

**Aus dem Institut für Neuropathologie
an den Medizinischen Einrichtungen der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Univ. Prof. Dr. Guido Reifenberger

Zur Pathogenese der Borna-Krankheit:

**Retinopathien bei immunkompetenten und immuninkompetenten
BDV-infizierten Ratten**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von**

Notker Schmitz-Schachner

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. Raab

Dekan

Referent: Prof. Dr. Bilzer

Korreferent: Prof. Dr. Althaus

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2	EINLEITUNG	4
3	LITERATURÜBERSICHT	6
3.1	Borna Krankheit	6
3.1.1	Historie	6
3.1.2	Erregercharakterisierung	7
3.1.3	Wirtsspektrum	12
3.1.4	Epidemiologie	15
3.1.5	Klinik	16
3.1.6	Infektion	18
3.1.7	Neuropathologie	20
3.1.8	Pathogenese	22
4	MATERIAL UND METHODEN	28
4.1	Verbrauchsmaterial	28
4.2	Lösungen	29
4.3	Normalseren	31
4.4	Antikörper	32
4.4.1	Primäre Antikörper	32
4.4.2	Sekundäre Antikörper	32
4.5	Probe für die in-situ-Hybridisierung	33
4.6	Virus	33
4.7	Versuchstiere und Infektion	33
4.8	Immunsuppression	34
4.8.1	CSA-Behandlung	34
4.8.2	CY-Behandlung	34
4.8.3	Behandlung mit T-Zell-spezifischen monoklonalen Antikörpern	35
4.9	Versuchsdurchführung	35
4.9.1	Probenentnahme und Paraffinschnitte	35

4.9.2	Gefrierschnitte	37
4.9.3	Konventionelle Färbung	37
4.9.4	Immunhistologische Färbung	37
4.9.5	In-situ-Hybridisierung	38
4.10	Auswertung	41
4.10.1	Beurteilung der klinischen Symptome	41
4.10.2	Histologie	41
4.10.3	Immunhistologie	42
5	ERGEBNISSE	43
5.1	Histologische Untersuchungen	43
5.1.1	Normalstruktur der Retina	43
5.1.2	Infektionsausbreitung	46
5.1.3	Pathologische Veränderungen der Retina	47
5.2	Immunhistochemische Untersuchungen	56
5.2.1	Immunmarker	57
6	DISKUSSION	86
6.1	Adult BDV-infizierte, immunkompetente Tiere	93
6.2	Immunkompromitierte BDV-infizierte Tiere	106
7	ABBILDUNGEN UND DIAGRAMME	149
8	ZUSAMMENFASSUNG	164
9	SUMMARY	166
10	LITERATUR	168

1 **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	- Abbildung
Ak	- Antikörper
Aqua bidest.	- destilliertes Wasser
BD	- Borna Disease (Borna Krankheit)
BDV	- Borna Disease Virus (Virus der Borna Krankheit)
bes.	- besonders
BSA	- Bovines Serum Albumin
bzw.	- beziehungsweise
ca.	- circa
CD	- Cluster of Differentiation (Leukozyten-Differenzierungs-Antigene)
CDV	- Canine Distemper Virus (Staupevirus)
cDNA	- copy Desoxyribonukleinsäure
CFS	- chronic fatigue syndrom
CMV	- Zytomegalovirus (Zytomegalievirus)
CSA	- Cyclosporin A
CY	- Cyclophosphamid
DAB	- Diaminobenzidin
DEPC	- Diethylpyrocarbonat
d.h.	- das heißt
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
d.p.i.	- dies post infectionem (Tage nach Infektion)
DTT	- Dithiothreitol
EAE	- Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	- et aliter (und andere)
evtl.	- eventuell
FKS	- fetales Kälberserum
GFAP	- Glial Fibrillary Acidic Protein
GMEM	- Glasgow-Modifikation von Eagle's Medium
gp	- glycoprotein

GSA	- Griffonia simplicifolia agglutinin
h	- Stunde
H.E.	- Hämalaun-Eosin
HIV	- Human Immunodeficiency Virus
HSV	- Herpes Simplex Virus
HTLV	- Human T-Cell Lymphotropic Virus
i.c.	- intracerebral
ICAM	- Intercellular Adhesion Molecule
IEG	- Immediate Early response Gene
IFN	- Interferon
Ig	- Immunglobulin
Il	- Interleukin
IMDM	- Iscoves Modifikation von Dulbecco's Medium
i.n.	- intranasal
iNOS	- inducible nitric oxide synthase
i.p.	- intraperitoneal
i.v.	- intravenös
kDa/kD	- Kilo Dalton
kg	- Kilogramm
KG	- Körpergewicht
LCM	- lymphozytäre Choriomeningitis
LCMV	- Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LG	- Late response Gene
M	- Mol
mAk	- monoklonale(r) Antikörper
MCMV	- Murines Zytomegalievirus
MDCK	- Madin Darby Canine Kidney
MHC	- Major Histocompatibility Complex
mRNA	- messenger Ribonukleinsäure
MuLV	- Moloney murine leukemia virus
N.	- Nervus
NGF	- Nerve Growth Factor
NK-Zellen	- natürliche Killer Zellen

NMDA	- N-Methyl-D-Aspartat
NNS	- negative nonsegmented single-stranded
NO	- nitric oxide
ORF	- open reading frame
PBMC	- peripheral blood mononuclear cells
PBS	- Phosphate Buffered Saline
PCR	- Polymerase Chain Reaction
p.i.	- post infectionem
PNS	- peripheres Nervensystem
r	- rekombinant
RCS	- Royal College of Surgeons
REB	- rabbit embryonal brain cells (Kaninchenembryogehirnzellen)
RNA	- Ribonukleinsäure
RPA	- Ribonuclease Protection Assay
RT-PCR	- Reverse Transkriptions Polymerase Kettenreaktion
SDS	- Sodiumdodecylsulfat
SOD	- Superoxid-Dismutase
SYNV	- sonchus yellow net virus
Tab.	- Tabelle
TCID	- Tissue Culture Infectious Dose
TE	- Tris EDTA
TF	- Tissue Factor
TGF	- Transforming Growth Factor
Th	- T-Helferzelle
TNF	- Tumor Nekrose Faktor
Tris	- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	- unter anderem
U.S.A.	- United States of America
UV	- Ultraviolett
VLA	- Very Late Activation Antigen
z.B.	- zum Beispiel
ZNS	- Zentralnervensystem
z.T.	- zum Teil

2 Einleitung

Die Borna Krankheit (Borna disease = BD) wurde ursprünglich als eine bei Pferd und Schaf vorkommende Erkrankung des Zentralnervensystems beschrieben, die vorwiegend in bestimmten endemischen Gebieten in Mittel-, Süd- und Osteuropa vorkommt. Zusätzlich müssen Esel, Kaninchen, Rinder, Katzen, Hunde und möglicherweise Strauße zu den natürlichen Wirten gezählt werden. Das Spektrum experimentell infizierbarer Spezies reicht vom Huhn über verschiedene Nager bis zu Primaten. Darüberhinaus konnten sowohl Borna Disease Virus (BDV)-spezifische Antikörper, als auch virales Antigen und infektiöses Virus beim Menschen nachgewiesen werden, und es gibt Hinweise, daß ein Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen – insbesondere Schizophrenien bestehen könnte. Allerdings ist der Nachweis virus-spezifischer Nukleinsäuren im Blut psychiatrischer Patienten weiterhin umstritten. Ursache der BD ist eine persistierende Infektion des Nervengewebes mit dem BDV, einem neurotrophen Virus, das nach vermutlich nasaler Infektion zu unterschiedlichen und komplexen neurologischen Krankheitsbildern führt, die von subtilen Störungen des cholinergen Systems bis zu schweren Hirnatrophien und Demenz reichen. Bei der klassischen BD handelt es sich um eine Meningo-polioenzephalomyelitis, die gekennzeichnet ist durch Erregungs- und Depressions-zustände, Krämpfe, Paresen, Paralysen und Störungen der Nahrungsaufnahme. Nach Auftreten der ersten Symptome dauert die Krankheit 10-14 Tage, selten 4-6 Wochen. Die Letalität beträgt 80-90 %.

Zur Erforschung der Pathogenese der BD wurden verschiedene experimentelle Systeme etabliert. Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen BD bei Ratten ergaben, daß sowohl CD4+ T-Zellen als auch CD8+ T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immunpathogenese spielen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es neben der Meningopolioenzephalomyelitis mit massivem Substanzverlust der Hirnrinde auch zur Ausbildung einer Retinitis mit starken degenerativen Veränderungen, die bei der Ratte schließlich mit totaler Retinaatrophie und Blindheit endet. Neben immunpathologischen Prozessen gibt es auch Anhalte für andere - direkte oder indirekte - zytopathogene Wirkungen des BDV. So sind erste degenerative Erscheinungen in

Form von Nervenzellnekrosen im Hippocampus bereits um den zehnten Tag p.i., noch vor Einsetzen erster entzündlicher Veränderungen, zu beobachten.

Die experimentelle Infektion neugeborener und erwachsener immunsupprimierter Tiere hat keine BD-spezifischen Krankheitssymptome zur Folge. Sie führt aber zu Funktionsausfällen des ZNS, die sich in Verhaltensstörungen und Verzögerungen bei der Bewältigung komplexer, experimenteller Aufgaben äußern. Histopathologisch korrelieren diese Befunde mit einem spät nach der Infektion auftretendem Hydrocephalus mit deutlichen Substanzverlusten ohne vorherige pathognomonische Klinik und entzündliche Veränderungen. Bei neugeborenen infizierten, immuninkompetenten Ratten findet man bei merklichen Verhaltensabweichungen und Lern- wie Gedächtnisdefiziten sowohl eine Abnahme der Neuronendichte im Gyrus dentatus des Hippocampus, als auch eine geringere Größe des Kleinhirns mit stark reduzierter Anzahl der Purkinje-Zellen. Es ist bisher unklar, welche Mechanismen zum Zelluntergang sowohl bei der typischen BD als auch bei der atypischen asymptomatischen Form beitragen.

In der hier vorliegenden Arbeit sollen anhand histologischer und immunhistochemischer Untersuchungen degenerative Veränderungen der Retina während der BDV-Infektion sowohl in adult infizierten immunkompetenten Ratten einerseits als auch in immunsupprimierten Tieren andererseits untersucht werden.

3 Literaturübersicht

3.1 Borna Krankheit

3.1.1 Historie

Die Borna Krankheit ist in Deutschland seit über 230 Jahren als gefürchtete Pferde-seuche bekannt und wurde erstmals 1766 beschrieben (zitiert nach Gellert, 1995). Eine erste Niederschrift über die „hitzige Kopfkrankheit der Pferde“ (Autenrieth, zit. nach Zwick, 1939) stammte aus dem Jahr 1813. Die Erkrankung wurde als halbakute Gehirnentzündung (Wörz, 1958, zitiert nach Heinig 1969), subakute Meningitis (Dinter, 1879) und Schlafsucht der Pferde (Winkler, 1883) beschrieben, bis ein seuchenhaftes Vorkommen in einem Kavallerieregiment im Bezirk Borna (Sachsen) um 1894 zu der heutigen Bezeichnung führte. Zwick charakterisierte sie 1939 als „Seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung der Pferde“. Verstärkte Untersuchungen über die Natur der Krankheit und ihres Erregers führten 1909 zur Entdeckung der typischen, pathognomonischen intranukleären Einschlusskörperchen in Ganglienzellen durch Joest und Degen, die der bis dahin angenommenen Kokkenätiologie (Übersicht bei Heinig, 1969) die Vermutung einer Virusinfektion entgegenstellten (1911).

Die Virusätiologie konnte im Jahr 1927 von Zwick und Seifried durch Übertragung eines bakterienfreien Gehirnhomogenates eines an der Borna Krankheit erkrankten Pferdes auf Kaninchen (Zwick und Seifried, 1925) und die erfolgreiche Rückübertragung auf das Pferd bewiesen werden (Zwick et al., 1927).

In den nächsten Jahrzehnten verbesserten sich die labortechnischen Möglichkeiten, so daß nach dem zweiten Weltkrieg der Nachweis komplementbindender Antikörper im Serum infizierter Kaninchen gelang (Sprockhoff, 1954) und die Züchtung des Virus in verschiedenen Zellkulturen möglich wurde (Mayr und Danner, 1972). 1963 gelang Nitzschke die Adaption der Kaninchenpassageviren an die Ratte, einem hinsichtlich immunologischer Reaktionen gut definierten Tiermodell mit ähnlicher Krankheits-symptomatik wie beim Pferd. Aus Untersuchungen an neugeborenen, immunsupprimierten und athymischen Ratten leiteten verschiedene Autoren her, daß hauptsäch-

lich zellvermittelte immunpathologische Mechanismen für die Zell-destruktionen im Laufe der BD verantwortlich sind (Narayan et al., 1983a, b; Übersicht bei Rott, 1987).

3.1.2 Erregercharakterisierung

Beim Borna-Virus handelt es sich um ein nicht-segmentiertes (Cubitt und de la Torre, 1994) RNA-Einzelstrang-Virus mit negativer Polarität (NNS-RNA-Virus; de la Torre et al., 1990; McClure et al., 1992; Briese et al., 1992), das unter die Mononegavirales (Cubitt et al., 1994a) eingeordnet wird. Aufgrund von Sequenzstudien vermuten verschiedene Autoren eine Verwandtschaft des BDV zu Filo- (Briese et al., 1994), Paramyxo- und Rhabdoviridae (McClure et al., 1992; Cubitt et al., 1994a; Briese et al., 1994), die ebenfalls zur Ordnung Mononegavirales gehören: So finden sich Übereinstimmungen in cistronischen und extracistronischen RNA-Anteilen zwischen Filo-, Paramyxo- und Rhabdoviren und dem BDV (Briese et al., 1994).

Das aus 8910 Nukleotiden bestehende Genom weist komplementäre 3' und 5' Enden auf (Briese et al., 1994) und enthält fünf große offene Leserahmen (ORF, open reading frame; Cubitt et al., 1994a; Briese et al., 1994). Neun verschiedene polyadenylierte subgenomische RNA-Ketten mit komplementärer Polarität zum negativsträngigen RNA-Genom sind gefunden worden (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a), die sowohl monocistronische, den ORF's I und II entsprechende, als auch polycistronische Transkripte umfassen (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a). Aufgrund einiger Unterschiede zu anderen RNA-Viren der Ordnung Mononegavirales schlugen Briese et al. 1994 vor, das BDV als Vertreter eines Genus der Bornaviren oder der Familie der Bornaviridae zu etablieren:

1. Das BDV-Genom enthält lediglich drei verschiedene Initiations- und vier unterschiedliche Terminationssignale und zeigt daher nicht den typischen Aufbau mit Terminationssignal, zu transkribierender Region und Startsignal an den Gengrenzen, sondern Transkriptionseinheiten und -signale überlappen sich häufig, was für die Kontrolle viraler Transkription von Bedeutung sein kann (Schneemann et al., 1994).

2. Das BDV zeigt über unzählige Passagen durch verschiedene Wirtsspezies eine außergewöhnliche Konstanz der Genomsequenz, welche für die meisten RNA-Viren untypisch ist (Schneider et al., 1994a).
3. Replikation (Cubitt und de la Torre., 1994) und Transkription (Briese et al., 1992) finden im Gegensatz anderen tierischen NNS-RNA-Viren im Zellkern statt, was zu der Annahme führte, daß eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen BDV und pflanzlichen Rhabdoviren möglich sei, welche ebenfalls im Zellkern replizieren und transkribieren; dies wurde durch die Beobachtung bekräftigt, daß die Polymerase-Proteine vom BDV und dem pflanzlichen SYNV (sonchus yellow net virus) eine ähnliche, entfernte verwandtschaftliche Beziehung zu den Polymerase-Proteinen der tierischen Rhabdoviren aufweisen (Cubitt et al., 1994a); neuere Untersuchungen konnten durch Nachweis von genomischer und antigenomischer BDV-RNA, sowie von 39/38-kDa (N) und gp18 (M) BDV-Proteinen den Ort der Replikation und Transkription auf den Nukleolus eingrenzen (Pyper et. al., 1998).
4. Posttranskriptionales Spleißen von RNA wurde bisher noch bei keinem anderen NNS-RNA-Virus beobachtet (Schneider et al., 1994b; Cubitt et al., 1994b); die Expression der ORF's III, IV und V – alle drei der dritten, polycistronischen Transkriptionseinheit mit zwei Introns zugehörig – ist abhängig vom unterschiedlichen Spleißen dieser beiden Introns (Schneider et al., 1997 b,c).

Wie bei anderen Viren der Ordnung Mononegavirales läßt sich das NNS-RNA-Genom des BDV wahrscheinlich in drei Blöcke einteilen (Tordo et al., 1992; de la Torre, 1994):

1. Block 1 (Proteine N und P) der Nukleoproteine und Polymerase - Kofaktoren
2. Block 2 (Proteine M und G) der Matrix - und Hüllenproteine
3. Block 3 (ORF V) der viralen Polymerase

Insgesamt gibt es drei Transkriptionseinheiten und sechs ORF's (Schneider et al., 1997c; Malik et al., 1999), die vom 5' zum 3' Ende jeweils einem Protein zugeordnet werden können (Schneider et al., 1997a, b): ORF I kodiert das Nukleoprotein N, bekannt als p40 oder 38/39-kDa-Protein (McClure et al., 1992; Pyper et al., 1993; Hsu et al., 1994), ORF II das Phosphoprotein P (p23/p24; Thierer et al., 1992; Hsu et al., 1994; Kliche et al., 1996) und ORF III beinhaltet die Kodierungssequenz für das Matrixprotein M, einem Glykoprotein (gp18; Kliche et al., 1994; Schneider et al., 1997b),

vorher bezeichnet als 14,5-kDa-Protein oder p14,5 (Schädler et al., 1985). Ein zweites Glykoprotein G (gp 94) wird durch den Leserahmen ORF IV (G-ORF; Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a) kodiert, ORF V schließlich enthält Informationen für ein Protein, dessen Molekulargewicht ca. 180 kDa beträgt und dessen Aminosäuresequenz große Ähnlichkeiten mit RNA-abhängigen RNA-Polymerasen der L-Protein-Familie anderer NNS-RNA-Viren aufweist (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994a); weiterhin beinhaltet der größte Leserahmen mutmaßliche Kern-Lokalisations-Signale (Garcia-Bustos et al., 1991; Roberts, 1989), die einen Transport des BDV L-Proteins in den Nukleus vermitteln könnten, wo Replikation und Transkription stattfinden (de la Torre, 1994). Neuere Untersuchungen beschreiben einen sechsten kleinen Leserahmen (ORFxl), der zwischen ORF I und ORF II lokalisiert ist, und ein p10 Protein kodiert (Malik et al., 1999; Wehner et al., 1997), wobei es sich um ein nicht-glykosyliertes Protein handelt, welches sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma BDV-infizierter Zellen zu finden ist. In-vitro-Untersuchungen zeigten Wechselwirkungen zwischen dem p10 Protein und dem Nukleoprotein N. Vermutungen wurden geäußert, daß es eine Rolle in der Replikation und/oder Transkription des BDV spielt (Malik et al., 1999).

Das in infizierten Zellen am häufigsten vorkommende Nukleoprotein N findet man in zwei Formen sowohl als 39-, als auch als 38-kDa-Protein, welchem die 13 NH₂-terminalen Aminosäuren des 39-kDa-Proteins fehlen. Diese Sequenz beinhaltet ein Kern-Lokalisations-Signal (Pyper und Gartner, 1997; Kobayashi et al., 1998). Als einziges Protein ist dieses auch auf der Oberfläche BDV-infizierter Zellen zu finden (Thiedemann et al., 1992), was sich mit den Untersuchungsergebnissen deckt, daß das Nukleoprotein N das Hauptziel der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort ist, während auf den anderen BDV-spezifischen Proteinen keine diesbezüglich relevanten Epitope gefunden wurden (Planz und Stitz, 1999). Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß das Nukleoprotein N in infizierten Zellen Komplexe mit dem Phosphoprotein P bildet (Hsu et al., 1994; Schwemmle et al., 1998; Berg et al., 1998b); Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Proteinen, aber auch mit der Polymerase scheinen Auswirkungen auf die Regulation der BDV-Transkription/Replikation und die Zusammensetzung der Ribonukleoproteine zu haben (Schwemmle et al., 1998).

Phosphoproteine von Viren der Ordnung Mononegavirales dienen typischerweise als Transkriptionsfaktoren und werden durch Phosphorylierung aktiviert; auch für das Phosphoprotein P des BDV sind entsprechende enzymatische Vorgänge gefunden worden (Schwemmle et al., 1997). Wie beim Nukleoprotein N sind gleichfalls beim Phosphoprotein P Kern-Lokalisations-Signale sowohl in der N-, wie C-terminalen Region des Proteins nachgewiesen worden (Shoya et al., 1998; Schwemmle et al., 1999).

Folglich konnten das nicht-glykolytierte und nicht-phosphorylierte Nukleoprotein N und das nicht-glykosylierte Phosphoprotein P in in-vitro-Untersuchungen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern infizierter Zellen gefunden werden (Thiedemann et al., 1992). Das Phosphoprotein P trägt acht kontinuierliche und ein diskontinuierliches Epitop am aminoterminalen Ende, das auch mit monospezifischen und monoklonalen Antikörpern, die gegen das Nukleoprotein N gerichtet sind, reagieren (Kliche et al., 1996). Diese Reaktion erklärt eine Kreuzreaktivität, die zwischen den auf Aminosäureebene nicht verwandten Proteinen N und P zu beobachten ist (Thiedemann et al., 1992).

Glykoproteine von Viren der Ordnung Mononegavirales spielen eine wichtige Rolle bei frühen Schritten des viralen Lebenszykluses wie z.B. bei viraler Adsorption und Penetration (Morrison und Portner, 1991; Wagner, 1987).

Das glykosylierte Matrixprotein M (gp18; Kliche et al., 1994) liegt wahrscheinlich an der Oberfläche viraler Partikel (Hatalski et al., 1995). Es bildet eine stabile Tetramer-Struktur mit einem Molekulargewicht von 68 kDa (Stoyloff et al., 1997). In-vitro-Versuche zeigten, daß es eine BDV-Infektion in einer dosis-abhängigen Weise inhibiert (Stoyloff et al., 1997), wobei in Versuchen mit Anti-Kohlehydrat-Antisera dargestellt wurde, daß die Kohlehydratreste die entscheidende Rolle spielen (Stoyloff et al., 1998). Aufgrund jener Versuche wurde gefordert, daß es sich bei dem Protein um eine für die virale Adsorption essentielle Membrankomponente handelt (Stoyloff et al., 1997).

