

Gießen 2002

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

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

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Leiser

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juni 2002

Berichte aus der Veterinärmedizin

Stefanie Markus

**Untersuchungen über die Zytokin-Expression
im Gehirn von Hunden mit nervöser Staupe
mittels semiquantitativer RT-PCR**

D 26 (Diss. Universität Giessen)

**Shaker Verlag
Aachen 2002**

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Markus, Stefanie:

Untersuchungen über die Zytokin-Expression im Gehirn von Hunden mit nervöser Staupe mittels semiquantitativer RT-PCR / Stefanie Markus.

Aachen : Shaker, 2002

(Berichte aus der Veterinärmedizin)

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2002

ISBN 3-8322-0495-4

Copyright Shaker Verlag 2002

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-0495-4

ISSN 0945-103X

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	4
2.1	Das Staupevirus	4
2.2	Formen der Staupevirusenzephalitis	8
2.3	Die Pathogenese der demyelinisierenden Staupeenzephalitis	9
2.3.1	Die frühe demyelinisierende Staupeenzephalitis	9
2.3.2	Die chronische demyelinisierende Staupeenzephalitis	11
2.4	Zytokine	14
2.4.1	Physiologische Bedeutung der Zytokine.....	14
2.4.2	Zytokine bei demyelinisierenden ZNS-Erkrankungen.....	15
2.5	Quantitative RT-PCR.....	28
2.5.1	Methoden der Auswertung.....	28
2.5.1.1	Gelelektrophoretische Auswertung.....	28
2.5.1.2	Auswertung in Echtzeit.....	29
2.5.2	Methoden der Quantifizierung.....	30
2.5.3	Spezifität der amplifizierten Produkte	36
3	Material und Methoden	37
3.1	Untersuchungsmaterial	37
3.2	Histochemische und immunhistologische Untersuchungen	40
3.2.1	Histochemische Färbeverfahren.....	40
3.2.2	Immunhistologie	41
3.2.2.1	Seren und Antikörper.....	41
3.2.2.2	Protokoll der Immunhistologie (ABC-Methode).....	42
3.2.2.3	Kontrollen für die Immunhistologie	43
3.2.3	Auswertung der Gehirnschnitte	44
3.2.4	Statistische Analyse der immunhistologischen Auswertung	45
3.3	RNS-Isolierung, qualitative und semiquantitative RT-PCR.....	46
3.3.1	Versuchsaufbau.....	46

3.3.2	Vorsichtsmaßnahmen zur Kontaminationsvermeidung	46
3.3.3	Primerauswahl	47
3.3.4	RT-PCR-Kontrollen	51
3.3.4.1	Stimulation kaniner Lymphozyten aus Nativblut und RNS-Isolierung...	51
3.3.4.2	Spezifität der als Positivkontrollen dienenden Amplifikate	52
3.3.5	RNS-Isolierung aus Kryostatschnitten	53
3.3.6	Durchführung der DNase-Behandlung und der RT-PCR	54
3.3.6.1	DNase-Behandlung	54
3.3.6.2	Reverse Transkriptase-Reaktion	55
3.3.6.3	Konventionelle PCR	57
3.3.6.4	Echtzeit-PCR	57
3.3.7	Dokumentation und Auswertung	62
3.3.7.1	Auswertung der konventionellen PCR	62
3.3.7.2	Auswertung der Echtzeit-PCR	63
3.3.8	Statistische Auswertung	65
4	Ergebnisse.....	67
4.1	Klinik, Impfstatus und Organbefund der Kontrolltiere	67
4.2	Klinik und Impfstatus der an Staupe erkrankten Hunde	67
4.3	Pathologisch-histologische Befunde der Kontrolltiere	69
4.4	Pathologisch-histologische Befunde der an Staupe erkrankten Hunde ...	69
4.4.1	Organe	69
4.4.2	Großhirne	71
4.4.3	Kleinhirne	72
4.5	Befunde der in OCT eingebetteten Groß- und Kleinhirnsegmente	73
4.5.1	Neuropathologische Befunde	73
4.5.1.1	Kontrolltiere	73
4.5.1.2	Staupe-erkrankte Hunde	74
4.5.2	Verteilung Staupevirus-Nukleoprotein-Antigen-positiver Zellen	76
4.5.2.1	Kontrollhunde	76
4.5.2.2	Staupe-erkrankte Hunde	76
4.5.3	Verteilung BS-1-positiver Zellen	79
4.5.3.1	Kontrolltiere	79

