lassen.

Herrn PD Dr. Markus Czub danke ich herzlich für die freundliche Anleitung beim Erlernen der Technik der Mikrogliaisolation am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg, die konstruktive Kritik bei sich aufwerfenden Fragen und Problemen sowie die gewährte Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes in Würzburg.

Frau Dr. Regine Hansen danke ich für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit beim Erlernen der Mikrogliaisolation am Institut für Virologie und Immunbiologie sowie ihr Engagement und die große Hilfsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Peter F. Moore danke ich herzlich für die Bereitstellung der Antikörper zur Färbung der Mikroglia und die gewährte Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Zurbriggen bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit zur Teilnahme an der Impfstoffstudie, die freundliche Aufnahme in der Schweiz und die jederzeit gewährte Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Marc Vandeveldede bedanke ich mich sehr für die Beurteilung der pathologischen Befunde.

Frau Dr. Monika Griot-Wenk danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfe während des Versuchs im Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe in der Schweiz.

Frau Doris Karner und Frau Ines Schmid danke ich ebenso wie Frau Dr. Nicole Schreiner für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft während der Versuchsdurchführung im Institut für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe.

Bei Frau Dr. R. Fatzer und Frau Dr. A. Gröne möchte ich mich für die Durchführung und Beurteilung der Histopathologie bedanken.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter des Instituts für Viruskrankheiten und Immunprophylaxe in Mittelhäusern bei Bern möchte ich mich bei Herrn Dr. Christian Griot, Herrn Dr. Lukas Bruckner und Frau Ruth Riechsteiner für die freundliche Aufnahme, die stets gewährte Hilfe und die problemlose Zusammenarbeit bedanken.

Meinen Freunden danke ich für das Interesse und ihr stets offenes Ohr. Vor allem Jan und Andy waren mir mit Ratschlägen und kritischer Unterstützung eine Hilfe.

Ganz besonders möchte ich mich bei Lisa bedanken, die mir zu jeder Zeit bei kleinen und größeren Problemen zur Seite gestanden hat. Durch sie wird mir die Zeit als Doktorandin in besonders schöner Erinnerung bleiben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern waren durch ihr Vertrauen, ihre Geduld und ihre Ratschläge für mich eine große Unterstützung. Meiner Schwester Marita danke ich für die so oft gewährte moralische Unterstützung und vieles mehr. Mein ganz besonderer Dank gilt Michael, der mir durch seine computertechnischen Kenntnisse immer zur Seite stand und ganz besonders in der Endphase der Doktorarbeit durch seine Kritik beim Korrekturlesen und der vielen geopferten Zeit eine unersetzliche Hilfe war. Danke.