Ein Antiserum gegen diese Kohlehydratreste bindet auch an das zweite virus-spezifische Glykoprotein G (94 kDa/gp94; Stoyloff et al., 1998), einem Membran-

protein, das die Fähigkeit besitzt, BDV-Infektionen präinkubierter kultivierter Zellen zu stören; daher erscheint es ebenfalls als wichtig für virale Adsorption und Penetration (Schneider et al., 1997a; Stoyloff et al., 1998).

Filtrationsstudien mittels Kolloidum-Membranen (Elford und Galloway, 1933) deuteten auf eine Größe des Virus von 85-125 nm hin. Später grenzten Danner und Mayr (1979) die Partikelgröße weiter auf 80-100 nm ein.

Sasaki und Ludwig (1993) fanden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen im Bereich der Joest-Degenschen Einschlußkörperchen entsprechend 100 nm große intranukleäre Partikel, umgeben von einer 20 nm dicken gekörnten Schicht; in Verbindung mit in-situ-Hybridisierungs-Studien von virus-spezifischer RNA im Bereich der Joest-Degenschen Einschlußkörperchen halten die Untersucher die gefundenen Partikel für das BDV (Sasaki und Ludwig, 1993).

Nach Gradientenzentrifugation wurden zwei Gruppen sphärischer Partikel gefunden: Eine von ca. 90 nm Größe, die umhüllte, elektronendichte Kerne (evtl. das Nukleokapsid) von 50-60 nm Durchmesser enthält, und eine von im Durchmesser ebenfalls 50-60 nm großen Partikeln, wobei es sich entweder um defekte oder unreife Viren handeln könnte (Zimmermann et al., 1994).

Morphologisch scheint das BDV ein lipid-umhüllter spärlicher Partikel zu sein, der eine innere, aus strang-ähnlichem Material bestehende Struktur beinhaltet (Compans et al., 1994). Neuere Untersuchungen beschreiben für das sphärische, umhüllte Virus eine Größe von ca. 130 nm; die Hülle weist 7 nm lange Spikes auf und das 4 nm breite Nukleokapsid liegt in den peripheren Abschnitten des Virus (Kohno et al., 1999).

Schon 1979 gab die Empfindlichkeit des infektiösen Agens gegenüber Lipidlösungsmitteln Hinweise auf die Existenz einer lipidhaltigen Hülle (Danner und Mayr, 1979). Das BDV ist temperaturlabil: Bei 37 °C ist es nach zwei Tagen inaktiv, bei 56 °C bereits nach einigen Minuten (Danner, 1982). Dagegen ist es bei einer Temperatur von -70 °C

jahrelang stabil (Danner und Mayr, 1979). Gegenüber UV-Licht ist der Erreger empfindlich (Heinig, 1969; Nicolau und Galloway, 1928; Danner und Mayr, 1979), ebenso gegen Formalin und verschiedene chlorabspaltende, sowie pH-verschiebende Desinfektionsmittel (Nicolau und Galloway, 1928; Witte und Schaaf, 1934).

Das Virus wird innerhalb der Axone transportiert, passiert Synapsen und breitet sich entlang den Nervenbahnen aus (Carbone et al., 1987; Morales et al., 1988; Gosztonyi et al., 1993). An den Synapsen sind trotz Transfers zu keinem Zeitpunkt der Erkrankung Viruspartikel nachweisbar. Daher postulierten Gosztonyi et al., daß der synaptische Transfer wahrscheinlich in Form von Ribonucleoprotein-Transkriptase-Komplexen stattfindet. Die Ausbreitung im ZNS in einer unvollständigen Form läßt das Virus morphologisch nicht wahrnehmbar erscheinen. Eventuell erscheint das Virus in seiner kompletten, umhüllten Form nur beim Verlassen des Wirtorganismus (Gosztonyi et al., 1993).

Aufgrund der Infektiosität von BDV-Ribonucleoproteinen zogen auch Cubitt und de la Torre in Betracht, daß sich manche neurotrope Viren im ZNS ohne Produktion reifer infektiöser Viren ausbreiten können (Cubitt und de la Torre, 1994).

Das BDV zeigt eine geringe Speziesbarriere (Binz et al., 1994) und selbst humanes BDV zeigt einen hohen Grad an Sequenzkonservierung gegenüber isoliertem BDV von natürlich infizierten Tieren verschiedener Spezies (de la Torre et al., 1996a; Sauder et al., 1996).

3.1.3 Wirtsspektrum

Natürliche Wirte des BDV sind Pferde und Schafe (Joest und Degen, 1911; Zwick, 1939; Heinig, 1969). Neuere Untersuchungen erbrachten Hinweise, daß auch Esel (Altmann et al., 1976; Bilzer et al., 1995), Hunde (Weissenbock et al., 1998), Katzen (Lundgren und Ludwig, 1993; Lundgren et al., 1995a, b; Nakamura et al., 1996), Kaninchen (Otta und Jentsch, 1960; Metzler et al., 1978), Strauße (Malkinson et al., 1993; Ashash et al., 1996; Wormser et al., 1996) und Rinder (Caplazi et al., 1994; Bode et al., 1994) zu den natürlichen Wirten dieser Infektionskrankheit zählen.

Durch intracerebrale oder intranasale Infektion konnte das BDV experimentell auf eine Vielzahl von Spezies übertragen werden, die von Hühnern (Zwick et al., 1927; Ludwig et al., 1973) über Mäuse (Kao et al., 1984; Schilken, 1990; Rubin et al., 1993), Ratten (Zwick et al., 1927; Nitzschke, 1963; Narayan et al., 1983a, b; Kao et al., 1983), Hamster (Anzil et al., 1973), Meerschweinchen (Zwick und Seifried, 1925), Kaninchen (Zwick und Seifried, 1925; Krey et al., 1979a, b) und Spitzhörnchen (Sprankel et al., 1978) bis zu Rhesusaffen (Zwick et al., 1939; Stitz et al., 1980) reicht.

Bei allen Tierarten kommt es zu einer persistierenden BDV-Infektion; der Krankheitsverlauf ist bei den verschiedenen Tieren jedoch unterschiedlich. Pferde, Ratten, Kaninchen und Rhesusaffen zeigen schwerste klinische und neuropathologische Befunde (Narayan et al., 1983a, b; Ludwig et al., 1985, 1988; Stitz et al., 1980), während Mäuse und Hühner nur selten eindeutige klinische Symptome erkennen lassen (Kao et al., 1984; Ludwig et al., 1985; Rubin et al., 1993).

Die Ratte ist das experimentell am besten untersuchte Tier, deren experimentelle BDV-Infektion aufgrund ähnlicher Krankheitssymptomatik zum Pferd als Modell für die natürliche Infektion angesehen werden kann (Bilzer et al., 1995).

Viele Arbeitsgruppen diskutierten die Frage, ob BDV auf den Menschen übertragbar sei. Schon 1985 fanden Amsterdam et al. und Rott et al. spezifische Antikörper gegen das BDV im Serum psychisch auffälliger Patienten, während diese bei gesunden Patienten fehlten. Entsprechende Untersuchungsergebnisse wurden später auch von anderen Gruppen berichtet, wie Bechter et al. (1988, 1992), VandeWoude et al. (1990), Rott et al. (1991), Bode et al. (1992) und Fu et al. (1993a). Unterstützt werden diese Vermutungen durch den Nachweis von BDV oder einem verwandten Agens nach Inokulation von Liquor cerebrospinalis seropositiver Patienten in Kaninchen oder embryonalen Kaninchen-Hirnzellkulturen (Rott et al., 1991).

Im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen fanden Bode et al. (1993) durch Follow-up-Studien an 70 psychisch kranken Patienten mit 20 % seropositiven Patienten eine wesentlich höhere Prävalenz, wobei der Anteil von der Art der psychischen Erkrankung

abhängt: bei endogenen Depressionen sind 30 % seropositiv, bei neurotisch Depressiven nur 8 %. Dies führte zu der Annahme, daß die Infektion mit dem BDV beim Menschen zu depressiven Krankheitssymptomen durch Veränderung von Neuronen im limbischen System mit beiträgt (Bode et al., 1993). Als möglicherweise durch BDV verursachte menschliche Erkrankungen werden zunächst affektive Psychosen vermutet (Bechter et al., 1994). Von Bechter et al. wurde eine ätiologische oder pathogenetische (Mit)Beteiligung von BDV bei einem diagnostisch breiten Spektrum psychiatrischer Krankheiten angenommen, da sie gehäuft schizophrene und affektive Psychosen wie auch bestimmte Persönlichkeitsstörungen bei BDV-Seropositiven fanden (Bechter et al., 1994). Neuere, erheblich erweiterte kernspintomographische Untersuchungen bestätigen das gehäufte Vorkommen diskreter Hirnatrophien bei BDV-Seropositiven (Bechter et al., 1994). Beim Krankheitsbild der Schizophrenie scheint das BDV mit dem Negativ-Syndrom assoziiert zu sein (Waltrip et al., 1997; Iwahashi et al., 1998). Es gibt jedoch auch eine Studie, in der die Verteilung der psychiatrischen Erkrankungen bei BDV-seropositiven und –negativen Patienten ähnlich ist, wonach keine der Erkrankungen enger mit einer BDV-Infektion assoziiert wäre (Herzog et al., 1997; Richt et al., 1997). Diskutiert wird auch eine Co-Faktor-Rolle des BDV für eine Reihe von Verhaltensstörungen (Dietrich et al., 1998).

Japanische Studien stellten einen möglichen Zusammenhang zwischen BDV und dem CFS (chronic fatigue syndrome) japanischer Patienten dar, wobei eine alleinige ätiologische Rolle unwahrscheinlich ist (Kitani et al., 1996; Nakaya et al., 1996, 1997).

Bode et al. präsentierten 1994 Untersuchungen über die Entdeckung von BDV-Antigenen in peripheren Blutmonozyten (PBMC) psychiatrischer Patienten. Bei allen untersuchten Gruppen lag der durchschnittliche Anteil der Antigenträger bei 40-50 % und war damit beträchtlich höher als die durchschnittliche Prävalenz der Antikörperträger (20 %). Positive Monozyten wurden auch bei natürlich und experimentell infizierten Tieren gefunden (Bode et al., 1994).

BDV-RNA in PBMC's psychiatrischer Patienten wurde in der Folge noch im Rahmen einer Reihe weiterer Untersuchungen gefunden (Kishi et al., 1995a; Bode et al., 1995; Nakaya et al., 1996; Sauder et al., 1996; de la Torre et al., 1996a); auch bei gesunden Menschen wurde in ca. 5 % der Fälle BDV-RNA in PBMC-Proben gefunden, was eine

weiter verbreitete humane BDV-Infektion als vorher angenommen bedeuten könnte (Kishi et al., 1995b).

In einer neueren Untersuchung ist die Entdeckung von BDV-spezifischen Nukleinsäuren in und die Isolierung von BDV von humanen Granulozytenfraktionen verschiedener BDV-seronegativer, psychiatrischer Patienten gelungen. Es gibt gewichtige Gründe für die Feststellung, daß die Zellen in der Granulozytenfraktion im Gegensatz zu den älteren Untersuchungen der Haupt-, wenn nicht der einzige Zelltyp ist, der BDV-spezifische Nukleinsäuren in humanem Blut beinhaltet und infektiöses Virus enthält (Planz et al., 1999).

In einer Untersuchung autopsierter Gehirnproben neuropsychiatrischer Patienten wurde in vier von fünf Fällen mit Sklerose und Astrozytose im Hippocampus - histopathologische Kennzeichen einer BDV-Infektion bei Tieren - sowohl BDV-Antigen als auch - RNA erstmals gefunden; diese Patienten hatten eine Anamnese mit Geistesstörungen, einschließlich Gedächtnisschwund und Depressionen (de la Torre et al., 1996b). Bestätigung fanden diese Ergebnisse durch Nachweis von BDV-RNA in einer von vier autopsierten Gehirnproben schizophrener Patienten und der Isolierung des Virus (Nakamura, 1998). Interessanterweise wurde BDV-p24-Genom auch in zwei von dreißig normalen autopsierten Gehirnen nachgewiesen, was zu der Schlußfolgerung führte, daß das BDV latent humanes Gehirngewebe infizieren kann, ohne offensichtliche neuropsychiatrische Erkrankungen hervorzurufen (Haga et al., 1997).

3.1.4 Epidemiologie

Die BD wurde ursprünglich als eine im ost-, süddeutschen und schweizerischen Raum endemisch vorkommende Krankheit beschrieben. Seroepidemiologische Studien ergaben jedoch eine bisher nicht angenommene Verbreitung des Virus.

So finden sich seropositive Pferde in ganz Deutschland, den Niederlanden und in anderen Ländern Europas (Lange et al., 1987). In einer neueren Untersuchung zeigten schwedische Rennpferde, sowohl klinisch gesunde als auch solche mit diffusen neurologischen Symptomen, eine BDV-Seroprevalenz; BDV-RNA konnte in den PBMC nachgewiesen werden, wobei die Mehrheit der positiv getesteten Tiere zu der Gruppe mit neurologischer Klinik gehörte (Berg et al., 1999). Kao et al. entdeckten BDV-spezifische Antikörper auch im Serum und Liquor cerebrospinalis von Pferden aus den

USA (1993). Im Gegensatz zu Pferden aus den Hauptendemiegebieten waren diese allerdings entweder klinisch gesund oder von einer nicht borna-ähnlichen Erkrankung betroffen. Bestätigt wird dies durch den Nachweis von BDV-RNA in PBMC's gesunder Pferde in Japan (Nakamura et al., 1995). Deshalb wird die Vermutung geäußert, daß die BD in einer subklinischen Form mit einer sehr langen Inkubationszeit weit verbreitet sei (Kao et al., 1993) und nur bei einem Teil der Virusträger die Erkrankung nach lange zurückliegender Inkubation ausbricht (Nakamura et al., 1995). Ebenso seropositive Ergebnisse ergaben Untersuchungen von Pferde- und Eselseren aus Indien, Afrika und Israel (Stitz, Rott, unveröffentlicht, zitiert nach Planz, 1993).

3.1.5 Klinik

Die Inkubationszeit beim Pferd wird mit vier Wochen bis zu drei Monaten angegeben. Jedoch scheinen klinisch inapparente Formen zu existieren, bei denen die Pferde möglicherweise jahrelang infiziert sind, bevor sie klinisch erkranken (Ludwig et al., 1985). Neben asymptomatischen Infektionen scheinen atypische, chronische Verlaufsformen mit diffusen mentalen sowie Gangart und Haltung betreffende Störungen weiter verbreitet zu sein als bisher angenommen (Bode und Ludwig, 1997; Hagiwara et al., 1997b; Berg et al., 1999).

Zu Beginn der Erkrankung treten Temperaturerhöhungen (Schmidt, 1912) und Störungen bei der Futteraufnahme mit „Pfeifenrauchen“ (Eikmeier, 1965), dem Herausragen von Futterteilen rechts und links aus dem Maul in Kaupausen, auf. Bei Schlingbeschwerden kommt die Nahrungsaufnahme völlig zum Erliegen (Schmidt, 1912). Somnolente Zustände gefolgt von plötzlichen Exzitationen mit besonderer Schreckhaftigkeit werden beobachtet (Schmidt, 1912; Eikmeier, 1965). Oft besteht eine Hyperästhesie in den Kopf-, Hals- und Widerristregionen gegenüber Hypästhesien und Hyporeflexien an den übrigen Körperoberflächen. Harnverhaltung (Ludwig et al., 1985), Defäkationsstörungen, leichte Obstipationen und auch deutliche Koliksymptome treten nicht selten auf. Kleingeballter, übelriechender Kot und Durchfall (Schmidt, 1912) weisen auf eine Beeinträchtigung des Vegetativums und damit der Motorik des Darms und der Harnblase hin. Im weiteren Krankheitsverlauf treten zentralnervöse Störungen immer deutlicher zu Tage. Die Tiere brechen aufgrund zunehmender Koordinations-

schwierigkeiten ein. Andere Pferde ohne erkennbare Ataxien stehen teilnahmslos da, oder es kommt zu Zwangsbewegungen. Zu beobachten sind nicht selten unphysiologische Gliedmaßenstellungen und Körperhaltungen, wie breitbeiniges Stehen über Stunden, Kopfschiefhaltung und minutenlanges Einknicken in der Vorderhand. Werden bei der Untersuchung Gliedmaßen überkreuz gestellt, kann diese unphysiologische Haltung nicht korrigiert werden. Ferner kommen Hyperkinesen, ständiger Muskelzittern, Beißen in das Futter und Zungenspiel vor (Ludwig et al., 1985). Neben Trismus und Opisthotonus beschreibt Schmidt (1912) besondere ophthalmologische Befunde, wie Nystagmus, sehr häufig Augenschiefstellung, Anomalien der Pupille sowie Blindheit und Veränderungen an der Papilla fasciculi optici.

Bei Schafen kommt es nach einer angenommenen Inkubationszeit von mindestens vier Wochen bis zu mehreren Monaten meistens zur Störung des Sensoriums, geprägt von Teilnahmslosigkeit und Sopor. Auch hier werden Zwangsbewegungen beobachtet, wobei Manegebewegungen bis zum Niederstürzen vorkommen. Eine zunehmende Bewußtseinstrübung prägt den weiteren Verlauf; es treten Gleichgewichtsstörungen, „Pfeifenrauchen“, Störungen des Schluckreflexes mit nachfolgendem Regurgitieren, ab und an Trismus und Salivation auf.

Bei beiden Spezies tritt der Tod in den meisten Fällen nach ein bis drei Wochen ein (Ludwig et al., 1985). In vielen Fällen müssen die Tiere aus tierschützerischen Gründen getötet werden, so daß der natürliche Krankheitsverlauf nicht weiter beobachtet werden kann.

Auch beim Schaf scheint es eine hohe Prävalenz von BDV-Infektionen unter gesunden Tieren zu geben (Hagiwara et al., 1997a).

Bei der Ratte ähneln die klinischen Symptome nach experimenteller Infektion denen bei natürlicher Infektion; die Erkrankung erscheint lediglich weniger stark ausgeprägt. Koordinationsstörungen, depressive Verhaltensmuster, Zwangsbewegungen, Gleichgewichtsstörungen und Lähmungen der Hinterextremitäten sind zu beobachten.

Die infizierten Ratten verhalten sich zunächst munter und furchtlos, zeichnen sich durch Hyperaktivität und Aggressivität aus und sind sehr gefräßig. Zum späteren Zeit-

punkt tritt eine Apathie und Somnolenz auf, die Fellpflege setzt aus. Nur wenige Tiere verenden (Nitzschke, 1963; Heinig, 1969; Narayan et al., 1983 a, b ; Kompter, 1987).

Im Gegensatz zu den in der Regel abgemagerten Artgenossen entwickeln manche Ratten eine Fettsucht, d.h. ein Obesitas-Syndrom, mit ausbleibender Borna-Symptomatik. Diese überleben immer und erreichen das dreifache Gewicht gesunder gleichaltriger und das sechsfache Gewicht klinisch typisch kranker Tiere. Es ist offen, ob eine Beeinflussung des neuroendokrinen Systems mit der Auslösung der Fettsucht in Zusammenhang steht, da u.a. Sexualitäts- und Fertilitätsstörungen beobachtet werden und bei älteren Weibchen in der Regel eine Pyometra auftritt (Kao; 1985).

3.1.6 Infektion

Es gibt eine allgemeine Übereinstimmung, daß das Virus über Speichel und Nasensekrete übertragen wird. Die Tiere werden entweder über direkten Kontakt mit Sekreten oder durch kontaminiertes Futter oder Wasser infiziert. Es ist wahrscheinlich, daß die Nase die Haupteintrittspforte des Virus in den Körper darstellt. Kolostrum und Milch stehen im Verdacht, eine Rolle in der Infektion von Fohlen zu spielen. Kontaktexperimente zeigten, daß Pferde ohne klinische Erkrankung (Virussträger) eine Infektionsquelle sein könnten (Heinig, 1969; Übersicht bei Rott und Becht, 1995). Die Tatsache, daß BDV-spezifische Proteine und Nukleinsäuren im Ganglion Gasseri und N. trigeminus bei allen Pferden einer Untersuchungsreihe und im größeren Ausmaß als im olfaktorischen System nachweisbar waren, könnte bedeuten, daß der Trigeminnerv eine zusätzliche natürliche Infektionsroute darstellt. Mikroläsionen in der oralen und nasopharyngealen Schleimhaut könnten den Eintritt des Virus und den Zugang zum Gehirn über das trigeminale System erlauben (Bilzer et al., 1995).

Die experimentelle Infektion erfolgt am erfolgreichsten intracerebral (i.c., Einführen einer Kanüle durch die Schädeldecke in eine Hemisphäre) oder intranasal (i.n). Eine natürlich vorkommende intranasale Infektion säugender Ratten erfolgt durch Virus, welches von intracerebral infizierten neugeborenen Ratten über Körpersekrete ausgeschieden wird. Dabei konnten die Geruchsrezeptoren der Nasenschleimhaut durch immunhistologische Untersuchungen als Eintrittspforte nachgewiesen werden (Morales et al., 1988). Die weitere Virusausbreitung erfolgt intraaxonal von Neuron zu Neuron

(Carbone et al., 1987; Morales et al., 1988). Bestätigt wird dies durch erfolglose Infektionsversuche durch Injektion des Virus intravenös oder in die Pfoten neurektomierter Ratten (Carbone et al., 1987).

Es kommt zu einer stetigen Ausbreitung des Virus, bis alle Anteile des ZNS sowie die Arachnoidea durchsetzt sind. Die weitere Virusdissemination erfolgt auf neurogenem, axonalen Wege vom ZNS in periphere Körperregionen oder über den N. opticus in die Retina (Krey et al., 1979b; Bilzer, persönliche Mitteilung). Betroffen sind Nervenzellen sowie Astrozyten und einzelne Oligodendrozyten, nicht jedoch Mikroglia- und Endothelzellen. Im weiteren Verlauf ist Virusantigen sowohl im PNS (große und kleine Nerven von Vorder- und Hinterextremitäten) als auch im autonomen Nervensystem (Darm, Niere Urogenitaltrakt, Lunge, Herz, teils kleinste Nerven) und in Muskelspindeln nachweisbar. Eine Infektion extraneuraler Gewebe ist bei immunkompetenten Tieren lediglich in den proximalen Tubulusepithelien der Niere und - im späteren chronischen Stadium - in glatten Muskelzellen des Darms zu finden, während bei neugeborenen BDV-infizierten und CSA-immunsupprimierten Tieren Virusantigen in einer Reihe von Geweben (Parenchymzellen von Niere, Leber, Darm, Herz, Lunge etc.; Haut und andere Epithelien; Herzmuskelzellen) nachgewiesen werden kann (Stitz et al., 1998). Werden diese Tiere direkt nach Infektion beginnend mit BDV-spezifischen neutralisierenden Antikörpern behandelt, so bleibt die Infektion auf das Zentralnervensystem beschränkt (Stitz et al., 1998).