4.5.3.2	Staupe-erkrankte Hunde	79
4.5.4	Verteilung GFAP-positiver Zellen.....	81
4.5.4.1	Kontrolltiere.....	81
4.5.4.2	Staupe-erkrankte Hunde	81
4.5.5	Verteilung MHC-Klasse-II-Oberflächenantigen-positiver Zellen	83
4.5.5.1	Kontrollhunde	83
4.5.5.2	Staupe-erkrankte Hunde	83
4.5.6	Verteilung CD3e-, CD4-, CD8- und CD21(like)-positiver Zellen	85
4.5.6.1	Kontrollhunde	85
4.5.6.2	Staupe-erkrankte Hunde	86
4.5.7	Histochemische und immunhistologische Abbildungen.....	87
4.5.8	Grafiken der immunhistologischen Auswertung	102
4.6	RT-PCR	104
4.6.1	Spezifität der eingesetzten Primer	104
4.6.2	Konventionelle qualitative RT-PCR.....	105
4.6.2.1	Nachweis von β -Aktin-mRNS und Staupevirus-RNS.....	105
4.6.2.1.1	Kontrolltiere.....	105
4.6.2.1.2	Staupe-erkrankte Tiere.....	105
4.6.2.2	Nachweis von Zytokin-mRNS.....	106
4.6.2.2.1	Kontrolltiere.....	106
4.6.2.2.2	Staupe-erkrankte Hunde	106
4.6.2.3	Gele der konventionellen qualitativen RT-PCR	107
4.6.3	Qualitative und semiquantitative Echtzeit-PCR	110
4.6.3.1	Abbildungen der als Beispiel dargestellten Echtzeit-PCR-Läufe	112
4.6.3.2	Nachweis von β -Aktin- und GAPDH-mRNS sowie Staupevirus-RNS	117
4.6.3.2.1	Großhirne	117
4.6.3.2.2	Kleinhirne	117
4.6.3.3	Grafiken der semiquantitativen Echtzeit-PCR-Ergebnisse für die β -Aktin- und GAPDH-mRNS sowie die Staupevirus-RNS	118
4.6.3.3.1	Großhirne	118
4.6.3.3.2	Kleinhirne	119
4.6.3.4	Qualitativer und semiquantitativer Nachweis von Zytokin-mRNS	120
4.6.3.4.1	Großhirne	120
4.6.3.4.2	Kleinhirne	122

4.6.3.5	Grafiken der semiquantitativen Echtzeit-PCR-Ergebnisse für den Nachweis von Zytokin-mRNS	125
4.6.3.5.1	Großhirne.....	125
4.6.3.5.2	Kleinhirne.....	128
5	Diskussion.....	131
5.1	Etablierung der semiquantitativen RT-PCR.....	131
5.2	Vergleich der zelleigenen Standards	132
5.3	Pathohistologische und immunhistologische Befunde der an Staupe erkrankten Hunde.....	133
5.4	Zytokin-mRNS-Nachweis	135
5.4.1	Zytokin-mRNS Nachweis in den Großhirnen der an Staupe erkrankten Hunde.....	135
5.4.2	Zytokin-mRNS-Nachweis in den Kleinhirnen der an Staupe erkrankten Hunde.....	141
5.5	Zusammenfassung der Großhirn- und Kleinhirn-Befunde.....	148
6	Zusammenfassung	149
7	Summary	152
8	Literaturverzeichnis	155
9	Anhang.....	175
9.1	Bezugsquellen für Antikörper, Chemikalien, Enzyme und Primer	175
9.2	Bezugsquellen für Geräte und Einmalartikel.....	178
9.3	Lösungen und Puffer	180
9.3.1	Luxol-Fast-Blue-Kresyecht-Violett-Färbung	180
9.3.2	Lymphozyten-Transformations-Test	180
9.3.3	Gewebekultur	181
9.3.4	Immunhistologie.....	181
9.3.5	RT-PCR	182
9.4	Abkürzungen	183