Weitere Untersuchungen belegen eine BDV-Infektion der PBMC, des Knochenmarks (Sierra-Honigmann et al., 1993; Carbone et al., 1991a) und des Thymus, wobei die BDV-infizierten Zellen des Knochenmarks und Thymusgewebes in in-vitro-Untersuchungen als fibroblastische Stromazellen identifiziert worden sind (Rubin et al., 1995). In der chronischen Phase der BD konnte BDV-RNA noch in Cerebro-spinalflüssigkeit, Nasensekret und Stuhl, bei neugeborenen infizierten auch in Urin identifiziert werden (Sierra-Honigmann et al., 1993).

Der Weg über die Nahrungskette wird als weiterer Infektionsweg vermutet. So scheinen v.a. auf dem Land lebende, unkastrierte – d.h. aktivere – Katzen über virusinfizierte Nager als Beutetier infiziert zu werden. Die direkte Übertragung zwischen Katzen scheint dagegen unwahrscheinlich (Berg et al., 1998a).

Eine weitere Übertragung des BDV über Speziesgrenzen hinweg könnte es zwischen Mensch und Pferd geben, da eine signifikant höhere Seroprevalenz bei Menschen feststellbar war, in deren Wohnumgebung viele Pferdeställe lagen (Takahashi et al., 1997). Aber auch eine Infektion von Mensch zu Mensch scheint nicht unwahrscheinlich, da Menschen in der direkten Umgebung von Schizophreniepatienten eine ebenfalls höhere Seroprevalenz BDV-spezifischer Antikörper aufwiesen (Chen et al., 1999).

3.1.7 Neuropathologie

Das makroskopische Bild der akuten BD ist unspezifisch und wenig auffällig. Bei natürlich infizierten Pferden beobachtet man in Einzelfällen ein Hirnödem und eine leichte Hyperämie der Meningen, seltener petechiale Parenchymlutungen und kleine hämorrhagische Nekrosen (Ludwig et al., 1985). Ähnlich BDV-infizierten immunkompetenten Ratten zeigen infizierte Pferde eine schwere Meningoenzephalitis mit deutlicher Pathologie im limbischen System und im cerebralen Kortex (Gosztanyi und Ludwig, 1984). Man findet histologisch eine lymphozytäre Entzündungsreaktion mit erhöhter Expression der MHC-Klasse I und Klasse II Antigene im Gehirn wie im trigeminalen und olfaktorischen System. CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen sowie Makrophagen/Mikroglia sind an der Enzephalitis beteiligt, wobei die perivaskulären Infiltrate von den CD4⁺ T-Zellen dominiert werden, während die Mehrheit der CD8⁺ T-Zellen intraparenchymal verteilt ist. Trotz nachgewiesener hoher Konzentrationen an BDV-spezifischen Nukleinsäuren und Antigen in der Retina sind dort keine Anzeichen einer Entzündung erkennbar (Bilzer et al., 1995). Vergleichbare Ergebnisse lieferten spätere Untersuchungen sowohl bei Pferden als auch an Schafen (Caplazi und Ehrensperger; 1998).

Experimentell infizierte Ratten mit fortgeschrittener BD zeigen schon makroskopisch sichtbar eine deutliche Hirnatrophie mit dramatischem Substanzverlust und schwerem Hydrocephalus internus e vacuo (Narayan et al., 1983a, b; Bilzer und Stitz, 1993, 1994; Planz et al., 1993).

Der Charakter der immunpathologischen Reaktionen im Gehirn experimentell infizierter Lewis-Ratten ähnelt derjenigen bei natürlich infizierten Pferden (Bilzer et al., 1995). Es kommt zu einer schweren mononukleären Meningoenzephalitis, die besonders durch perivaskuläre, aber auch durch parenchymale Infiltrate gekennzeichnet ist: zwischen Tag 14 und 21 p.i. entwickelt sich eine massive, mit progressiven Zellnekrosen einhergehende lymphozelluläre Reaktion, deren Höhepunkt im Verlauf der vierten Woche p.i. erreicht wird. Neuronen und Astrozyten des cerebralen Kortex und Teile des limbischen Systems einschließlich Gyrus cinguli und Hippocampusformation sind am stärksten von der BDV-Infektion betroffen. Bei der immunhistologischen Untersuchung perivaskulärer Infiltrate finden sich CD4+ T-Zellen zu mehr als 40 %, CD8+ T-Zellen zu beinahe 20 %, und ca. 30 % der Zellen reagieren mit den makrophagen-spezifischen monoklonalen Antikörpern ED1 und ED3. Im Hirnparenchym dominieren CD8+ T-Zellen; ED1/ED3-positive Makrophagen sind jedoch auch präsent. MHC-Klasse I Antigen wird offensichtlich von Entzündungszellen und Gehirnzellen - Neuronen und Astrozyten - ausgedehnt in der grauen Substanz exprimiert, während MHC-Klasse II Antigen auf den meisten Entzündungszellen und Astrozyten, nicht aber auf Neuronen gefunden wird. B-Lymphozyten sind zunächst nur verhältnismäßig gering präsent, machen jedoch 38 Tage p.i. ca. 20 % aller lymphozytären Zellen aus. Einhergehend mit der Entzündungsreaktion kommt es zu astrozytären Ödemen und neuronalen Nekrobiosen insbesondere der Pyramidenzellschichten des Neocortex und des Hippocampus. Es können Neuronophagie und reaktive Gliose einschließlich einer Proliferation der Mikroglia beobachtet werden. Nach einem Zeitraum von mehr als zwei bis drei Monaten kommt es zu einer Reduktion der entzündlichen Erscheinungen, bis schließlich jegliche Entzündungsreaktion verschwunden ist. In der postenzephalitischen Phase offenbaren die Tiere eine extrem reduzierte Gehirns substanz mit einem außerordentlichen Grad eines Hydrocephalus internus ex vacuo (Stitz et al., 1991; Bilzer und Stitz, 1993, 1994; Deschl et al., 1990; Schwerdtfeger, 1994).

Im Auge experimentell infizierter Ratten beschränken sich die pathologischen Veränderungen fast ausschließlich auf die Retina. Etwas zeitversetzt zur immunpathologischen Reaktion im Gehirn setzt auch im Auge eine Entzündungsreaktion ein, die sich in einer diffusen und perivaskulären mononukleären Infiltration der gesamten Retina äußert

(Narayan et al., 1983a, b; Geiß, 1988; eigene Untersuchungen). Hierbei ist ein hoher Prozentsatz CD8+ T-Zellen nachweisbar (Bilzer, persönliche Mitteilung). Beginnend mit degenerativen Veränderungen der Photorezeptoren-, äußeren plexiformen und äußeren Körnerschicht zur Zeit der Entzündungsreaktion kommt es innerhalb von drei bis vier Monaten zu einer völligen Atrophie aller Schichten der Neuroretina (Bilzer, unveröffentlichte Untersuchungen; eigene Untersuchungen).

3.1.8 Pathogenese

Das BDV repliziert in vivo bevorzugt in Zellen neuralen Ursprungs wie Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen ohne offensichtliche Anzeichen einer Zytotoxizität (Narayan et al., 1983a, b; Carbone et al., 1989, 1991, 1993; Deschl et al., 1990). In-vitro-Untersuchungen haben gezeigt, daß das Virus streng zellgebunden und auch in Zellkulturen scheinbar nicht zytotoxisch ist (Herzog und Rott, 1980).

Bei der experimentellen BD der Ratte handelt es sich um eine virusinduzierte immunpathologische Erkrankung, in der T-Zellen, aber auch Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems und Immuneffektormoleküle (Tumornekrosefaktor, TNF; reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen) eine Rolle spielen.

Die Entwicklung der Enzephalitis ist eng gekoppelt an die Immunkompetenz des Wirts. So treten bei verschiedenen Ratten- und Mäusestämmen ebenso wie bei immunkompromittierten Ratten keine wesentlichen Entzündungsreaktionen auf. Die ersten Experimente, die die Bedeutung der Immunreaktion für die Pathogenese der BD darstellten, waren Untersuchungen an Rhesusaffen, die nach einer vorgenommenen Splenektomie vor BDV-Infektion ein anderes klinisches und histopathologisches Bild zeigten als normale BDV-infizierte Affen (Stitz et al., 1980). Letztere entwickelten eine schwere Erkrankung mit neurologischen Symptomen wie Paresen, Paralyse und - in der späteren chronischen Phase - sich steigender Apathie, histopathologisch begleitet von einer deutlichen lymphohistiomonozytären Enzephalitis und Retinitis (Stitz et al., 1980; Krey et al., 1982). Dagegen waren die neurologischen Symptome der splenecto-

mierten Affen weniger stark ausgeprägt. Sie zeigten keine Paralyse und weniger zelluläre Infiltrate im Gehirn, in der Choroidea und der Retina (Stitz et al., 1980; Cervos-Navarro et al., 1981). In-vitro-Untersuchungen mit isolierten Lymphozyten solcher splenektomierter Tiere ergaben eine geringere Zytotoxizitätsaktivität, woraus geschlossen wurde, daß die zellvermittelte Immunantwort für die BD wichtig ist (Stitz et al., 1980).

In einer späteren Studie wurde gezeigt, daß nach Immunsuppression BDV-infizierter Ratten mit Cyclophosphamid keine Enzephalitis und keine klinische Erkrankung auftraten, obwohl eine immunkompetenten Tieren vergleichbare persistente Virusreplikation zu verzeichnen war. In der Folge kam es trotz Viruspersistenz zu keiner Degeneration der Retina, während im Gehirn lediglich Neuronen des Gyrus dentatus degenerierten (Narayan et al., 1983b). Dies und weitere pathologische Veränderungen wie ein hypoplastisches und disorganisiertes Kleinhirn wurden auch bei neugeborenen BDV-infizierten Ratten gefunden, die ein noch unvollständig funktionierendes Immunsystem haben und daher auch keine Entzündungsreaktionen aufweisen (Narayan et al., 1983a, b; Carbone et al., 1991a, b; Hirano et al., 1983; Herzog et al., 1984). Der langsam fortschreitende Verlust bestimmter Neurone (bes. im Gyrus dentatus) bei immuninkompetenten Tieren wurde mit der Möglichkeit einer direkten viralen Lyse der Zellen erklärt (Narayan et al., 1983b; Carbone et al., 1991a), obwohl in-vitro-Untersuchungen keine zytolytische Aktivität hatten nachweisen können (Herzog und Rott, 1980).

Die Bedeutung der Immunantwort für die Pathogenese wurde durch eine Reihe weiterer Versuchsergebnisse bestätigt:

1. Durch Transfer von Milzzellen immunkompetenter, BDV-infizierter Ratten in Cyclophosphamid-behandelte, infizierte Tiere konnte das typische Bild der BD ausgelöst werden (Narayan et al., 1983a).
2. Das die CSA-Behandlung von adult BDV-infizierten Ratten mit suboptimalen Dosen zu einer Entwicklung von Enzephalitis ohne Produktion anti-BDV-spezifischer Antikörper führt, dagegen jedoch die i.v. Gabe von BDV bei CSA-behandelten Ratten eine B-Zell-Antwort bei ausbleibender immunpathologischer Erkrankung induziert, lässt eine Beteiligung antiviraler Antikörper an der Pathogenese unwahrscheinlich erscheinen (Stitz et al., 1989). Die erst zu einem recht späten Zeitpunkt der Erkran-

kung – 10 bis 15 Wochen p.i. - nachweisbaren, gegen die beiden Glykoproteine M und G gerichteten neutralisierenden Antikörper sind bezüglich ihrer Relevanz bei der BDV-Infektion nur schwer einzuordnen. Sie haben aber zumindest eine funktionelle Bedeutung, da eine passive Immunisierung immuninkompetenter Ratten – neugeborenen infizierte oder adult infizierte, CSA-behandelte Tiere – zwar nicht die persistente Infektion des ZNS verhindern konnte, jedoch die weitere Ausbreitung in die nicht-neuralen Gewebe (Stitz et al., 1998). Eine Aktivierung der humoralen Immunantwort in der späteren chronischen Phase der Erkrankung scheint mit dem Nachweis von Interleukin-4, welches von CD4⁺ Th2 sezerniert wird, in kausalem Zusammenhang zu stehen (Hatalski et al., 1998).

3. Eine Infektion athymischer Nacktratten (T-Zell-depletierte Tiere) führt trotz hohen Virustiters weder zu klinischen Erscheinungen noch zu Enzephalitiden oder Retinitiden (Herzog et al., 1985).
4. Aus Lymphknoten von Ratten, die mit dem Nukleoprotein N (p40; 38/39 kDa-Protein) des BDV immunisiert worden sind, kann eine homogene Immunzelllinie des Helfer/Inducer (CD4⁺)-Typs isoliert werden, deren Transfer in infizierte immunsupprimierte, syngene Ratten eine schwere Erkrankung mit eintretendem Tod innerhalb von fünf Tagen auslöst (Richt, 1988; Richt et al., 1989, 1990). Der Grund für den außerordentlich schweren Verlauf der BD mit schnellem Exitus könnte jedoch ein in-vitro-Artefakt mit der Folge einer zytotoxischen Aktivität sein (Bilzer und Stitz, 1996), da CD4⁺ T-Zellen diese Eigenschaft während einer in-vitro-Kultivierung annehmen können (Fleischer, 1984; Cash et al., 1994).
5. Durch eine Reihe von Untersuchungen konnte die zentrale Rolle von CD8⁺ T-Zellen für die Immunpathogenese der BD gezeigt werden:
 - A. Durch Behandlung infizierter Tiere mit transforming growth factor β (TGF β), einem Zytokin, das hemmend auf Wachstum und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten wirkt, werden vorübergehend Entzündungsreaktion, MHC-Klasse II Expression und Serumtiter Borna-spezifischer Antikörper reduziert, nicht jedoch die Expression von MHC-Klasse I Molekülen. dabei ist die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen leicht reduziert bzw. gleichbleibend, während CD8⁺ T-Zellen in der frühen Phase nach der Infektion praktisch abwesend sind. das Erscheinen der CD8⁺ T-Zellen spät nach der Infektion korreliert zeitlich

direkt mit dem Auftreten und der Schwere der klinischen Symptome (Stitz et al., 1991b).

- B. Monoklonale Antikörper gegen alle T-Zellen oder gegen CD8⁺ T-Zellen können die lokale Entzündungsreaktion stark einschränken oder sogar verhindern, wenn sie früh nach Infektion thymektomierten Ratten verabreicht werden. CD4-Antigen-spezifische monoklonale Antikörper sind weniger effektiv und müssen in höherer Dosis und über einen längeren Zeitraum gegeben werden, um eine positive Wirkung zu erreichen (Stitz et al., 1992). Behandlung mit Anti-CD8-Antikörpern führt zu einer verringerten MHC-Klasse I Expression und verhindert neuronale Degeneration mit Verlust an Hirnsubstanz (Bilzer und Stitz, 1994), während bei Ratten, die mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4⁺ T-Zellen behandelt worden sind, ein signifikanter Substanzverlust des Gehirns sichtbar wird (Planz et al., 1993).
- C. In-vitro-Untersuchungen zeigen eine MHC-Klasse I restringierte zytotoxische Aktivität isolierter CD8⁺ T-Zellen, deren lytische Eigenschaft durch Antikörper, die gegen das MHC-Klasse I Antigen der Zielzellen gerichtet sind, unterbunden werden kann. In-vivo findet man die CD8⁺ T-Zellen in direkter nachbarschaftlicher Beziehung degenerierender Neuronen im Parenchym (Planz et al., 1993).
- D. Adoptiver Transfer einer T-Zelllinie mit T-Helferzell-Eigenschaften, Spezifität für das Phosphoprotein P (p24) und fehlender zytotoxischer Aktivität endet in einer neurologischen Erkrankung, vergleichbar der BD, wobei immunhistologisch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden können. CD8⁺ T-Zell-depletierte Rezipienten entwickeln dagegen weder Enzephalitis noch eine Erkrankung (Planz et al., 1995).
- E. Lymphozyten wurden während der akuten Phase der Erkrankung direkt aus dem Gehirn BDV-infizierter Ratten isoliert und ohne weitere Kultivierung adoptiv transferiert; in den transferierten Zellen konnte eine erhebliche MHC-Klasse I restringierte zytotoxische Aktivität festgestellt werden, wobei die durchflußzytometrische Analyse der Gehirnlymphozyten einen stark erhöhten Anteil von CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ T-Zellen ergab. Bei den Rezipienten wurden pathologische Veränderungen induziert, die exakt denjenigen entsprechen, die man bei experimentell induzierter BD beobachtet; bei letzteren

konnte man BDV mRNA nach elf Tagen p.i. und Perforin mRNA zwischen Tag 13 und 25 p.i. nachweisen (Sobbe et al., 1997).

- F. Transfer einer nachgewiesenen nicht zytotoxischen CD4⁺ T-Zelllinie vor Infektion führt zu einer vorübergehenden nur sehr schwach ausgeprägten Enzephalitis mit weitestgehender klinischer Symptomlosigkeit. Dies korreliert mit einer früher als bei adult BDV-infizierten Kontrolltieren einsetzenden Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen mit MHC-Klasse I restringierter zytotoxischer Aktivität, und mit dem Nachweis von mRNA des Perforin, das als entscheidendes Effektormolekül bei der Zytolyse durch CD8⁺ T-Zellen gilt; dies führte zu einer vollständigen Eliminierung des BDV vom ZNS (Nöske et al., 1998).
6. Im Gehirn BDV-infizierter Ratten sind während der akuten Entzündungsreaktion verschiedene Zytokine (TNF- α , Interleukin [IL]-1, -2, -4, -6, -10, Interferon [IFN]- γ , TGF β) nachweisbar; bis auf IL-4 erreicht die Expression dieser Zytokine zum Zeitpunkt der stärksten Immunreaktion einen Höhepunkt und fällt später – ausgenommen TGF β - in der chronischen Phase der BD wieder deutlich ab (Hatalski et al., 1998). Diese haben nicht nur eine immun- und entzündungsmodulierende Funktion, sondern können auch eine zytotoxische Aktivität ausüben (Shankar et al., 1992; Schwerdtfeger 1994, Bilzer und Stitz; 1996). Zytokine können in Entzündungszellen und besonders Mikrogliazellen lokalisiert werden (Schwerdtfeger 1994).
 7. mRNA für induzierbare Stickstoffoxidsynthase (iNOS) ist während der BD hochreguliert (Koprowski et al., 1993). Ebenso ist eine hohe Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD) als Indikator freier Sauerstoffradikale nachweisbar (Schwerdtfeger, 1994). Es wird vermutet, daß manche Zytokine eine NO-Produktion durch infiltrierende Makrophagen triggern (Nathan, 1992). Blutmakrophagen scheinen jedoch eine geringere Rolle zu spielen, während intraparenchymal eine starke Mikroglia proliferation und -aktivierung auffällt (Schwerdtfeger, 1994).
 8. BDV-spezifische CD4⁺ T-Zelllinien zeigten in der Durchflußzytometrie eine Oberflächenexpression des Adhäsionsmoleküles alpha4 Integrin (VLA-4), das über die Bindung an das Rezeptormolekül VCAM-1 auf endothelialen Zellen den Übertritt von aktivierten T-Zellen in das Gehirn ermöglicht (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991; Baron et al., 1993; Planz et al., 1995). In-vivo-Behandlung BDV-infizierter

Ratten mit einem monoclonalen Anti-alpha4-Integrin-Antikörper ergaben eine erheblich reduzierte Infiltration von Entzündungszellen im ZNS bei ausbleibender klinischer Symptomatik (Rubin et al., 1998).

9. Durchflußzytometrische Untersuchungen deuten darauf hin, daß Astrozyten von BDV-infizierten Ratten MHC-Klasse II exprimieren und daher eine potentielle Rolle in der Immunantwort nach BDV-Infektion spielen könnten (Rubin et al., 1997).

Die BD der Ratte stellt ein Modell dar, in dem durch CD8+ T-Zellen als Effektorzellen eine immunpathologische Reaktion ausgelöst wird, bei der auch CD4+ T-Zellen als Helferzellen und Makrophagen/Mikrogliazellen eine wichtige Rolle spielen. Die zytotoxischen Vorgänge werden im wesentlichen von der Aktivität zytotoxischer MHC-Klasse I restringierter CD8+ T-Zellen getragen, wobei Perforin als entscheidendes Effektormolekül bei der Zytolyse gilt (Bilzer und Stitz; 1994; Stitz et al., 1995; Sobbe et al., 1997).

4 Material und Methoden

4.1 Verbrauchsmaterial

ASTA Medica AG (Frankfurt/M.):	Endoxan [®] (Cyclophosphamid)
Camon (Wiesbaden):	Kaninchennormalserum, Pferdennormalserum
Genzyme (Mass., USA):	mAK anti-TNF- α
Merck (Darmstadt):	3,3'-Diaminobenzidinhydrochlorid (DAB), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Formalin, Isopropylalkohol (96 %), Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, β -Mercaptoethanol, Natriumchlorid, Salzsäure, Tris, Wasserstoffperoxid
Paesel & Lorei (Frankfurt/M.):	Anti-Hamster-IgG
Pharmacia Biotech AB (Freib.):	Dithiothreitol (DTT)
Sandoz (Basel, Schweiz):	Cyclosporin A
Serotec (Camebridge, UK):	mAk ED3, MRC OX-6, MRC OX-8, MRC OX-18, MRC OX-33, MRC OX-38
Serva (Heidelberg):	Bovines Serumalbumin (BSA), DePeX [®] , Natriumdodecylsulfat (SDS)
Sigma (Deisenhofen):	Denhardts, Dextransulfat, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Pankreas Rnase, Pipes
Vector (Burlingame, USA):	Anti-Maus-IgG, Vectastain [®] -Kit

4.2 Lösungen

PBS (Phosphate Buffered Saline):

Die Angaben beziehen sich auf ein Liter Lösung als 10-fach Konzentrat, pH 7,2

80,0 g NaCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,0 g KCl

2,8 g KH₂PO₄

Lösungen für die in-situ-Hybridisierung:

TE-Puffer

10 mM Tris HCl pH 8.0

1 mM EDTA pH 8.0

4 % Formaldehyd

50 ml 37 % Formaldehyd

450 ml PBS

H₂O (DEPC): autoklaviert

1 l Aqua bidest.

1 ml Diethylpyrocarbonat

0,05 M HCl

2 ml 12 M HCl

498 ml dep. H₂O

Proteinkinase A

40 ml 50 x TE

360 ml dep. H₂O

1 ml 10 mg/ml Proteinase K

zuerst auf 37 °C erhitzen und anschließend Proteinkinase K hinzufügen

Prehybridisierungs-/	20 ml deionisiertes Formamid
Hybridisierungslösung	6 ml 5 M NaCl
	800 µl 1 M Pipes pH 7,0
	800 µl 0,5 M EDTA
	8 ml 50 %-iges Dextransulfat

um das Dextransulfat pipettieren zu können, muß es auf 60 °C erwärmt werden

2 ml 100x Denhardt's
2 ml 1 M DTT
400 µl 20 %-iges SDS
400 µl 10 mg/ml Salmon sperm DNA
400 µl 10 mg/ml Hefe T-RNA

für 5 min kochen und zur Lösung hinzugeben

Posthybridisierungslösungen

20X SSC	175,3 g NaCl
	88,2 g Na-Citrat

in 1 l Aqua bidest. Lösen, pH 7,0

4X SSC	400 ml 20X SSC
	1600 ml H ₂ O

5 ml 14 M β-Mercaptoethanol zu einem Liter geben, ein Liter ohne Mercaptoethanol

2X SSC	50 ml 20X SSC
	450 ml H ₂ O

Pankreas RNase	100 ml 5 M NaCl
	20 ml 50X TE
	880 ml dep. H ₂ O

auf 37 °C anwärmen und 10 mg/ml RNase A (1 ml zu 500 ml, restlichen 500 ml für post RNase Waschschrirte verwenden)

5x MuLV Puffer	250 mM Tris HCl pH 8,3
	375 mM KCl
	15 mM MgCl ₂

4.3 Normalseren

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Präparate vor der Färbung mit Pferde-Normalserum (Färbung von Lymphozyten, MHC-Antigen, B-Zellen, Mikroglia/Makrophagen, BDV-Antigen; Hersteller Camon, Wiesbaden) oder Kaninchen-Normalserum (Färbung von TNF α ; Hersteller Camon, Wiesbaden), jeweils 1:100 in PBS, enthaltend 0,1 % kristallines bovines Serumalbumin (BSA) inkubiert.

4.4 Antikörper

4.4.1 Primäre Antikörper

Der gegen das BDV-spezifische Nukleoprotein N (38/39 kDa) gerichtete monoklonale Antikörper Bo-18 (Thiedemann et al., 1992) wurde von Herrn Prof. Dr. L. Stitz zur Verfügung gestellt.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Literatur</u>
MRC OX-6	Monomorphe Determinante des Ratten MHC II	McMasters und Williams, 1979
MRC OX-8	T-Zytotox./Suppressor Subpopulation, NK-Zellen	Brideau et al., 1980
MRC OX-18	Monomorphe Determinante des Ratten MHC I	Fukamoto et al., 1982
MRC OX-33	B-Zellen	
MRC OX-38	T-Helfer Subpopulation	
ED3	Gewebsmakrophagen	Dijkstra et al., 1985
anti-TNF- α	muriner Tumornekrosefaktor α	Sanchez-Madrid et al., 1983
Bo-18/38/15H7	BDV 38/39 kD	Thiedemann et al., 1992

4.4.2 Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper wurden verwendet:

1. Zur Darstellung der Lymphozyten, MHC-Antigene, B-Zellen, Mikroglia/Makrophagen und des BDV-Antigens biotinyliertes, Ratten-absorbiertes anti-Maus-IgG (Vector, Burlingame, USA, via Camon, Wiesbaden).

2. Zur Darstellung des TNF α biotinyliertes affinitätsgereinigtes anti-Hamster-IgG (Paesel & Lorei, Frankfurt).

Die sekundären Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:500 eingesetzt.

4.5 Probe für die in-situ-Hybridisierung

³⁵S-Cytosintriphosphat-markierte RNA-Proben für die in-situ-Hybridisierung wurden von dem Plasmid pAF4 transkribiert und von Herrn Dr. W. Ian Lipkin (Irvine, California, USA) zur Verfügung gestellt.

4.6 Virus

Für die Infektion der Ratten wurde der Gießener Virusstamm He/80 des BDV's benutzt (Herzog und Rott, 1980). Dieses Virus wurde ursprünglich aus dem Gehirn eines natürlich infizierten Pferdes isoliert, zweimal durch intracerebrale Inokulation in Kaninchen und dreimal in Kulturen embryonaler Kaninchenhirnzellen passagiert. Zur Adaptation an Lewis-Ratten wurden neugeborene Tiere intracerebral mit dem zellfreien Überstand von ultraschallbeschallten BDV-infizierten REB-Zellen infiziert. Vier Wochen später wurden die Tiere getötet, die Gehirne entnommen und nach Ultraschallbehandlung eine 10 %-ige Suspension mit GMEM 2 % FKS hergestellt. Es folgte eine erneute Passage in neugeborenen Ratten. Die daraus resultierende 10 %-ige Gehirnsuspension hatte einen Titer von 2×10^6 TCID₅₀/ml.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde Virus der dritten bzw. vierten Passage in adult-infizierten Lewis-Ratten (BDV 3p adult bzw. BDV 4p adult) verwendet.

4.7 Versuchstiere und Infektion

Ratten vom Stamm Lewis wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover und dem Institut für Virologie der Universität Gießen, sowie der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen. Für die Versuchsreihe mit Anwendung monoklonaler Antikörper wurden die Tiere gepaart, deren Nachkommen im Alter von zwei bis drei Wochen thymektomiert und schließlich im Alter von vier bis fünf Wochen

infiziert. Die intracerebrale Infektion der adulten Tiere fand im Alter von vier bis fünf Wochen in die linke Gehirnhälfte mit 0.05 ml einer 10 %-igen Virusverdünnung entsprechend 5×10^3 TCID₅₀/ml statt. Die intracerebrale Infektion der neugeborenen Ratten wurde innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt mit 0,025 ml derselben Virusverdünnung durchgeführt. Gegen Ende des Versuchs wurden die Tiere narkotisiert und entblutet. Zur Durchführung histologischer Untersuchungen wurden die Augen in einer 10 %-igem Formalin fixiert bzw. für immunhistochemische Untersuchungen mit Isopentan bei -140 bis 160 °C in einem Einbettmedium (Tissue-Tec O.C.T. Compound, Miles Inc., Napperville, Ill/U.S.A.) eingefroren und bei -70 °C gelagert.

4.8 Immunsuppression

4.8.1 CSA-Behandlung

Cyclosporin A (CSA) wurde freundlicherweise von Prof. J.F. Borel (Sandoz, Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Das CSA wurde in neutralen Lipiden verdünnt (100 mg in 10 ml Myglyol 812, Dynamit Nobel, Witten/Ruhr) und täglich subkutan für eine Dauer von 30 Tagen in einer Dosis von 25 mg/kg Körpergewicht verabreicht, beginnend einen Tag vor Infektion (Stitz et al., 1989).

4.8.2 CY-Behandlung

Am gleichen oder einen Tag nach intracerebraler Infektion bekamen die Tiere einer Versuchsreihe intraperitoneal 150 bis 160 mg Cyclophosphamid/kg Körpergewicht (Endoxan[®], ASTA Medica AG, Frankfurt; Narayan et al., 1983a, b).

Einer weiteren Reihe von Versuchstieren wurde beginnend einen Tag vor Infektion an 30 bis 40 aufeinanderfolgenden Tagen 10 mg/kg Körpergewicht/Tag intraperitoneal injiziert (Stitz et al., 1998).

4.8.3 Behandlung mit T-Zell-spezifischen monoklonalen Antikörpern

Verschiedene murine monoklonale Antikörper der Oxford-Serie wurden benutzt (Herkunft: A.F. Williams/European Collection of Animal Cell Cultures). Hybridomzellen wurden in Iscove modified Dulbecco's Medium (IMDM) gezogen, ergänzt um 2 %iges fetales Kalbsserum, Glutamin, Gentamycin und 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die aus der Kultur gewonnenen monoklonalen Antikörper durch Affinitätschromatographie voneinander getrennt.

Die thymektomierten Ratten wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4⁺-(OX-38), gegen CD8⁺-(OX-8) oder gegen alle T-Zellen (OX-52) behandelt, beginnend mit einer intraperitonealen Injektion einen Tag vor der Infektion (Tag -1):

1. In der ersten Gruppe wurden 2 mg OX-38 an den Tagen -1, 1, 7, 14 und bei manchen Tieren an Tag 21 p.i. injiziert.
2. In der zweiten Gruppe wurden 1,5 (bis 2) mg OX-8 an den Tagen -1, 1 und 7 p.i. gegeben.
3. In der dritten Gruppe wurden (1 bis) 2 mg OX-52 an den Tagen -1 und 1 p.i. injiziert (Stitz et al., 1992).

4.9 Versuchsdurchführung

4.9.1 Probenentnahme und Paraffinschnitte

Es wurden chronologisch fortlaufende histologische Untersuchungen in allen Versuchsgruppen durchgeführt. Antigen- bzw. RNA-Nachweis mittels Immunhistochemie oder in-situ-Hybridisierung wurden 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 und 33 Tage p.i. in der Gruppe der adult infizierten, immunkompetenten Ratten und 3, 6, 9, 12, 15, 18, 30, 70, 77, 84, und 100 Tage p.i. bei den immuninkompetenten Tieren durchgeführt. Am Versuchsende wurden die Tiere narkotisiert und entblutet. Ein Auge wurde entfernt, für zumindest 24 Stunden in 10 %-igem Formalin fixiert und anschließend in einem 16-Stunden-Zyklus über eine aufsteigende Alkoholreihe mittels eines Einbettautomaten bei 65 °C in Paraplast[®] eingebettet. Von den eingebetteten Blöckchen wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt und auf mit Glyzerin-Gelatine (für immunhistologische Untersuchungen zum

Nachweis von BDV-Antigenen) bzw. auf mit Eiweiß-Glyzerin-Suspension (für H.E.-Färbung) beschichtete Objektträger aufgezogen.

Vor der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte im Trockenschrank getrocknet und anschließend auf die folgende Weise entparaffiniert:

- Xylol 2 x 5 min.
- Isopropanol 2 x 3 min.
- Isopropanol 95 % 1 x 3 min.
- Isopropanol 80 % 1 x 3 min.
- Isopropanol 50 % 1 x 3 min.
- Trocknen unter Ventilator
- Eukitt[®]-Ringe (Corbit Balsam) um Gewebeschnitte

Zur besseren Darstellung des BDV-Antigens wurde nach dem Entparaffinieren zusätzlich eine Proteasebehandlung nach folgendem Schema durchgeführt:

- 0,5 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,5) 1 x 5 min.
bei 37 °C
- 1 % Protease (Type XXIV, Sigma Chemicals) in Tris-HCl-Puffer bei 37 °C 1 x 10 min.
- PBS (pH 7,4; 0,1 M) eisgekühlt 3 x 3 min.

4.9.2 Gefrierschnitte

Für die immunhistochemische Untersuchung und in-situ-Hybridisierung wurden die Augen, fixiert auf einem Korkplättchen, sofort in durch flüssigen Stickstoff auf – 150 °C gekühltem Isopentan gefroren. Für die Färbungen wurden 15 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen, 10 min in 96 %-igem Isopropylalkohol fixiert und luftgetrocknet.

4.9.3 Konventionelle Färbung

Als konventionelle Färbung wurden die Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung und die Kresylviolett-Färbung (nach Nissl) verwendet.

4.9.4 Immunhistologische Färbung

Durch die Immunhistologie wurden virus-spezifische Proteine und die Entzündungsmarker CD4, CD8, MHC-I, -II, B-Zellen-Antigen, Mikroglia/Makrophagen-Antigen und TNF α an Organschnitten nachgewiesen.

Es wurde die Avidin-Biotin-Technik mit Meerrettichperoxidase als Markerenzym (Vectastain[®] ABC Kit, Firma Vector, Burlingame, USA) und 3,3'-Diaminobenzidin-Hydrochlorid als färbendes Substrat verwendet.

Vorgehensweise der Färbung:

- Spülen für 5 min in PBS-Puffer (phosphate buffered saline; pH 7,2; 0,1 M) unter Schwenken.
- zwanzigminütige Vorinkubation in Pferde-Normalserum (1:100 in PBS, enthaltend 0,1 % kristallines bovines Serumalbumin [BSA])
- Inkubation mit 0,5 ml der jeweiligen Primär-Antikörper-Lösung (1:1000) für zwölf Stunden (unter Luftabschluß zur Sicherung gegen Verdunstung)
- fünf- und dreißigminütige Spülung in PBS-Puffer
- Inkubation mit biotinyliertem Sekundär-Antiserum für 30 min

- Vectastain[®]-ABC-Reagens 30 min vor Gebrauch ansetzen und bei Raumtemperatur stehen lassen
- zweimalige fünfminütige Spülung in PBS-Puffer
- Blockierung endogener Peroxidasen mit 0,1 %-iger H₂O₂-Lösung für 5 min
- Spülung mit Aqua bidest.
- zweimalige fünfminütige Spülung in PBS-Puffer
- Inkubation mit dem Vectastain[®]-ABC-Reagens für 60 min
- dreimalige fünfminütige Spülung in PBS-Puffer
- Auftragen des Farbstoffes Diaminobenzidin (0,05 % in PBS plus 0,1 ml 1 %igem H₂O₂ in Aqua bidest.) und Belassung für 5-10 min unter Lichtabschluß (Entwicklung beobachten!)
- zweimalige fünfminütige Spülung in Aqua bidest.
- Gegenfärbung in Haemalaun nach P. Meyer und Bläuung in Ammoniakwasser
- Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Einbringen in Xylol
- Eindecken der Schnitte mit DePex[®]

4.9.5 In-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung ist eine Methode, bei der virale RNA an Organschnitten nachgewiesen wird. Hierzu wird von einer cDNA eine komplementäre einzelsträngige RNA-Kopie der nachzuweisenden RNA erstellt, wobei ein Nukleotid (³⁵S-Cytosintriphosphat) radioaktiv markiert ist. Diese RNA-Kopie bindet an die komplementäre RNA und ist mit Hilfe der Autoradiographie oder durch eine Silberemulsion sichtbar zu machen.

Vorbehandlung

1. Kryostatschnitte werden auf Raumtemperatur erwärmt, Paraffin-Schnitte werden 2 x 2 min mit Xylen, anschließend 2 x 2 min mit Ethanol gewaschen und luftgetrocknet

2. zur Fixierung werden die Objektträger 5 min bei Raumtemperatur mit 4 % Formalin fixiert
3. Waschen 2 x 2 min mit PBS
4. Inkubation der Objektträger mit Proteinase K/5x TE für 7,5 min bei 37 °C
5. Waschen 2 x 2 min mit PBS
6. Inkubation mit 0,05 N HCl für 7,5 min bei Raumtemperatur
7. Waschen 2 x 2 min mit PBS
8. Fixierung mit 4 % Formalin für 2 min bei Raumtemperatur
9. Waschen 2 x 2 min mit PBS
10. Dehydration mit 60 %, 80 %, 95 % Ethanol/0,3 M Ammoniumacetatlösung
11. Lufttrocknung

Prähybridisierung

Objektträger mit genügend Prähybridisierungslösung bedecken (0,5 - 1,0 ml/Objektträger) und für ein bis drei Stunden bei 48–50 °C in einer feuchten Kammer inkubieren

Hybridisierung

1. Dekantieren der Prähybridisierungslösung
2. Objektträger mit ausreichender Menge Hybridisierungslösung bedecken (75-100 µl); Konzentration der RNA-Probe in der Hybridisierungslösung sollte bei 5 ng/100 µl liegen
3. Objektträger mit Deckglas abdecken und über Nacht (acht bis 16 Stunden) bei 48-50 °C in einer feuchten Kammer inkubieren

Posthybridisierung

1. Deckglas in 4 x SSC/70 mM 2-ME Lösung entfernen
2. Inkubation der Objektträger in 4 x SSC/70 mM 2-ME Lösung für 15 min bei Raumtemperatur
3. Inkubation 15 min in 4 x SSC Lösung
4. Inkubation der Objektträger mit Pankreas RNase 10µg/ml in 0,5 M NaCl/1 x TE für 15 min bei 37 °C, um ungebundene, einzelsträngige RNA zu entfernen
5. Waschen mit 0,5 M NaCl/1 x TE für 15 min bei 37 °C
6. Objektträger mit 2 x SSC für 15 min bei 56 °C inkubieren
7. Dehydration mit 60 %, 80 %, 95 % Ethanol/0,3 M Ammoniumacetatlösung und 100 % Ethanol
8. Lufttrocknung
9. Exponierung der Objektträger gegen einen Autoradiographiefilm für zwei bis vier Tage bei Raumtemperatur
10. Objektträger werden anschließend in eine 30 bis 50 %ige Kodak NTB-2 Silberemulsion bei 37 °C in totaler Dunkelheit getaucht und ein bis zwei Stunden luftgetrocknet
11. die Exponierung der Objektträger sollte zwei- bis dreimal länger sein als die Exponierung für eine gute Schwarzfärbung des Autoradiographiefilmes (ca. fünf bis sieben Tage)
12. die Entwicklung der Objektträger erfolgt mit Kodak D-19 Entwickler für 2,5 min, Waschen in 500 ml Wasser für 30 Sekunden und zweimaligem Fixieren in 500 ml 24 %igen Natriumthiosulfats für je 10 min und anschließendem Waschen in 500 ml Wasser für 10 min; alle Schritte bei einer Temperatur von 16 °C
13. Lufttrocknung
14. Objektträger können mit Kristallviolett oder Hämatoxylin gefärbt werden

4.10 Auswertung

4.10.1 Beurteilung der klinischen Symptome

Der Gesundheitszustand BDV-infizierter Tiere wurde täglich mit dem nicht-infizierter Kontrolltiere verglichen. Die klinischen Krankheitssymptome BDV-infizierter Lewis-Ratten mit normalem Krankheitsverlauf wurden nach folgenden Kriterien in eine Skala von 0 bis 3 eingestuft.

Stufe 0: keine Symptome

Stufe 1: leichte Inkoordinationen, mangelhafte Fellpflege

Stufe 2: schwere Inkoordinationen und Ataxien

Stufe 3: Paresen, Paralysen

4.10.2 Histologie

Unter Berücksichtigung der Zahl der entzündlichen Infiltrate, ihrer Größe und der Anzahl der in die Umgebung eingewanderten Entzündungszellen wurde ein semi-quantitativer Entzündungsindex mit einer Spanne von 0 bis 3 in Schritten von 0,5 definiert:

- 0 - keine Entzündungszellen
- 0,5 - eingestreute Entzündungszellen ohne Infiltratbildung[°]
- 1 - ein bis zwei perivaskuläre Infiltrate^{*°}
- 1,5 - drei bis vier perivaskuläre Infiltrate^{*°}
- 2 - fünf bis sechs perivaskuläre Infiltrate^{*°}
- 2,5 - sieben bis acht perivaskuläre Infiltrate^{*°}
- 3 - mehr als neun perivaskuläre Infiltrate^{*°}

* große Infiltrate mit multiplen Schichten entsprechen in der Bewertung zwei Infiltraten

[°] starke Einstreuung mit Entzündungszellen unabhängig von perivaskulären Infiltraten: + 0,5

Entsprechend wurde im Rahmen einer Skala von 0 bis 3 eine Bewertung mit einem arbiträren Degenerationsindex vorgenommen, in dem Schwere als auch Ausdehnung auf die verschiedenen Retinaschichten Berücksichtigung fand:

- 0 - keine Degeneration
- 0,5 - Vakuolenbildung oder stellenweiser Verlust der äußeren plexiformen Schicht
- 1 - überwiegender bis vollständiger Verlust der äußeren plexiformen Schicht
- 1,5 - stellenweiser Verlust der Photorezeptorenschicht
- 2 - stellenweise stark reduzierte Schichtdicke der beiden Körnerschichten /
Restzellbänder
- 2,5 - fokale Atrophie
- 3 - völlige Atrophie

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden deskriptiv und graphisch dargestellt.

4.10.3 Immunhistologie

Unter Berücksichtigung der Anzahl der markierten Zellen wurde ein semiquantitativer Index von 0 bis 1,5 definiert. Additiv wurde der Grad der Ausdehnung auf die Retinaschichten und das Auftreten von größeren Zellgruppen bewertet, wodurch ein maximaler semiquantitativer Index von 3 erreichbar ist:

- 0 – keine immunhistochemische Reaktion
- 0,25 – vereinzelte immunhistochemische Reaktionen bzw. immunreaktive Zellen
- 0,5 – wenige immunhistochemische Reaktionen bzw. immunreaktive Zellen
- 1 – mäßige immunhistochemische Reaktionen bzw. immunreaktive Zellen
- 1,5 – viele immunhistochemische Reaktionen bzw. immunreaktive Zellen
- + 0,5 – mehr als zwei Retinaschichten betroffen
- + 0,5 – deutliche Infiltrate bzw. flächigere immunhistochemische Reaktionen
- + 0,75 – fünf Retinaschichten betroffen
- + 1 – alle Retinaschichten betroffen

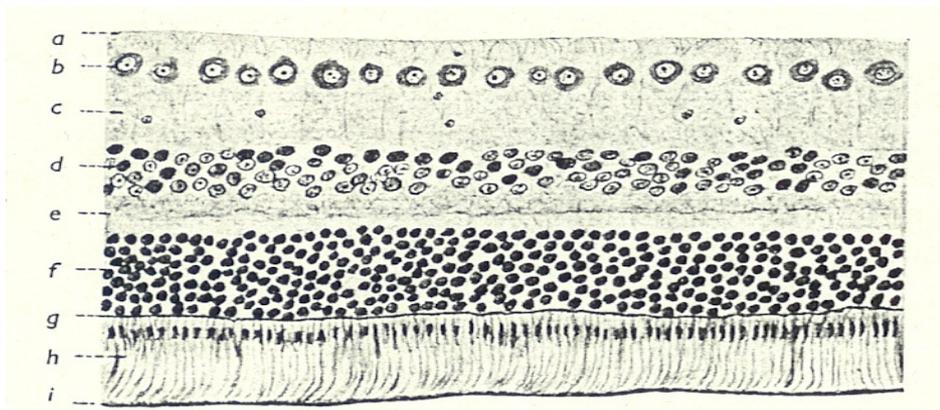
5 Ergebnisse

5.1 Histologische Untersuchungen

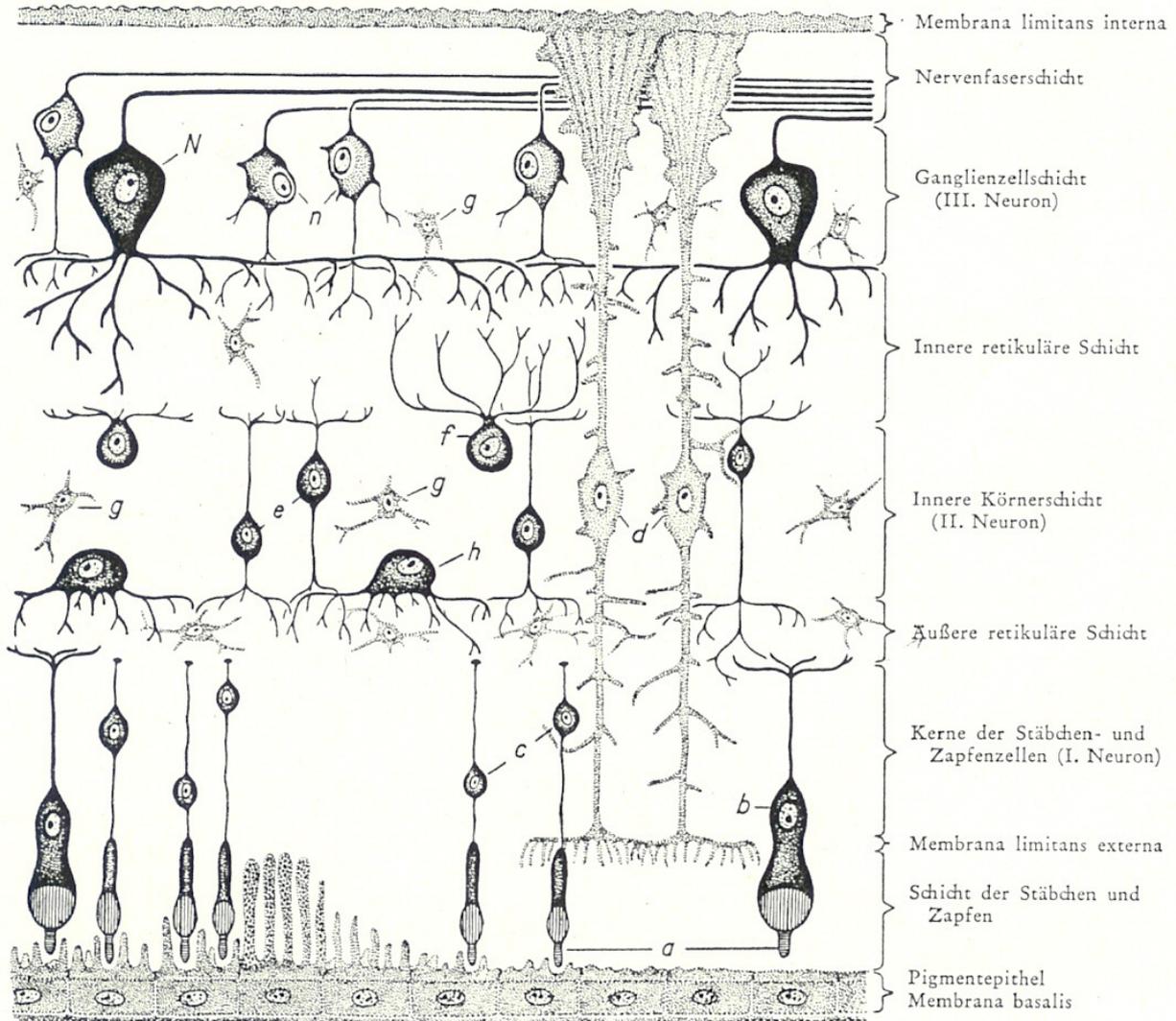
5.1.1 Normalstruktur der Retina

Die Retina überzieht als Tunica interna die innere Oberfläche des Bulbus vom Pupillarrand der Iris bis zum Sehnervenaustritt (Seiferle, 1982). Es wird hierbei zwischen der Pars caeca retinae auf der Rückseite der Iris und des Ziliarkörpers und der Pars optica retinae unterschieden, die als lichtempfindlicher Teil der Netzhaut den hinteren Augenpol bis zur Ora serrata auskleidet (Seiferle, 1982; Fawcett, 1986) und mit dem Gehirn über den N. opticus in Verbindung steht.

Bei der Pars optica retinae unterscheidet man neben dem Pigmentepithel drei Ebenen hintereinandergeschalteter Neurone, die aufgrund ihrer regelmäßigen Anordnung den charakteristischen Schichtenaufbau der Retina ergeben (Seiferle, 1982; Fawcett, 1986; Bild 12).



*Schnitt durch die Netzhaut aus dem Augenhintergrund (aus Grau/Walter, Histologie, Parey-Verlag):
 a Nervenfaserschicht, b Ganglienzellschicht, c innere plexiforme (=retikuläre) Schicht, d innere Körnerschicht,
 e äußere plexiforme Schicht, f äußere Körnerschicht, g Membrana limitans externa, h Photorezeptorenschicht
 (= Schicht der Stäbchen und Zapfen), i Pigmentepithel*



Schema des Baues der Retina (in Anlehnung an Schaffer und Becher; aus Grau/Walter, Histologie, Parey-Verlag):

a Außenglieder der Zapfenzelle b und Stäbchenzelle c, d Müllersche Stützzelle, e Körnerzelle, f amakrine Zelle, g Gliazelle, h Horizontalzelle, N große und n kleine (vegetative) Nervenzelle

Die Retina der Ratte besteht wie die anderer Wirbeltiere aus zehn Schichten (Tilgner, 1966), wobei die Lamina limitans interna (innere Grenzmembran) die Abgrenzung zum Glaskörper darstellt und das Pigmentepithel als äußerste Schicht der Choroidea aufliegt. Von einigen Autoren (Villegas, 1960; Fawcett, 1986) wird das Pigmentepithel jedoch zur Choroidea gezählt.

An das Pigmentepithel anschließend liegen die Außenglieder der Photorezeptoren, deren Perikarya in der äußeren Körnerschicht liegen und das erste Neuron der Sehbahn darstellen (Stell, 1972; Krebs, 1982; Fawcett, 1986). In der Retina der Ratte bilden die Stäbchen den Hauptanteil der Photorezeptoren, während Zapfen nur

selten oder gar nicht gefunden werden (Walls, 1934; Tilgner, 1966; Matthew und La Vail, 1976). Der äußere Teil der Stäbchenzelle, der eigentliche Photorezeptor, liegt zwischen dem Pigmentepithel und der äußeren Grenzmembran und wird nochmals in Außen- und Innenglied unterteilt.

An der Basis der Innensegmente bilden die Photorezeptoren gemeinsam mit den sie vollständig umgebenden distalen Fortsätzen der Müllerschen Stützzellen die Lamina limitans externa (Tilgner, 1966; Krebs, 1982).

Die Perikarya der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht, die aus acht bis zwölf Kernreihen besteht (Weisse et al., 1974; Seitz et al., 1977). Die Kerne sind von einer schmalen, weitgehend organellenfreien Zytoplasmaschicht umgeben (Fawcett, 1986; Tilgner, 1966).

Die Axone der Photorezeptoren bilden gemeinsam mit den Dendriten der bipolaren Ganglienzellen und Horizontalzellen der inneren Körnerschicht die äußere plexiforme Schicht (Dieterich, 1967; Fawcett, 1986; Krebs, 1982).

Das zweite Neuron der peripheren Sehbahn wird von den Ganglienzellen (Bipolar-, Horizontal- und amakrine Zellen) gebildet. Daneben findet man noch Zellkörper und Kerne der Müllerschen Stützzellen, die den Hauptanteil des Gliagewebes der Retina bilden (Villegas, 1960; Tilgner, 1966; Stell, 1972; Fawcett, 1986; Krebs, 1982). Die Dicke der Schicht beträgt drei bis fünf Zellreihen (Weisse et al., 1974; Seitz et al., 1977).

In der inneren plexiformen Schicht findet man neben den Nervenfasersfortsätzen der bipolaren und amakrinen Zellen die Dendriten des dritten Neurons sowie deren synaptische Verbindungen.

Die einlagige Ganglienzellschicht, auch als Ganglion nervi optici bezeichnet, wird vom dritten Neuron der Retina gebildet (Potts et al., 1982).

Die marklosen Neuriten der Ganglienzellen biegen rechtwinklig um und verlaufen radiär in der Nervenfaserschicht zur Sehnervenpapille, durchdringen die Lamina

cribrosa und bilden als markhaltige Nevenfasern gemeinsam mit den sie umgebenden Gliazellen den N. opticus (Fawcett, 1986). Infolge der in der Peripherie geringeren Zahl der Nervenfasern nimmt die Dicke der Nervenfaserschicht zum Ziliarkörper hin ab. Sie ist deshalb oft nur im Zentrum der Netzhaut als eigenständige Schicht zwischen Ganglienzellschicht und Glaskörper zu erkennen (Tilgner, 1966; eigene Untersuchungen).

5.1.2 Infektionsausbreitung

Immunhistochemische Untersuchungen und in-situ-Hybridisierung

Zur Darstellung der Verteilung des BDV in der Retina in den verschiedenen Versuchsgruppen wurden parallele Untersuchungen durchgeführt mit:

- a) einem Nukleoprotein N (38/39 kDa)-spezifischen monoklonalen Antikörper
- b) einem BDV-RNA-spezifischen DNA-Klon pAF4

Beide in-situ-Methoden zeigen ähnliche Ergebnisse, so daß in der weiteren Beschreibung „BDV“ als Äquivalent zur virusspezifischen RNA und zum entsprechenden Antigen verwendet wird.

5.1.2.1 Adult BDV-infizierte, immunkompetente Tiere

An Tag 15 p.i. erscheint das BDV in ersten, vereinzelt Ganglienzellen. In der Folge nimmt die Zahl infizierter Neuronen des Ganglion nervi optici kontinuierlich weiter zu. 21 Tage p.i. ist BDV in der inneren Körnerschicht und in beiden plexiformen Schichten nachweisbar. Später - nach Tag 24 p.i. - ist BDV in allen Retinaschichten zu finden.

5.1.2.2 Neugeborenen infizierte Tiere

Bei diesen immuninkompetenten Tieren verläuft die Virusausbreitung wesentlich schneller: schon nach neun Tagen hat das BDV einige Neuronen der Ganglienzellschicht und Abschnitte der inneren plexiformen Schicht erreicht. 12 Tage p.i. hat die Infektion neben der weiteren Ausbreitung innerhalb des Ganglion nervi optici auf die

innere Körnerschicht und teils auf die äußere plexiforme Schicht übergegriffen. 15 Tage p.i. kann das BDV in zentralen Anteilen der Netzhaut im Bereich des N. opticus in der äußeren Körnerschicht wie in der Photorezeptorenschicht beobachtet werden. Ab 18 Tage p.i. sind alle Retinaschichten von der Infektion betroffen.

5.1.3 Pathologische Veränderungen der Retina

5.1.3.1 Adult BDV-infizierte, immunkompetente Tiere

Im Untersuchungszeitraum bis Tag 16 p.i. sind weder entzündliche noch degenerative Veränderungen der Retina zu beobachten. Ab Tag 17 p.i. treten bei manchen Tieren erste vereinzelte Lymphozyten im Bereich der Ganglienzellschicht, ohne Veränderungen von Schichtung und Struktur der Retina, auf. Der Entzündungsbeginn ist am Tag 18 p.i. bei allen untersuchten Tieren nachweisbar, wobei einzelne Entzündungszellen auch in der inneren plexiformen Schicht zu finden sind. Ab Tag 20 p.i. kommt es zur Ausbildung erster kleiner perivaskulärer Infiltrate in der Ganglienzellschicht, aber auch beginnende leichte Degenerationserscheinungen werden besonders in der Peripherie der Retina zum Übergang zwischen Pars caeca retinae auf der Rückseite der Iris und des Ziliarkörpers und Pars optica retinae hin sichtbar: während größere Retinaanteile noch unauffällig sind, gibt es andere Retinaabschnitte, in denen die äußere plexiforme Schicht zum Teil dünner ist oder eine dezente Vakuolenbildung aufweist. Die benachbarte äußere Körnerschicht erscheint in solchen Abschnitten nicht kompakt als Block von der äußeren plexiformen Schicht abgegrenzt, sondern inhomogen mit zick-zack-artig verlaufendem Rand, wobei die Säulenordnung der Zellkerne jedoch beibehalten bleibt. Neben diesen ersten dezenten Degenerationserscheinungen gibt es auch initiale Disorganisationen im Bereich der Photorezeptorenschicht. Am Tag 21 p.i. hat der Entzündungsgrad weiter leicht zugenommen. Das Pigmentepithel nimmt teilweise an Schichtdicke zu. Erstmals ist im Bereich eines größeren perivaskulären Infiltrats die äußere plexiforme Schicht verschwunden und die Schicht des ersten Neurons etwas dünner. Mit dem Tag 22 p.i. tauchen erste Entzündungszellen in der Photorezeptorenschicht auf und Kapillarsprossen im veränderten Pigmentepithel. Bis zum Tag 24 p.i. nimmt die Entzündung an Stärke weiter zu, was sich in einer erhöhten Anzahl und Vergrößerung perivaskulärer Infiltrate in der Ganglienzellschicht äußert. Auch die Atrophie-

erscheinungen werden deutlicher: die Außensegmente der Photorezeptorenschicht sind teilweise verschwunden und die äußere plexiforme Schicht ist in manchen Abschnitten so dünn geworden, daß innere und äußere Körnerschicht sich fast berühren. Dieser Prozeß hat sich bis zum Tag 28 p.i. weiter fortgesetzt, so daß die äußere plexiforme Schicht abschnittsweise ganz fehlt. Es sind jedoch auch noch Bereiche mit Vakuolenbildung oder nur geringradigem Schichtdickenverlust vorhanden. Auch die äußere Körnerschicht weist mit stellenweise dünnerer Schichtdicke und auftretender Unordnung einen höheren Grad der Disorganisation auf. Lokal treten die Degenerationserscheinungen bevorzugt in der Peripherie der Retina in der Nähe des Ziliarkörpers auf.

Insgesamt lassen sich die bisher beschriebenen Veränderungen jedoch noch als mäßige Atrophieerscheinungen einstufen.

Bis Tag 30 p.i. ist die Anzahl der in der Ganglienzell-, inneren plexiformen und Photorezeptorenschicht eingestreuten Entzündungszellen und die Anzahl und Größe perivaskulärer Infiltrate weiter gestiegen; zusätzlich tauchen Entzündungszellen auch im Bereich des Pigmentepithels auf. Erstmals werden auch stellenweise Verluste in der Breite der inneren Körnerschicht deutlich, ebenso hat die Photorezeptorenschicht abschnittsweise viel an Substanz verloren.

Der Höhepunkt der entzündlichen Infiltration ist ungefähr am Tag 31 p.i. erreicht. Die äußere plexiforme Schicht ist nunmehr größtenteils völlig verschwunden; relativ unbetreffene Abschnitte sind nicht mehr zu finden. Stattdessen tauchen vermehrt Kapillaren zwischen den beiden Körnerschichten auf. Die Photorezeptorenschicht ist in manchen Regionen nur noch andeutungsweise vorhanden, andernorts jedoch noch nur leicht atrophiert. Am Tag 33 p.i. ist die Photorezeptorenschicht in manchen Bereichen fast völlig aufgelöst. Am Tag 38 p.i. hat sich der Entzündungsgrad nicht verringert. Die äußere plexiforme Schicht ist völlig verschwunden; die nun aneinandergrenzenden Körnerschichten haben weiter an Dicke verloren und fließen bei unklarem Grenzverlauf verzahnt ineinander über. Bis zum Tag 45 p.i. hat sich die Entzündung leicht abgeschwächt. In der Peripherie oder in Bereichen von Infiltraten haben beide Körnerschichten bereits soviel Substanz verloren, daß dort nur noch wenige Zellkerne der ersten beiden Neurone vorhanden sind. Über die gesamte Retina hinweg reduziert sich die Schichtdicke des ersten und zweiten Neurons. Bis zum Tag 50 p.i. schreitet diese Entwicklung weiter fort: abschnittsweise sind beide

Neuronenschichten fast völlig verschwunden. Auch die innere plexiforme Schicht hat einen Substanzverlust gegenüber der ursprünglichen Schichtdicke erfahren. Perivaskuläre Infiltrate sind weiter rückläufig, was sich bis zum Tag 58 und 64 p.i. fortsetzt. An Tag 64 p.i. gibt es erste, nur vereinzelt Abschnitte der Retina, in denen es zu einer völligen Atrophie gekommen ist. Parallel ist nur noch eine sehr schmale Restschichtung der ehemaligen Retina erkennbar: neben einer leicht atrophierten Ganglienzellschicht, in der eine Reduktion der Neuronen auffällt, sind nur noch Rudimente der ehemaligen inneren plexiformen und der inneren und äußeren Körnerschicht vorhanden. Man findet nur noch wenige entzündliche Infiltrate. An Tag 89 p.i. sind keine weiteren degenerativen Erscheinungen eingetreten. Vier Monate p.i. ist die Degeneration weiter vorangeschritten: es ist zu einer völligen Auflösung der Retina gekommen, neben der es nur noch teilweise Abschnitte gibt, in der Reste der Ganglienzell-, inneren plexiformen und inneren Körnerschicht vorhanden sind (Bild 8-11). Das Pigmentepithel bleibt hingegen erhalten, ist jedoch verbreitert und weist weiterhin Kapillaren auf. Sechs und neuneneinhalb Monate p.i. sind kaum noch weitere Veränderungen erkennbar, lediglich der Anteil völlig aufgelöster Retina vergrößert sich weiter (Abb. 1, 2).

5.1.3.2 Neugeborenen infizierte Tiere

Zu keinem Zeitpunkt des Untersuchungszeitraumes sind zelluläre entzündliche Veränderungen der Retina in der H.E.-Färbung feststellbar.

Ab Tag 50 p.i. tauchen erste Vakuolen in der äußeren plexiformen Schicht auf. An Tag 100 p.i. hat die äußere plexiforme Schicht in manchen Abschnitten Substanz verloren, so daß beide Körnerschichten näher aneinanderrücken; bei der äußeren Körnerschicht erscheint der Übergang zur äußeren plexiformen Schicht teilweise weniger geordnet, was sich in einem zick-zack-artigen Grenzverlauf widerspiegelt, während die restlichen Schichten weiterhin unauffällig sind. An Tag 360 p.i. ist die äußere plexiforme Schicht größtenteils verschwunden oder weist nur noch einen Teil der ursprünglichen Dicke auf. Auch beide Körnerschichten zeigen eine geringere Schichtstärke, wobei dies bei der äußeren Körnerschicht stärker ausgeprägt ist (Bild 2, 14). Neben dem vollständigen Verlust der äußeren plexiformen Schicht fällt 14 Monate p.i. (Bild 15) die Reduktion der Schichtstärken der beiden Körnerschichten

noch etwas stärker aus; dabei ist die äußere Körnerschicht in ersten Abschnitten nur noch rudimentär vorhanden. Darüberhinaus ist auch ein Verlust von Teilen der Photorezeptorenschicht erkennbar. Am Ende des Untersuchungszeitraums 18 und 20 Monate p.i. ist die Atrophie im Bereich beider Körnerschichten weiter fortgeschritten (Bild 20): besonders in den peripheren Anteilen der Retina bestehen beide Schichten teilweise nur noch aus einer einzelligen Neuronenschicht. Hier hat auch die innere plexiforme Schicht deutlich an Substanz verloren. Im Bereich des Ziliarkörpers gibt es auch Abschnitte mit fast völliger Atrophie. Die Ganglienzellschicht zeigt verstärkt in der Peripherie eine leichte Reduktion der Neuronen. In zentraleren Anteilen der Retina ist die Degeneration weniger deutlich ausgeprägt, so daß eine recht gut erhaltene Schichtung bestehend aus Ganglienzellschicht, innerer plexiformer Schicht und beiden Körnerschichten einschließlich rudimentärer Photorezeptorenschicht zu beobachten ist (Bild 21; Abb. 3).

5.1.3.3 CSA-behandelte, erwachsen infizierte Tiere

Im Verlauf des Untersuchungszeitraums sind keine zellulären entzündlichen Veränderungen in der H.E.-Färbung zu beobachten.

An Tag 70 p.i. tauchen erste Vakuolen in der äußeren plexiformen Schicht auf. Eine Woche später erscheint die äußere Körnerschicht in wenigen Abschnitten geringgradig dünner. 90 und 100 Tage p.i. sind die Degenerationserscheinungen im Bereich des Ziliarkörpers etwas deutlicher erkennbar: erste atrophische Vorgänge sind in Form einer Disorganisation oder eines Verlustes der Außensegmente der Photorezeptorenschicht zu beobachten. Auch die äußere plexiforme Schicht hat in entsprechenden Abschnitten an Substanz verloren, so daß beide Körnerschichten näher aneinanderrücken; die äußere Körnerschicht ist in solchen Bereichen etwas dünner, wobei auch der Übergang zur äußeren plexiformen Schicht weniger geordnet erscheint, was sich in einem zick-zack-artigen Grenzverlauf widerspiegelt, während die restlichen Schichten weiterhin unauffällig sind. Ca. vier Monate p.i. ist die äußere plexiforme Schicht in peripheren Anteilen völlig verschwunden oder hat beträchtlich an Stärke verloren, während zentraler gelegene Abschnitte nur wenig verändert scheinen. Einen Monat später ist diese Tendenz deutlicher sichtbar, da nun in peripheren Anteilen im Bereich des Ziliarkörpers sowohl die Photorezeptoren-

schicht, als auch die äußere plexiforme Schicht teils völlig verschwunden ist und darüberhinaus auch die äußere Körnerschicht in den entsprechenden Abschnitten deutlich dünner ist. In zentraler gelegenen Anteilen sind die Atrophieerscheinungen weniger offensichtlich und drücken sich lediglich in Form einer geringeren Schichtstärke der äußeren drei Retinaschichten aus. Dieser Zustand bleibt bis sechs Monate p.i. konstant. 13 Monate p.i. ist eine deutlich vorangeschrittene Atrophie zu beobachten: die äußere plexiforme Schicht ist verschwunden, ebenso überwiegend die Photorezeptorenschicht. Beide Körnerschichten weisen nur noch eine sehr geringe Schichtstärke auf. Die Neuronen der Ganglienzellschicht sind in einem geringeren Maß von der Atrophie betroffen, was sich in einer leichten quantitativen Reduktion der Neuronen ausdrückt. An Ende des Untersuchungszeitraumes 17 Monate p.i. sind Photorezeptorenschicht und äußere plexiforme Schicht vollständig verschwunden. Auch die äußere Körnerschicht ist in manchen Abschnitten verlorengegangen (Bild 16, 18). Darüberhinaus gibt es jedoch auch Retinaanteile, in denen noch eine einreihige, seltener auch eine mehrreihige äußere Körnerschicht zu beobachten ist (Bild 16, 19). Teilweise ist es zu einer völligen Atrophie der Retina gekommen, teils ist zumindest eine Restschichtung der drei inneren Retinaschichten (Ganglienzellschicht, innere plexiforme und innere Körnerschicht) erkennbar (Bild 17, Abb. 4).

5.1.3.4 CY-behandelte, erwachsen infizierte Tiere (Mehrfachgabe CY)

Im Verlauf des Untersuchungszeitraums sind keine zellulären entzündlichen Veränderungen in der H.E.-Färbung zu beobachten.

Während 30 Tage p.i. die Retina unverändert erscheint, hat die Schichtstärke der äußeren plexiformen Schicht zwei Monate p.i. in ersten Bereichen leicht bis deutlich abgenommen. Drei Monate p.i. ist die Atrophie in erheblichem Maße vorangeschritten und hat zu einem Verlust der äußeren plexiformen, der Photorezeptoren- und in Teilen beinahe der kompletten äußeren Körnerschicht geführt. Letztere besteht abschnittsweise nur noch aus einer einreihigen Zellschicht. Es ist eine Restschichtung aus Ganglienzell- und innerer plexiformer Schicht, sowie den beiden Körnerschichten einschließlich nur noch rudimentär vorhandener äußerer Körnerschicht erkennbar. Vier Monate p.i. ist letztere dann größtenteils verschwunden. Darüber

hinaus haben zu diesem Zeitpunkt auch degenerative Erscheinungen an der Ganglienzell- und inneren plexiformen Schicht begonnen, was sich in Neuronen- und Schichtdickenverlust äußert. Zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 178 p.i. hat auch die innere Körnerschicht deutlich an Substanz verloren. Abschnittsweise ist es ebenfalls zu einem vollständigen Verlust dieser Schicht gekommen. Lediglich eine degenerierte Ganglienzell- und innere plexiforme Schicht, darüberhinaus nur noch stellenweise eine reduzierte innere Körnerschicht sind vom ursprünglichen Retinaaufbau noch erhalten (Bild 24), wobei stellenweise die Ordnung in Schichten aufgelöst ist (Bild 22, 23, Abb. 5).

5.1.3.5 CY-behandelte, erwachsen infizierte Tiere (Einmalgabe CY)

Bis Tag 24 p.i. ist die Retina unauffällig. An Tag 37 p.i. ist in der H.E.-Färbung eine leichte Infiltration mit Entzündungszellen erkennbar. 48 Tage p.i. ist die äußere plexiforme Schicht etwas dünner. An Tag 69 p.i. fällt eine schwache Infiltration vereinzelter Entzündungszellen im Bereich der Ganglienzellschicht auf; auch in der Photorezeptorenschicht finden sich einzelne Entzündungszellen wieder. Zusätzlich treten degenerative Erscheinungen auf: es gibt Abschnitte, in denen die äußere plexiforme Schicht fast vollständig fehlt, andere, wo ihre Schichtdicke schwach reduziert ist, und wiederum andere, wo lediglich Vakuolen auftreten. Dem stehen andere weitgehend unveränderte Abschnitte entgegen. Auffälligkeiten einer nachbarschaftlichen Beziehung zwischen Infiltration und Atrophie sind nicht erkennbar. In der Photorezeptorenschicht ist stellenweise eine beginnende Unordnung zu beobachten. Die äußere Körnerschicht verliert die ersten Neurone, was sich in einem stellenweise zick-zack-artigen Grenzverlauf zur äußeren plexiformen Schicht und einer leichten reduzierten Schichtdicke widerspiegelt. Am Ende des Untersuchungszeitraumes 84 Tage p.i. ist die äußere plexiforme Schicht vollständig verschwunden. Die benachbarte äußere Körnerschicht weist eine deutlich gestörte Ordnung einschließlich einer Verringerung der Schichtstärke auf (Abb. 6).

5.1.3.6 OX-38-behandelte, erwachsen infizierte Tiere

Bis Tag 28 p.i. sind weder entzündliche noch degenerative Erscheinungen der Retina in der H.E.-Färbung erkennbar.

An Tag 29 p.i. bei einem Tier, sowie an Tag 69 p.i. sind vereinzelte Entzündungszellen im Bereich der Ganglienzellschicht, weniger in der Photo-rezeptorenschicht zu finden. Degenerationserscheinungen fehlen oder haben sich erst teilweise 69 Tage p.i. manifestiert: die äußere plexiforme Schicht weist verschiedene Grade der Atrophie auf, von geringgradig verändertem Zustand über Abschnitte mit Vakuolenbildung bis hin zu fast vollständig verschwundenen Anteilen. In der Photorezeptorenschicht wirkt die Anordnung der Segmente nicht mehr homogen. Neben unveränderter äußerer Körnerschicht ist es abschnittsweise zu Neuronenverlusten gekommen, erkennbar an leichtem Schickdickenverlust und verschieden hohen Zellkernsäulen, was sich in einem zick-zack-artigen Grenzverlauf zur äußeren plexiformen Schicht hin äußert. Bis an Tag 76 p.i. sind wenige Veränderungen eingetreten: lediglich die Photorezeptorenschicht ist in ersten Regionen beinahe vollständig atrophiert. Zudem hat die Bildung von Vakuolen in der äußeren plexiformen Schicht zugenommen.

Vereinzelte Entzündungszellen sind bis zum Ende des Untersuchungszeitraums an Tag 90 p.i. erkennbar. Die Degenerationserscheinungen haben an Deutlichkeit zugenommen: die äußere plexiforme Schicht ist aufgelöst und die nun an die innere direkt, teils zick-zack-artig anschließende äußere Körnerschicht ist durchweg dünner durch fortschreitenden Neuronenverlust. Stellenweise ist die Reduktion des ersten Neurons so stark ausgeprägt, daß die Schicht teilweise nur noch aus einer Zellkernlage besteht bzw. vollständig verschwunden ist. Auch die Photorezeptorenschicht ist abschnittsweise gänzlich atrophiert. Es ist auch lokal eine in ihrer Schichtdicke verringerte innere Körnerschicht zu beobachten, während bei einem Tier zum gleichen Zeitpunkt die Degeneration an manchen Stellen soweit fortgeschritten ist, daß auch die Schichten des zweiten und dritten Neurons sowie die innere plexiforme Schicht teils fast völlig verschwunden sind.

5.1.3.7 OX-8-behandelte, erwachsen infizierte Tiere

Bis zum Tag 37 p.i. sind keine Degenerationserscheinungen aufgetreten. Ab Tag 29 p.i. tauchen bei einem Teil der Tiere vereinzelte Entzündungszellen im Bereich der Ganglienzellschicht auf. An Tag 50 p.i. ist eine leicht angestiegene Zahl an Entzündungszellen und ein zusätzliches Auftauchen derselben in der Photorezeptorenschicht zu beobachten, ohne daß jedoch Infiltrate gebildet wären. In den verschiedenen Schichten werden erste atrophische Anzeichen erkennbar: die Photorezeptorenschicht hat ihre homogene Anordnung verloren. Die äußere plexiforme Schicht weist einen hohen Grad an Vakuolenbildung auf, ist teils jedoch noch unbetroffen, teils aber auch schon völlig atrophiert. Kapillaren treten nun deutlicher zu Tage. Auch die äußere Körnerschicht ist schon von ersten Degenerationserscheinungen gezeichnet: neben unveränderten Abschnitten äußert sich der begonnene Verlust an Neuronen in verschieden hohen Zellkernsäulen und diskretem Schichtdickenverlust. An einer Stelle mit überproportional hohem Neuronenverlust ist die Schichtdicke sogar auf nur wenige Zellkernlagen geschrumpft. An Tag 58 p.i. ist die geringgradige entzündliche Infiltration der Retina weiterhin von Bestand. Die Degenerationen sind leicht vorangeschritten: die äußere plexiforme und beide Körnerschichten haben weiterhin etwas an Substanz verloren, wobei die äußere kaum noch unverändert anzutreffen ist, und die innere erste geringgradige Schichtdickenverluste aufweist. An Tag 76 p.i. sind nur noch wenige Entzündungszellen vorhanden. Die äußere plexiforme Schicht ist nun größtenteils verschwunden. Der Neuronenverlust ist vorangeschritten, was sich besonders in sehr unterschiedlich hohen Zellkernsäulen in der äußeren Körnerschicht äußert. An Tag 89 p.i. sind weitere Veränderungen lediglich in der Photorezeptorenschicht erkennbar, wo es neben nur leichter Atrophie auch zur beinahe vollständigen Degeneration gekommen ist. An Tag 110 p.i. ist die äußere plexiforme Schicht vollständig verschwunden. Auch in der Photorezeptorenschicht ist die Atrophie soweit fortgeschritten, daß das Pigmentepithel größtenteils direkt der äußeren Körnerschicht anliegt. Diese hat durch andauernden Neuronenverlust in einem solchem Umfang Substanz verloren, daß sie zu einem hohen Anteil völlig fehlt oder nur noch aus einem einschichtigen Zellkernband besteht. Durchweg besteht die maximale Schichtdicke aus nur noch wenigen Zellkernen. Die innere Körnerschicht ist ebenfalls von Neuronendegenerationen betroffen, weswegen auch sie an Schichtstärke verloren hat. Die Veränderungen treten vermehrt in der Peripherie der Retina

auf, wo zudem die Ganglienzellschicht erste Auflösungserscheinungen zeigt. Verstreute Entzündungszellen sind auch zu diesem Zeitpunkt noch zu finden.

Zehn Monate p.i. ist es streckenweise zu einer völligen Degeneration gekommen, was zu einer beinahe vollständigen Auflösung der Retina geführt hat. Nur teilweise sind noch Rudimente der inneren Körner-, plexiformen und Ganglienzellschicht erhalten. 14 Monate p.i. sind kaum noch weitere Veränderungen zu beobachten.

5.1.3.8 OX-52-behandelte, erwachsen infizierte Tiere

Bis Tag 27 p.i. sind keine degenerativen Veränderungen aufgetreten. Teils tauchen vereinzelt Entzündungszellen in der Ganglienzellschicht auf, teils sind keine inflammatorischen Anzeichen in der H.E.-Färbung erkennbar.

An Tag 30 p.i. sind erste Vakuolen in der äußeren plexiformen Schicht neben sonst unbetreffener Retina zu finden. An Tag 58 p.i. ist eine schwache entzündliche Infiltration mit wenigen kleinen perivaskulären Infiltraten in der Ganglienzellschicht erkennbar. Auch in der Photorezeptorenschicht sind einzelne Entzündungszellen aufgetaucht. Schwache Degenerationserscheinungen sind sichtbar: die äußere plexiforme Schicht ist abschnittsweise in noch weitgehend unveränderter Form existent, aber ebenso gibt es Abschnitte, in denen es zu Schichtdickenreduktion oder Vakuolenbildung bis hin zu vollständigem Verlust gekommen ist. Die angrenzende äußere Körnerschicht hat in manchen Bereichen Neurone verloren, was zu den unterschiedlich hohen Zellkernsäulen geführt hat. Es sind teilweise vermehrt Kapillaren zwischen beiden Körnerschichten zu beobachten. Darüber hinaus sind abschnittsweise leichte Veränderungen der Photorezeptorenschicht wie Disorganisation und Verlust der Außensegmente aufgetreten. Die anderen Schichten weisen keine Veränderungen auf.

Nach neun Monaten p.i. sind keine Entzündungszellen erkennbar. Fortgeschrittene Atrophie hat zu einem vollständigen Verlust der Photorezeptoren-, äußeren Körner- und äußeren plexiformen Schicht und zu einem partiellen Verlust der inneren Körner- und Ganglienzellschicht geführt. Die Retina ist daher abschnittsweise fast vollständig aufgelöst und besteht in den restlichen Anteilen nur noch aus den drei zum

Glaskörper hin gelegenen Schichten, der Ganglienzell-, inneren plexiformen und inneren Körnerschicht.

Parallele Untersuchungen an einem klinisch gesunden, sieben Monate alten OX-8-behandelten Tier, in welches Zellen der nicht zytopathogenen CD4+ T-Zelllinie P205 transferiert worden sind und welches keine immunpathologische Erkrankung aufwies, zeigten ähnlich wie beim Gehirn (Planz et al., 1995) die Präsenz weniger Entzündungszellen in der Retina, jedoch eine lokal auftretende völlige Atrophie neben Rudimenten von Körnerzellen und innerer plexiformer Schicht.

5.2 Immunhistochemische Untersuchungen

Tier	d.p.i.	Behandlung	CD8	CD4	TNF	TNF Glask.	ED3	MHC I	MHC II	Deg.	Klinik
18-113	21	CSA	0	0	0,1	0	0,75	1,5	0	0	0
18-114	28	CSA	0	0	0	0	0,5	1,75	0	0	0
18-1	90	CSA	0,25	0,1	0,5	1	0,75	2	1,5	1	0
18-127	154	CSA	0	0,1	0,75	0	1	1,75	0,25	1,25	0
18-3	180	CSA	0,1	0,1	1,75	0	1	2,25	1	0,75	0,5
18-4	510	CSA	0	0,25	3	3	1,5	1,5	1,25	2,25	0,5
18-5	510	CSA	0	0,1	1,75	1,5	1,5	1	1,5	2,5	0,5
2-122	24	CY	0	0	0,5	0,5		1	0,5	0	0
22-69	24	CY	0	0	0,25	0,5		1,5	0	0	0
22-121	37	CY	0,75	1	1	0,5		1,5	1,75	0	0
22-9	45	CY	0,5	0,5	1,5	1		1,75	1,5	0	0,5
22-3	90	CY	0,25	0,5	3	3		2,25	2,25	1	0,5
18-31	30	CY (40d)			0	0	0,25			0,25	0
18-43	30	CY (40d)			0	0	0,75				
18-30	30	CY (40d)	0	0	0	0	0,25	1,5	0	0	0
18-38	60	CY (40d)	0	0	0	0	1,25	1,75	0	0,25	0
18-20	90	CY (40d)	0	0	1,5	1,5	0,5	1	0,25	2	0
18-21	120	CY (40d)	0	0	1,5	1,5	0,5	1,25	0,25	2,25	0
18-22	178	CY (40d)	0,1	0,1	2	1,5	1,25	1,75	1,5	2,5	0
22-10	16		0,1	0	0,5	0,1	0,1	0,75	0,1	0	2
2-107	18		0,5	0,75	1,75	0,25	0,1	2,25	2	0	3
22-87	21		2,5	1,25	2,25	0,5	2,75	3	3	0,25	
22-88	21		2,5	1	1,75	0		3	3	0,25	
21-11	28		2,5	1,5	2,25	1	1,75	3	3	0,5	1,5
18-8	120		1,5	2,5	2,25	3	0,75	2,5	2,5	2	1,25

Tier	d.p.i.	Behandlung	CD8	CD4	TNF	TNF Glask.	ED3	MHC I	MHC II	Deg.	Klinik
18-163	28	NB	0	0	0,1	0	0	0,75	0	0	0
18-142	42	NB	0	0,1	0,75	0,1	1,5	1,5	0,25	0	0
18-143	42	NB	0	0,25	1,25	1,5	1,5	2	1	0	0
18-145	84	NB	0	0	0,1	0	1	0,75	0,1	0	0
18-144	84	NB	0	0,1	0,5	0	1	0,75	0,25	0	0
NB1	360	NB	0	0	0,1	0,25	0,75	0,75	0	0,75	
NB2	360	NB	0	0	0,75	0,25	0,75	1,25	0,1	1	0
NB3	420	NB	0	0,1	1,25	0,5	0,5	1	0,25	1,25	0
3-202	540	NB	0	0	0,5	0,1	0,1	0,5	0	2	
3-207	540	NB	0	0	0,5	0,5	0,1	0,5	0	1,5	
22-25	75	OX-52	1,5	2,5	3	3	2,25	2,75	3	1,5	0,5
22-32	75	OX-8	1	1,25	3	3	2	2,75	3	2	0,5
22-36	75	OX-8	1,25	2,5	3	3		2,75		2,75	0,5
22-31	195	OX-8	0,25	1,25	3	3	0,75	2,25	2,5	2,5	0,5

CY (40d): Mehrfachgabe Cyclophosphamid

5.2.1 Immunmarker

5.2.1.1 Adult BDV-infizierte, immunkompetente Tiere

5.2.1.1.1 Bo-18 / 38/15H7-Antikörper (Anti-BDV-Antigen)

An Tag 16 p.i. sind wenige Neuronen der inneren Körnerschicht - und ebenso ein einzelnes Neuron der Ganglienzellschicht - in ersten peripheren Bereichen positiv gefärbt. Zwei Tage später reicht in den verschiedenen Abschnitten der Retina der prozentuale Anteil markierter Neuronen in der inneren Körnerschicht von null bis ca. 90 %; auch manche Zellen der beiden anderen Neuronenschichten sind positiv, wobei deren Anzahl verhältnismäßig gering ausfällt. An Tag 21 und 22 p.i. ist die Färbung in der gesamten Retina sehr deutlich ausgeprägt; der Prozentsatz AK-positiver Zellen in der inneren Körnerschicht liegt durchweg bei über 80 bis 90 %, während die beiden anderen Neuronenschichten – mehr die Ganglienzell-, weniger die äußere Körnerschicht - im prozentualen Anteil positiv markierter Zellen noch deutlich gegenüber der mittleren Neuronenschicht abfallen. Dabei ist in der äußeren Körnerschicht immer eine ganze Gruppe von Zellen positiv. In diesen Abschnitten erstrecken sich solche positive Markierungen häufig bis in die Photorezeptorenschicht. Der Glaskörper zeigt zu diesem Zeitpunkt eine leichte, die plexiformen Schichten größtenteils eine deutliche diffuse Grundfärbung. Bis Tag 28 p.i. hat sich an diesem Färbemuster nichts geändert. In der Phase nach der akuten Entzün-

dungsreaktion vier Monate p.i. sind manche Abschnitte negativ, in anderen einzelne Zellen der inneren Körnerschicht und in wenigen Abschnitten größere und kleinere Zellgruppen positiv; nur in direkter lokaler Beziehung zu solchen Gruppen der inneren Körnerschicht findet man auch vereinzelt kleine, AK-positive Zellgruppen in den Resten der degenerierten äußeren Körnerschicht, während die Ganglienzellschicht bis auf einzelne Zellen weitestgehend negativ ist. Weder der Glaskörper, noch die plexiformen Schichten zeigen zum Ende des Untersuchungszeitraumes noch einen positiven Grundton.

5.2.1.1.2 OX-38 (Anti-CD4-Antikörper):

Während die Färbung an Tag 16 p.i. noch negativ ist, gibt es an Tag 18 p.i. in der Ganglienzellschicht erste kleine perivaskuläre Infiltrate mit CD4+ Zellen. Neben diesen kleinen Infiltraten losgelöst von diesen findet man nur wenige solcher Zellen in einer der inneren Schichten zwischen Ganglienzell- und äußerer plexiformer Schicht. Dagegen beinhaltet der Glaskörper eine deutliche Anzahl von OX-38-positiven Zellen, die morphologisch Makrophagen entsprechen und zum größeren Anteil in direkter Nachbarschaft zur Ganglienzellschicht liegen oder ihr direkt angelagert sind. Bis Tag 21 p.i. ist die Anzahl und Größe positiver perivaskulärer Infiltrate in der Ganglienzellschicht angestiegen. Die meisten markierten Zellen sind Bestandteil der Infiltrate oder in deren unmittelbaren Umgebung (Bild 3). Einzelne positive Zellen finden sich in der inneren Körnerschicht, nur ganz vereinzelt welche in den restlichen Retinaschichten einschließlich der Photorezeptorenschicht. Im Glaskörper gibt es viele Zellen, jedoch nur ca. 20 % sind OX-38-positiv. Sehr kleine positive Infiltrate sind an Tag 24 p.i. auch in der inneren Körnerschicht zu verzeichnen. Bis Tag 28 p.i. bleibt das Färbungsmuster fast unverändert. Nach vier Monaten gibt es in der Ganglienzellschicht und in den benachbarten Resten der inneren plexiformen Schicht sehr viele CD4+ Zellen, sowohl parenchymal als auch innerhalb von selten auftretenden Infiltraten, dagegen wenige in den noch existierenden degenerierten Anteilen der inneren Körner- und der Photorezeptorenschicht. Der Glaskörper beherbergt sehr viele Zellen, von denen ein deutlicher Anteil (ca. 30 %) OX-38-positiv ist. Fast alle diese Zellen entsprechen morphologisch Makrophagen, von denen ein großer Teil in direkter oder indirekter Nachbarschaft zur Retina liegt (Abb. 1, 2).

5.2.1.1.3 OX-8 (Anti-CD8-Antikörper)

An Tag 16 p.i. findet man im Zentrum sowohl in der Nervenfasern-/Ganglienzellschicht, als auch in der inneren plexiformen und inneren Körnerschicht in sehr geringer Anzahl schwach OX-8-positive Zellen. Zwei Tage später sind in der Ganglienzellschicht, in der inneren Körnerschicht, aber auch in der inneren plexiformen Schicht einzelne CD8+ zu finden, in der Ganglienzellschicht davon teils welche als Bestandteil erster kleiner perivaskulärer Infiltrate. Die Anzahl positiv markierter Zellen nimmt im weiteren Verlauf bis Tag 21 p.i. weiter zu. Diese kommen sowohl in Infiltraten häufiger in der Ganglienzellschicht als in der inneren Körnerschicht, als auch – losgelöst von Infiltraten - parenchymal vermehrt in den inneren drei Schichten vor (Bild 4). Die äußeren drei Retinaschichten weisen ebenfalls positiv markierte, jedoch zahlenmäßig deutlich weniger Einzelzellen auf. Im Glaskörper ist ein geringer Anteil der dortigen Zellen OX-8-positiv, wobei der überwiegende Teil morphologisch Makrophagen entspricht, ein geringer Anteil Lymphozyten. Sie liegen zum größeren Teil eher in der Nähe der Retina als weiter zentral im Glaskörper. Bis Tag 28 p.i. treten wenige Veränderungen auf: lediglich die Anzahl der Infiltrate mit positiven Zellen ist in der inneren Körnerschicht gegenüber der Ganglienzellschicht größer geworden. Nach vier Monaten findet man positive Zellen sowohl innerhalb von wenigen noch existierenden Infiltraten, als auch weiterhin in deutlicher Anzahl parenchymal mehr in der Ganglienzellschicht und in den benachbarten Resten der inneren plexiformen Schicht als in der inneren Körnerschicht einschließlich angrenzender Bereiche der stark degenerierten äußeren Körnerschicht (Bild 8). Einzelne kommen weiterhin in Abschnitten mit licht-mikroskopisch kaum veränderter Photorezeptorenschicht vor. Im Glaskörper ist die Situation bezüglich OX-8-positiver Zellen unverändert (Abb. 1, 2).

5.2.1.1.4 OX-18 (Anti-MHC-I-Antikörper)

An Tag 16 p.i. ist die Retina weitgehend negativ. Lediglich in manchen Abschnitten ist eine minimale Grundfärbung im Bereich der inneren Körnerschicht, die etwas in die beiden benachbarten plexiformen Schichten ausstrahlt, erkennbar; daneben

heben sich in erster Linie die größeren Gefäße der Nervenfasern- und Ganglienzellschicht im Zentrum der Retina durch einen diffusen Grundton ab. In deren Umgebung liegen kleine, markierte Gefäße in der inneren Körnerschicht, während positive Gefäße der äußeren plexiformen Schicht in der Peripherie zu finden sind. Vereinzelt exprimieren Zellen MHC-I in den großen, zentral gelegenen Gefäßen, darüber hinaus in den inneren Retinaschichten bis einschließlich innerer Körnerschicht, dagegen in der Peripherie im Grenzbereich innere Körner-/äußere plexiforme Schicht, wobei keine direkte nachbarschaftliche Beziehung zu Gefäßen erkennbar ist. Vereinzelt findet man auch MHC-I-exprimierende Zellen – morphologisch Makrophagen entsprechend - im Glaskörper – sowohl direkt der Retina angelagert, als auch weiter zentral gelegen. An Tag 18 p.i. ist die Färbung deutlich stärker ausgeprägt: es gibt positive Infiltrate in der Ganglienzellschicht, jedoch - zwar in Größe der Zellansammlungen in deutlich geringerem Ausmaße - auch in der inneren Körner- und der äußeren plexiformen Schicht. Neben den Infiltraten kommen eher in den inneren Schichten der Retina, von der Ganglienzell- bis zur äußeren plexiformen Schicht, viele parenchymal auftretende markierte Zellen vor. Einzelne findet man in der äußeren Körner- und der Photorezeptorenschicht, während der Glaskörper eine deutlich angestiegene Anzahl von MHC-I-exprimierenden Zellen beherbergt – wobei diese morphologisch Makrophagen zu sein scheinen. Eine teils etwas deutlichere diffuse Grundfärbung erstreckt sich entsprechend dem Verteilungsmuster der parenchymal auftretenden AK-positiven Zellen über die inneren Retinaschichten, nur in manchen Arealen auch bis in die äußere Körnerschicht hinein. Im Zeitraum bis Tag 21 p.i. ist die Färbung noch deutlicher ausgeprägt: eine leicht gestiegene Anzahl MHC-I-exprimierender Einzelzellen findet sich auch in der Photorezeptorenschicht, zahlreiche in allen anderen Retinaschichten einschließlich der äußeren Körnerschicht. Auch Anzahl und Größe der positiven Infiltrate in der Ganglienzellschicht, aber auch im Bereich des zweiten Neurons – und hier zum Teil in direkter Nachbarschaft zu den Infiltraten in der Ganglienzellschicht - haben zugenommen (Bild 5). Die diffuse Grundfärbung ist stärker geworden und umfaßt auch vollständig die äußere Körnerschicht. Der Glaskörper weist eine außerordentlich große Zahl von MHC-I-exprimierenden Zellen zumeist in der Nähe der Retina auf, von denen der weitaus größere Anteil morphologisch Makrophagen, vereinzelt welche Lymphozyten entsprechen. An Tag 28 p.i. ist die Situation unverändert. Auch nach vier Monaten sind zum großen Teil alle noch vorhandenen Schichten deutlich diffus positiv mit

vielen MHC-I-exprimierenden Zellen; übriggebliebene positive Infiltrate findet man in der Ganglienzellschicht und im Bereich des zweiten Neurons. Der Glaskörper ist gekennzeichnet von einer weiterhin hohen Zahl an Zellen: positiv markierte, morphologisch Makrophagen entsprechende Zellen liegen größtenteils in der Nähe der Retina oder ihr direkt angelagert (Bild 9), viele morphologisch makrophagen-differente Zellen sind dort zu finden, als auch weiter zum Zentrum des Glaskörpers hin. Letztere exprimieren teils deutlich, teils nur schwach und vereinzelt gar nicht MHC-I (Abb. 1, 2).

5.2.1.1.5 OX-6 (Anti-MHC-II-Antikörper)

An Tag 16 p.i. sind die Präparate größtenteils negativ, lediglich vereinzelt im zentralen Bereich der Retina, wo die Nervenfaserschicht deutlich ausgeprägt ist, gibt es in derselben perivaskulär gelegen, zusätzlich in deren Umgebung über die Ganglienzellschicht hinaus bis in die innere plexiforme Schicht hineinreichend einzelne MHC-II-exprimierende Zellen. Im Glaskörper findet man nur wenige Zellen, von denen ein Teil sehr schwach MHC-II exprimiert. Deren Morphologie entspricht Makrophagen. Zwei Tage später findet man die meisten positiven Infiltrate in der Ganglienzellschicht, weniger und kleinere in der inneren Körner- und in der äußeren plexiformen Schicht; neben den Infiltraten kommt eine hohe Anzahl von markierten Zellen in allen Retinaschichten vor, die meisten in der inneren plexiformen, einzelne auch in der Photorezeptorenschicht. Im Glaskörper findet man eine erhebliche Anzahl von Zellen, die alle MHC-II exprimieren, zumeist morphologisch Makrophagen entsprechen und sowohl weiter zentral, als auch im Bereich der Retina liegen. Im Zeitraum vom Tag 21 p.i. bis Tag 28 p.i. fällt die Färbung stärker aus: es sind sowohl viele große positive Infiltrate in der Ganglienzell- und der inneren Körnerschicht, kleinere positive Zellansammlungen in der äußeren Körnerschicht, als auch viele parenchymale, positiv gefärbte Einzelzellen in allen inneren Retinaschichten bis einschließlich der äußeren plexiformen zu finden. Der größere Teil der MHC-II-exprimierenden Zellen gehört zu den Infiltraten. In der äußeren Körner- und der Photorezeptorenschicht fällt die Anzahl positiver Einzelzellen geringer aus. Dagegen befinden sich im Glaskörper sehr viele Zellen, die zum überwiegenden Teil MHC-II exprimieren und weiterhin sowohl weiter zentral, als auch in Nachbarschaft zur Retina liegen. Auch nach vier Monaten gibt es in der Ganglienzellschicht positive

Infiltrate; weniger und kleinere MHC-II-exprimierende Zellgruppen im Bereich des zweiten Neurons. In manchen Abschnitten findet man in der gesamten Retina einschließlich der Photorezeptorenschicht, jedoch kaum in der stark degenerierten äußeren Körnerschicht eine erhebliche Anzahl MHC-II-exprimierender Zellen (Bild 10). Im Glaskörper entspricht die Reaktion derjenigen mit dem MHC-I-Antikörper (Abb. 1, 2).

5.2.1.1.6 Anti-B-Zell-Antikörper (OX-33)

In wenigen Präparaten sind in verschwindend geringer Anzahl innerhalb der inneren beiden Neuronenschichten angefärbte Zellen 21, 24 und 120 Tage p.i. vorhanden. Vier Monate p.i. sind in Bezug auf alle sich im Glaskörper befindlichen Zellen mit einem Anteil von bis zu ca. 30 % positiv markierte Zellen im Glaskörper zu finden. Diese liegen sowohl weiter zentral als auch peripher in der Nähe der Retina. Die restlichen Präparate sind negativ.

5.2.1.1.7 ED3 (Anti-Makrophagen/Mikroglia-Antikörper)

An Tag 16 p.i. sind die Zellen aller Schichten bis auf wenige positiv markierte, zum Teil perivaskulär gelegene Einzelzellen in der Ganglienzellschicht negativ. In zentralen Bereichen ist in der Nervenfaserschicht das Vorkommen ED3-positiver Zellen stärker ausgeprägt. Im Glaskörper gibt es ebenfalls einzelne ED3-positive, morphologisch Makrophagen entsprechende Zellen, die in der Nähe der Retina oder ihr direkt angelagert zu finden sind. 18 Tage p.i. gibt es bereits deutlich mehr positive Zellen; deren Frequenz in der Ganglienzellschicht entspricht in etwa derjenigen der am stärksten betroffenen Anteile der Nervenfaserschicht im Präparat von Tag 16 p.i.. Darüberhinaus ist eine Konzentration ED3-positiver Zellen im Bereich von Gefäßen und besonders erster kleiner, perivaskulärer Infiltrate zu erkennen. Einzelne markierte Zellen liegen in der inneren plexiformen Schicht, nur selten welche in der inneren Körnerschicht. Vervielfacht hat sich die Anzahl der morphologisch unveränderten ED3-positiven Zellen in Glaskörper, wobei diese im gesamten Glaskörper von zentraleren bis zu peripheren Anteilen einschließlich in direktem Kontakt zur Retina zu finden sind. An Tag 21 p.i. fällt die Markierung wesentlich stärker aus: in der inneren plexiformen Schicht – weniger in den Nachbarschichten - gibt es viele

positive Einzelzellen, wobei sich diese zum großen Teil in der Umgebung von Infiltraten konzentrieren. Diese Zellkonzentrationen reichen von der Ganglienzellschicht bis in die weitere Umgebung einschließlich äußerer plexiformer Schicht, wobei deren Zelldichte gegenüber den lymphozytären Infiltraten deutlich geringer ausfällt (Bild 6). Schwerpunktmäßig in solchen Arealen weisen die äußere Körner- und die Photorezeptorenschicht vereinzelt markierte Zellen auf. Demgegenüber hat die Anzahl von Zellen im Glaskörper nochmals sehr stark zugenommen, von denen ca. 60 % ED3-positiv sind. Der Hauptanteil der Zellen liegt weiter peripher in der Nähe der Retina. Vier Monate p.i. fällt die Anzahl und Verbreitung positiver Zellen bei weitem geringer aus: eine hohe Anzahl von Zellen befindet sich im Glaskörper, von denen jedoch nur ca. 10–20 % positiv markiert sind. Diese entsprechen morphologisch weiterhin Makrophagen, während die negativen Zellen makrophagendifferent zu sein scheinen. Sie liegen sowohl weiter zentral als auch in direktem Kontakt zur Retina. In der Retina beschränkt sich das Vorkommen der in ihrer Anzahl drastisch reduzierten ED3-positiven Zellen auf die Ganglienzellschicht und, falls sichtbar, auf die Nervenfaserschicht. Nur eine geringgradige Konzentration von markierten Zellen verzeichnen Gefäße oder noch übriggebliebene Infiltrate, wobei die Zellen hier innerhalb der lymphozytären Ansammlung zu finden sind (Abb. 1, 2).

5.2.1.1.8 Anti-TNF α -Antikörper

An Tag 16 p.i. sind erste einzelne Zellen am Außenrand der inneren Körnerschicht sowohl zentral als auch in der Peripherie größtenteils leicht positiv markiert; weitere TNF-exprimierende Zellen gibt es nur im Zentrum der Retina in der Umgebung von Gefäßen der Nervenfaserschicht, wobei sie von der Nervenfaserschicht bis in die innere Körnerschicht hinein zu finden sind; die Gefäße zeigen auch eine diffuse Färbung, die vom Lumen bis in die benachbarten Bereiche hineinreicht. Gleichartig nur lokal umschriebene leicht diffuse Farbmarkierungen gibt es in schon teilweise nicht geringem Ausmaß in der inneren Körnerschicht. 48 Stunden später ist eine sehr viel stärkere positive Färbung vorhanden. In der Ganglienzellschicht kommen erste perivaskuläre Infiltrate mit einer positiven Grundfärbung vor; kleinere diffus positive Zellansammlungen gibt es in etwas geringerer Anzahl auch am Außenrand der inneren Körnerschicht in die äußere plexiforme Schicht hineinreichend, als auch in deutlich geringerem Ausmaß in der äußeren Körnerschicht, wobei jedoch zumeist ein

lokaler Zusammenhang zu positiven Arealen der inneren Körnerschicht besteht. In manchen Abschnitten werden positive Reaktionen in der äußeren plexiformen Schicht durch Gefäße oder Gefäßbestandteile verursacht. Deutlich TNF-positive Einzelzellen findet man vereinzelt im Grenzbereich der inneren Körner- zur äußeren plexiformen Schicht, noch seltener in der Ganglienzellschicht. Der Glaskörper weist einen geringgradigen Grundton auf, während die in diesen eingewanderten Zellen selber negativ bleiben. An Tag 21 p.i. ist die Tönung des Glaskörpers kaum bemerkbar stärker geworden und von den inzwischen vielen dort eingewanderten Zellen sind nur sehr wenige (ca. 5 %) leicht positiv markiert. Die Retina weist nun ebenfalls einen leichten, diffusen Grundton auf. Anzahl und besonders Größe der positiven Infiltrate sind in der Ganglienzell- und der inneren Körnerschicht fortgeschritten. Stark zugenommen hat die Anzahl TNF-exprimierender Zellen, die zum Großteil Bestandteil der perivaskulären Infiltrate sind oder in deren Umgebung über alle Retinaschichten hinweg liegen (Bild 7). Von Infiltraten losgelöst findet man sie auch vereinzelt von der Ganglienzell- bis zur äußeren plexiformen Schicht. In ersten Abschnitten sind ganz schwach TNF-positive Neuronen in der Ganglienzell- und in der inneren Körnerschicht zu finden. An Tag 28 p.i. ist die Situation unverändert. Nach vier Monaten p.i. zeigen Glaskörper und die verbliebenen Retinastrukturen größtenteils eine deutliche Grundfärbung. Es gibt in manchen Abschnitten viele deutlich markierte Zellen, am ausgeprägtesten in der inneren Körnerschicht, weniger in der restlichen Retina; darüberhinaus sind in deutlicher Anzahl TNF-exprimierende Zellgruppen mit einem positiven Grundton im Übergang Nervenfaserschicht - N. opticus, in der Ganglienzell-, der inneren plexiformen - und inneren Körnerschicht zu sehen, sowie in geringerem Ausmaß auch in den Resten der äußeren Körnerschicht. In manchen Abschnitten erscheinen alle Zellen der inneren Körnerschicht, seltener viele der anderen Neuronenschichten teils kräftiger, teils schwächer markiert, während in sehr umschriebenen Bereichen die gesamte noch vorhandene Retina negativ ist. Die zahlenmäßig sehr stark vertretenen Zellen des Glaskörpers sind selbst nur relativ schwach oder gar nicht markiert, während deren Höfe sehr deutlich positiv reagieren (Bild 11; Abb. 1, 2).

5.2.1.2 Neugeborenen infizierte Tiere

5.2.1.2.1 Bo-18 / 38/15H7 (Anti-BDV-Antigen)

Zu allen Untersuchungszeitpunkten von vier Wochen bis 18 Monate p.i. sind alle Retinaschichten positiv. Dabei sind ca. 80 bis 90 % der Zellen der mittleren Neuro-nenschicht AK-positiv; die anderen beiden Neuronenschichten zeigen einen nicht ganz so hohen Anteil markierter Zellen. Der Glaskörper zeigt ebenfalls über den gesamten Zeitraum hinweg eine diffuse Grundfärbung (Bild 2).

5.2.1.2.2 OX-38 (Anti-CD4-Antikörper)

An Tag 28 p.i. ist die Färbung in der Retina weitgehend negativ, während im Glaskörper vereinzelt positiv markierte Zellen - morphologisch als Makrophagen einzustufen - ausschließlich am Übergang zur Ganglienzellschicht auftreten. An Tag 42 p.i. sind zusätzlich auch vereinzelt CD4+ Zellen in der Ganlienzellschicht oder auch in der inneren plexiformen und der Nervenfaserschicht zu finden, wobei diese eher in peripheren Bereichen der Retina auftauchen, während der Großteil der Retina negativ bleibt. Selten ist eine CD4+ Zelle in der inneren Körnerschicht zu sehen. Die Anzahl der positiv markierten Zellen im Glaskörper ist merkbar angestiegen, wobei diese weiterhin zum großen Teil direkt der Retina aufgelagert sind. An Tag 56 p.i. ist die Färbung stärker ausgeprägt und es ist primär nicht nur der periphere Bereich der Retina betroffen, sondern auch zentraler liegende Anteile; vereinzelt findet man CD4+ Zellen auch in der Photorezeptorenschicht. Ab Tag 56 p.i. sind die Retinaschichten negativ, auch der Glaskörper weist im späteren Verlauf wieder weniger CD4+ Zellen auf, die - weiterhin morphologisch Makrophagen zuzuordnen - meist der Ganglienzellschicht angelagert, selten innerhalb der Retina anzutreffen sind. Diese Situation bleibt bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes 18 Monate p.i. unverändert (Abb. 3).

5.2.1.2.3 OX-8 (Anti-CD8-Antikörper)

Im gesamten Zeitraum von 28 Tagen bis 18 Monate p.i. sind die Färbungen durchweg negativ bis auf 6, 8 und 12 Wochen p.i. in der inneren plexiformen oder inneren

Körnerschicht äußerst selten, nicht regelmäßig auftauchende positive Zellen (Bild 20, 21; Abb. 3).

5.2.1.2.4 OX-18 (Anti-MHC-I-Antikörper)

An Tag 28 p.i. ist in den meisten Abschnitten bereits eine dezente diffuse Grundfärbung in der Ganglienzellschicht und in den plexiformen Schichten zu sehen. Eine geringe Anzahl von Zellen ist ebenfalls in der Ganglienzell- und äußeren plexiformen Schicht auch im Übergang zur inneren Körnerschicht, deutlich weniger in den beiden dazwischenliegenden Schichten positiv, wobei alle diese Zellen in oder an Gefäßen liegen oder Bestandteil derselben sind (Bild 12) und in ihrer MHC-I-Expression schwächer als Entzündungszellen zu sein scheinen (vermutlich Perizyten). Zwei Wochen später 42 Tage p.i. finden sich im Glaskörper wenige angefärbte Zellen in peripheren Abschnitten in Nachbarschaft zum Ziliarkörper und zur Retina. Diese Zellen erscheinen morphologisch als Makrophagen. Desweiteren findet sich eine deutlich angestiegene Anzahl einzelner MHC-I-exprimierender Zellen in allen Schichten der Retina außer der Photorezeptorenschicht; hierbei hebt sich bezüglich deren Anzahl die innere Körner- und in Teilen auch die innere plexiforme Schicht von den anderen Schichten ab. Eine Betonung der Gefäße durch markierte Perizyten gibt es besonders in der inneren plexiformen Schicht; in der Ganglienzellschicht im zentralen Abschnitt der Retina zeigt ein großes Gefäß ebenfalls ein positives Lumen mit positiven Zellen. Eine Ansammlung positiver Zellen zeigt der Übergang von der Nervenfaserschicht zum N. opticus. Alle Schichten von der Nervenfaser- bis zur äußeren plexiformen Schicht zeigen eine dezente, jedoch deutliche Grundfärbung. Weitere zwei Wochen später 56 Tage p.i. ist die Anzahl markierter Zellen in den Retinaschichten weiter angestiegen, wobei einzelne nun auch in der Rezeptorenschicht auftauchen. Auch die Markierungsintensität hat deutlich zugenommen, was sowohl die MHC-I-exprimierenden Zellen als auch den Grundton betrifft. Diesen erkennt man nun schwach auch in der äußeren Körnerschicht; die innere Körnerschicht weist Zellgruppen mit deutlicher MHC-I-Expression, die teils bis in die äußere plexiforme Schicht hineinreicht, auf. Knapp drei Monate p.i. gibt es bevorzugt in der inneren Körnerschicht nur noch wenige deutlich MHC-I-exprimierende Zellen und auch morphologisch Makrophagen Entsprechende im Glaskörper – diese zum Teil der Retina direkt angelagert; positive Zellgruppen kommen fast gar nicht mehr vor,

und der positive Grundfarbton ist teils verschwunden, teils noch schwach von der Ganglienzell- bis zur äußeren plexiformen Schicht ausgeprägt. 12 und 14 Monate p.i. ist die Situation ähnlich: es gibt kaum deutlich MHC-I-exprimierende Zellen, nur einzelne in den inneren Retinaschichten bis in die innere Körnerschicht hinein – eine einzelne auch in der Photorezeptorenschicht; weiterhin gibt es negative Abschnitte neben solchen, in denen lokal noch ein recht deutlicher Grundton sich fast über die gesamte Retina ausbreitend vorhanden ist. Im Glaskörper gibt es vereinzelt morphologisch Makrophagen entsprechende, MHC-I-exprimierende Zellen meist direkt am Übergang zur Retina oder in nur geringem Abstand zu derselben. Gegen Ende des Untersuchungszeitraumes 18 Monate p.i. sind in der Retina so gut wie keine deutlich MHC-I-exprimierende Zellen zu finden; parallel ist auch der prozentuale Anteil der Retina mit diffusem Grundton als auch dessen Intensität deutlich zurückgegangen. Dagegen entspricht die Situation im Glaskörper weiterhin derselben zwölf und 16 Monate p.i. (Abb. 3).

5.2.1.2.5 OX-6 (Anti-MHC-II-Antikörper)

Vier Wochen p.i. ist die Färbung negativ. Sechs Wochen p.i. sind sehr wenige Zellen in der inneren plexiformen und der Photorezeptorenschicht positiv markiert, wobei diese nur in der Peripherie im Bereich des Ziliarkörpers zu finden sind. Beim anderen Tier gibt es keine Gewichtung auf die Peripherie der Retina, sondern eine relativ gleichmäßige Verteilung. Zusätzlich weist die innere Körnerschicht fast durchgängig eine deutliche Anzahl MHC-II-exprimierender Zellen auf. Acht Wochen p.i. ist die Situation ähnlich; jedoch sind MHC-II-exprimierende Zellen auch in der Ganglienzellschicht zu finden. Zwölf Wochen p.i. sind nur einzelne positive Zellen in der Ganglien- und der benachbarten inneren plexiformen Schicht zu finden. Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten sind die Färbungen größtenteils negativ bis auf ganz vereinzelt vorkommende markierte Zellen eher in den inneren Retinaschichten (Abb. 3).

5.2.1.2.6 OX-33 (Anti-B-Zell-Antikörper)

Alle Färbungen sechs und zwölf Wochen, 12, 14 und 18 Monate p.i. sind negativ.

5.2.1.2.7 ED3 (Anti-Makrophagen/Mikroglia-Antikörper)

Vier Wochen p.i. ist die Retina negativ, lediglich ganz vereinzelt markierte Zellen, die morphologisch Makrophagen entsprechen, findet man im Glaskörper der Ganglienzellschicht angelagert. Sechs Wochen p.i. hat sich deren Anzahl deutlich erhöht, wobei diese weiter im Glaskörper verteilt zu finden sind und nicht nur in direkter Nachbarschaft zur Retina. In der Ganglienzell- und inneren plexiformen Schicht kommt ebenfalls eine deutliche Anzahl angefärbter Zellen vor, während die Häufigkeit derselben in der zweiten Neuronen- und in der äußeren plexiformen Schicht auffallend geringer ausfällt. Die meisten der ED3-positiven Zellen haben eine lokale Beziehung zu den Gefäßen in der Nervenfaserschicht und der Ganglienzellschicht, teils auch in der inneren plexiformen Schicht; besonders deutlich zu sehen ist dies im Bereich des N. opticus mit den sich verzweigenden Gefäßen. Acht Wochen p.i. hat sich die Anzahl markierter Zellen in der Ganglienzellschicht deutlich erhöht, etwas weniger stark im Glaskörper; die ED3-positiven Zellfortsätze bilden in fast der gesamten Ganglienzellschicht ein Geflecht, deren Ausläufer teils in der inneren plexiformen, weniger oft auch bis in die innere Körnerschicht hinein infiltrieren. Zwölf Wochen p.i. ist das Geflecht AK-positiver Zellfortsätze wieder in deutlich geringerem Maße ausgeprägt, parallel mit einer verringerten Anzahl positiver Zellen in der Ganglienzellschicht, als auch im Glaskörper. Die restlichen Retinaschichten sind bis auf wenige positive Zellausläufer in der inneren plexiformen Schicht weitgehend negativ. Zwölf und 14 Monate p.i. ist die Situation kaum verändert; in diesen Schnitten fällt ein vermehrtes Vorkommen ED3-positiver Zellen im Zentrum der Retina gegenüber peripheren Anteilen auf. Die dort deutlich ausgeprägte Nervenfaserschicht beherbergt einzeln vorkommende ED3-positive Zellen; darüberhinaus gibt es weiterhin eine Affinität zu Gefäßen, die aufbaubedingt im Zentrum größer und deutlicher sind als in der Peripherie. In der inneren Körnerschicht war bei mehreren Schnitten lediglich eine einzelne ED3-positive Zelle zu finden (Bild 15). Auch der Glaskörper ist weitgehend zellfrei. Manche Abschnitte der Retina sind völlig negativ, wobei hier keine lokale Häufung auffällig wäre. 18 Monate p.i. scheint der Anteil negativer Abschnitte zugenommen zu haben; vereinzelt findet man ED3-positive Zellen in der Ganglienzellschicht oder in direkter Nachbarschaft zu derselben im Glaskörper (Abb. 3).

5.2.1.2.8 Anti-TNF- α -Antikörper:

An Tag 28 p.i. ist die Färbung weitestgehend negativ; lediglich eine einzelne Zelle in der inneren Körnerschicht in der Peripherie der Retina ist akzentuiert markiert, während in der restlichen Retina Gefäßlumina in der Ganglienzellschicht und sehr umschriebene Stellen im Bereich der inneren Körnerschicht im Übergang zur inneren plexiformen, in der Ganglienzell- und äußeren plexiformen Schicht zu finden sind, in deren Ausdehnung Zellen liegen, die jedoch selber unmarkiert geblieben sind. 42 Tage p.i. gibt es kleine umschriebene positive Markierungen zumeist in der äußeren plexiformen Schicht, deutlich weniger in den anderen Schichten von der Ganglienzell- bis einschließlich innerer Körnerschicht. Häufig sind diese Markierungen an Gefäßen; deutlich TNF-positive Zellen sind nicht zu finden. Bei einem andere Tier gibt es dagegen deutlich TNF-positive Zellen zumeist in der inneren plexiformen Schicht mit einer relativ großflächigen Markierung ähnlich einem Hof, weitere Zellen in geringerem Umfang in der Nervenfasern- und der inneren Körnerschicht. Sechs Wochen später sind umschriebene Teile der Retina negativ, während in anderen wenige und kleine, schwach positiv markierte Gruppen von Zellen zumeist in der inneren Körner-, reduziert in der äußeren Körner- und am seltensten in der Ganglienzellschicht zu finden sind. Weiterhin ist eine positive Markierung von Gefäßen sowohl in der Ganglienzell-, als auch in der inneren plexiformen Schicht auffällig. Selten findet man einzelne TNF-positive Zellen in der inneren Körnerschicht. Ein Jahr p.i. ist bei einem Tier ein großer Teil der Retina negativ, in den anderen Abschnitten ist die innere Körnerschicht überwiegend schwach, nur an sehr wenigen Stellen – und dort dann auch die äußere Körner- und Teile der Photorezeptorenschicht – deutlich positiv markiert. Ganglienzell- und innere plexiforme Schicht sind bis auf ganz vereinzelte sehr umschriebene positive Markierungen weitgehend negativ. Hierbei handelt es sich in der Ganglienzellschicht meist um Gefäßlumina (Bild 14), in der inneren plexiformen Schicht einmal um eine Zelle. Beim anderen Tier ist die Färbung stärker ausgefallen: kaum ein Abschnitt ist völlig negativ, zumeist ist bis auf die Photorezeptorenschicht die gesamte Retina diffus positiv. Neben den Zellen der beiden Körnerschichten sind auch streckenweise die Zellen der Ganglienzellschicht in einem schwachen Ton markiert. Darüberhinaus findet man solche auch vereinzelt in der Photorezeptorenschicht und deutlich TNF-positive Zellen in sehr geringer Anzahl in einer der drei inneren Retinaschichten. Auch in diesem Präparat heben sich die Gefäße ab. 14 Monate p.i. ist die Situation ähnlich, nur in manchen

Abschnitten ist die Färbung noch etwas deutlicher ausgeprägt, sowohl was den Intensitätsgrad der Färbung besonders im Bereich der Körnerschichten, als auch die Anzahl deutlich TNF-positiver Zellen oder Zellgruppen in den inneren Retinaschichten betrifft. Zum Abschluß des Untersuchungszeitraumes 18 Monate p.i. sind viele Zellen beider Körnerschichten überwiegend leicht, wenige deutlicher TNF-positiv markiert, während in der Ganglienzellschicht der Anteil derselben wesentlich geringer ausfällt. In anderen, stärker degenerierten, peripher liegenden Retinaabschnitten sind nur wenige Zellen positiv markiert (Abb. 3).

5.2.1.3 CSA-behandelte, adult infizierte Tiere

5.2.1.3.1 OX-38 (Anti-CD4-Antikörper)

An den Tagen 21 und 28 p.i. sind in keiner Retinaschicht positiv markierte Zellen zu finden. Nur der Glaskörper beinhaltet sehr wenige angefärbte Zellen, die fast ausschließlich im Grenzbereich Retina - Glaskörper zu finden und die morphologisch als Makrophagen einzustufen sind. Drei Monate p.i. ist deren Anzahl, wie während des gesamten Untersuchungszeitraumes, auf weiterhin niedrigem Niveau; äquivalent ist die Retina zum weitaus größten Teil negativ geblieben, bis auf ganz vereinzelt vorkommende, in ihrer Anzahl fast zu vernachlässigende CD4+ Zellen. Ca. fünf und sechs Monate p.i. ist die Situation unverändert: neben dem fast zu 100 % negativen Teil der Retina findet man unverändert nur ganz vereinzelt diese CD4+ Zellen in der inneren plexiformen Schicht, seltener auch in der Schicht des ersten oder zweiten Neurons. Gegen Ende des Untersuchungszeitraumes ist die Zahl der CD4+ Zellen lediglich in einem nur begrenzten Abschnitt und im N. opticus am Übergang zur Nervenfaserschicht leicht erhöht, während die Zahl der CD4+ Zellen im Glaskörper nur bei einem Tier geringgradig höher ist (Abb. 4).

5.2.1.3.2 OX-8 (Anti-CD8-Antikörper)

An den Tagen 21 und 28 p.i. sind in der Retina keine positiv markierten Zellen vorhanden. Drei Monate p.i. sind neben rein negativen Abschnitten lediglich vereinzelt CD8+ Zellen in den Schichten vom zweiten bis zum dritten Neuron zu finden, wobei eine stärkere Gewichtung im Bereich der inneren Körnerschicht bemerkbar ist. Zwei Wochen später fallen fast keine positiven Zellen mehr auf; letzte

CD8+ Zellen findet man in der Ganglienzellschicht peripher gelegen unweit des Ziliarkörpers. Im weiteren Verlauf bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes bleiben die Retinaschichten negativ bis auf ganz wenige CD8+ Zellen sechs Monate p.i.. Im Gegensatz zur Retina findet man jedoch zum Ende des Untersuchungszeitraumes 17 Monate p.i. in einem Tier wenige CD8+ Zellen im N. opticus und beim anderen Tier im Glaskörper, wobei deren Morphologie ebenfalls eher auf Makrophagen hindeutet (Abb. 4).

5.2.1.3.3 OX-18 (Anti-MHC-I-Antikörper)

An Tag 21 p.i. gibt es eine nicht hohe Anzahl von positiv markierten Zellen im Glaskörper, die sowohl der Ganglienzellschicht direkt aufgelagert, als auch weiter im Zentrum des Glaskörpers liegen. Morphologisch entsprechen diese Zellen Makrophagen. Der weitaus größte Anteil beider plexiformen Schichten ist leicht diffus positiv, während die innere Körnerschicht nur teilweise einen positiven Grundfarbton aufweist. Von der Ganglienzell- bis zur äußeren plexiformen Schicht heben sich die Gefäße der Retina vom Grundfarbton her positiv ab; deutlich MHC-I-exprimierende Zellen kommen am häufigsten in der äußeren plexiformen Schicht vor, während deren Anzahl in der äußeren Körnerschicht am Übergang zur inneren plexiformen Schicht, in der inneren plexiformen Schicht selbst und in der Ganglienzellschicht - und hier auch im Lumen größerer Gefäße – niedriger ausfällt. Eine Woche später ist die Situation kaum verändert, lediglich der positive Grundton in den plexiformen Schichten ist durchgehend sichtbar und die MHC-I-exprimierenden Zellen des Glaskörpers befinden sich nunmehr in unmittelbarer Nähe zur Retina oder ihr direkt angelagert. Nach drei Monaten p.i. weist auch die innere Körnerschicht einen leichten Grundton auf, während sich sonst kaum eine Veränderung eingestellt hat, bis auf vereinzelte MHC-I-exprimierende Zellen in der äußeren Körner- und der Photorezeptorenschicht. Ca. fünf Monate p.i. ist der positive Grundton in manchen Abschnitten außer im Bereich der inneren Körnerschicht verschwunden, während in den restlichen Anteilen teils eine sehr kräftige, diffuse Grundmarkierung der inneren Schichten auffällig und auch die äußere Körnerschicht teils leicht positiv gefärbt unterlegt ist. Die Anzahl deutlich MHC-I-exprimierender Zellen scheint zurückgegangen zu sein; diese sind jedoch weiterhin bis in die Photorezeptorenschicht zu finden. Das Tier sechs Monate p.i. erscheint ähnlich dem Tier drei Monate p.i.; nur

die äußere Körnerschicht ist in Teilen mit positiver Grundmarkierung unterlegt. Im Glaskörper ist die Situation bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes 17 Monate p.i. weitgehend unverändert. Zu diesem Zeitpunkt ist in manchen Abschnitten sowohl die Anzahl deutlich MHC-I-exprimierender Zellen in den noch vorhandenen Restschichten von Ganglienzell- über innerer plexiformer Schicht zu den Resten der Körnerschichten, als auch der diffuse Grundton erheblich reduziert, wohingegen andere Teile der Retina jedoch weiterhin bezüglich beider Kriterien relativ deutlich positiv geblieben sind (Bild 16). Innerhalb dieser Bandbreite bewegen sich verschiedene Abschnitte der Retina von mäßig stark bis schwach MHC-I-positiv. Der N. opticus zeigt eine stark ausgeprägte Färbung bezüglich Intensität und Anzahl der Zellen (Abb. 4).

5.2.1.3.4 OX-6 (Anti-MHC-II-Antikörper)

21 und 28 Tage p.i. sind die Färbungen negativ. Nach drei Monaten p.i. ist eine deutliche Anzahl MHC-II-exprimierender Zellen in der Retina von der Ganglienzellschicht bis zur äußeren plexiformen Schicht zu finden. In der Photorezeptorenschicht fällt deren Anzahl geringer aus, während man in der äußeren Körnerschicht nur vereinzelt MHC-II-exprimierende Zellen findet. Der Glaskörper zeigt wenige, morphologisch Makrophagen entsprechende Zellen, die sich meist in Nachbarschaft zur Retina befinden. Fünf Monate p.i. ist die Retina eines Tieres fast völlig negativ bis auf einzelne MHC-II-exprimierende Zellen in der Photorezeptorenschicht. Beim Tier sechs Monate p.i. befindet sich die Mehrheit der nicht zahlreich vorhandenen MHC-II-exprimierenden Zellen in der inneren und äußeren plexiformen und der Photorezeptorenschicht, vereinzelt welche in der inneren Körner- oder Ganglienzellschicht. Am Ende des Untersuchungszeitraumes gibt es sowohl Retinaabschnitte, die fast völlig negativ sind, als auch Teile, in denen eine deutliche Anzahl von MHC-II-exprimierenden Zellen vom Glaskörper über Ganglienzell- und innerer plexiformer Schicht bis zu den Resten der beiden Körnerschichten zu finden sind (Bild 17). In der Ganglienzell- und auch einmal in der inneren Körnerschicht – sieht man darüber hinaus einzelne kleine MHC-II-exprimierende Zellgruppen. Der N. opticus ist von einigen positiv markierten Zellen infiltriert (Abb. 4).

5.2.1.3.5 ED3 (Anti-Makrophagen/Mikroglia-Antikörper)

An Tag 21 p.i. weist der Glaskörper nur wenige ED3-positive Zellen auf, die – morphologisch Makrophagen entsprechend – in direkter Nachbarschaft zur Retina liegen. In derselben findet man in mäßiger Anzahl ED3-positive Zellen in der Nervenfaserschicht – falls diese zu sehen ist - , in der Ganglienzell- und der inneren plexiformen Schicht (Bild 13), nur im Ausnahmefall auch innerhalb der inneren Körner- oder der äußeren plexiformen Schicht. Gefäße – besonders deutlich innerhalb der Nervenfaser- oder Ganglienzellschicht – zeigen durchweg perivaskulär ED3-positive Zellen. Eine Woche später ist die Situation ähnlich, bis auf den Zustand, daß viele der ED3-positiven Zellen der inneren plexiformen Schicht sich an der Grenze oder im Grenzbereich bzw. manche schon in der inneren Körnerschicht befinden und dagegen die Ganglienzellschicht in manchen Abschnitten deutlich weniger betroffen ist. Nach drei Monaten p.i. ist die Anzahl und Verteilung von positiven Zellen im Glaskörper weitgehend unverändert. Auch in der Retina selber hat sich die Menge dort auffindbarer, ED3-markierter Zellen kaum verändert; lediglich der Hauptanteil der Zellen ist in der Ganglienzellschicht und eingeschränkt in der inneren plexiformen Schicht zu finden, während in den anderen Retinaschichten nur ganz vereinzelt positive Zellen vorkommen. Gefäße bleiben weiterhin von ED3-positiven Zellen umgeben. Fünf und sechs Monate p.i. zeigen die Präparate wenig Veränderungen: lediglich die Anzahl der Zellen in der Ganglienzellschicht ist etwas erhöht, was den Schwerpunkt dieser Zellen bezüglich der Verteilung innerhalb der Retina bekräftigt. Zum Ende des Untersuchungszeitraumes 17 Monate p.i. wird der Schwerpunkt noch deutlicher durch eine teils weiter gesteigerte Anzahl in der Ganglienzellschicht; auffällig sind die positiv markierten, axon-/dendritenartigen Zellausläufer, die von der Ganglienzell- bis in die degenerierten Körnerschichten hineinreichen (Bild 18); dabei scheint eine weiter fortgeschrittene Degeneration der Körnerschichten mit einer erhöhten Anzahl von Zellen mit solchen Fortsätzen zu korrespondieren (Abb. 4).

5.2.1.3.6 Anti-TNF- α -Antikörper

An Tag 21 und 28 p.i. ist die komplette Retina negativ. Lediglich die im Präparat von Tag 21 p.i. sichtbaren Gefäße der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht zeigen eine im Lumen positive, diffuse Färbung; damit einhergehend findet man auch in der äußeren plexiformen Schicht ganz vereinzelt kleine markierte Spots, deren Zusammenhang mit Gefäßen im Präparat nicht eindeutig ersichtlich ist. Drei Monate p.i. sind Teile der Retina fast vollständig negativ mit lediglich einzelnen schwach TNF-positiven Spots in der äußeren plexiformen Schicht, während in anderen Abschnitten die Zellen der inneren Körnerschicht in einem Prozentsatz von bis zu 50 % und mehr schwach TNF-positiv reagieren; in diesen Anteilen spiegelt auch die äußere Körnerschicht in kleinen Rahmen von meist nur wenigen Zellen eine positive Reaktion wider. Deutlich TNF-exprimierende Zellen sind weitestgehend nicht zu finden. Der Glaskörper zeigt lediglich eine ganz schwach positive Reaktion. Beim Tier fünf Monate p.i. ist der Glaskörper kaum positiv. Auch in der inneren Körnerschicht reagieren in begrenzten Abschnitten die Zellen schwach positiv, während jedoch regelmäßig in der äußeren plexiformen Schicht umschriebene TNF-positive Reaktionen zu finden sind, die sich häufiger mit in die innere Körner-, selten in den Bereich der äußeren Körnerschicht hinein ausdehnen. In diesen Bereichen reagieren die Zellen der inneren Körnerschicht auch eher schwach positiv. Die Gefäße der Ganglienzellschicht zeigen weiterhin diffus positive Lumina bei sonst negativer Reaktion der Ganglienzellschicht. Sechs Monate p.i. hat das Präparat ein ähnlich positives Schema, während der Grad der positiven Reaktion höher liegt: die äußere plexiforme Schicht ist dementsprechend äquivalent betroffen wie fünf Monate p.i., jedoch die Ausdehnung besonders in die innere Körner-, weniger jedoch in die äußere Körnerschicht hinein ist deutlich stärker ausgeprägt – entsprechend höher auch der verhältnismäßige Anteil schwach TNF-positiver Zellen in der inneren Körnerschicht. Vereinzelt findet man etwas deutlicher positive Zellen in der Photorezeptoren- und der inneren plexiformen Schicht (kleine, dunkle Kerne), ganz schwach markierte Neuronen in der Ganglienzellschicht (helle, große Kerne). Zum Schluß des Untersuchungszeitraumes 17 Monate p.i. fällt ein unterschiedlich deutlicher, diffuser Grundton sowohl im Glaskörper, als auch der gesamten Retina auf. In manchen Abschnitten sind bis zu 100 % der Zellen der inneren Körnerschicht

– und wo überhaupt noch Reste der äußeren Körnerschicht vorhanden auch deren Zellen – (Bild 19), in der Ganglienzellschicht ca. 50-60 % der dort ansässigen Zellen deutlich TNF-positiv. Die Zellen im Glaskörper – morphologisch Makrophagen entsprechend – reagieren kaum positiv, während sie jedoch von einem positiven Hof umgeben scheinen. Der N. opticus zeigt sowohl einen sehr deutlichen Grundton – besonders perivaskulär – , als auch mit über 50 % einen hohen Prozentsatz TNF-positiver Zellen (Abb. 4).

5.2.1.4 CY-behandelte, adult infizierte Tiere

5.2.1.4.1 Tiere mit täglicher Gabe von CY über 30 bis 40 Tage

5.2.1.4.1.1 Bo-18 / 38/15H7-Antikörper (Anti-BDV-Antigen)

Ein, zwei, drei und vier Monate p.i. sind der Glaskörper sowie die Retinaschichten vom ersten bis zum dritten Neuron durchgehend in einem deutlichen Grundton eingefärbt. 30 und 60 Tage p.i. sind ca. 80 bis 90 % der Zellen der mittleren Neuronenschicht AK-positiv. Die anderen Neuronenschichten zeigen einen nicht ganz so hohen Anteil markierter Zellen; in der Ganglienzellschicht reagiert in den zentralen - in Vergleich zu peripheren - Anteilen der Retina ein höherer Prozentsatz an Neuronen auf den BDV-Antikörper. Drei und vier Monate p.i. haben sich die verschiedenen Retinaabschnitte bezüglich des Anteils der positiven Zellen in der Ganglienzellschicht einander angeglichen, insgesamt jedoch ist diese weiterhin weniger stark betroffen als die beiden Körnerschichten.

5.2.1.4.1.2 OX-38 (Anti-CD4-Antikörper)

Bis einschließlich vier Monate p.i. bleibt die Retina negativ. Zwei Monate p.i. finden sich weiter zentral im Glaskörper gelegen erste schwach OX-38-positive Zellen, die morphologisch Makrophagen entsprechen. Deren Anzahl hat sich drei und vier Monate p.i. etwas erhöht, wobei Zellen nun auch näher zur Retina positioniert sind. Sechs Monate p.i. findet man im Glaskörper OX-38-positive Zellen auch in direkter Nachbarschaft zur Retina, während ihre Gesamtzahl unverändert scheint; lediglich sehr wenige positive Zellen tauchen in einer der auf drei Restschichten degenerierten Retina auf (Abb. 5).

5.2.1.4.1.3 OX-8 (Anti-CD8-Antikörper)

Die Färbungen in den ersten vier Monaten entsprechen weitgehend denen mit dem Anti-CD4-Antikörper; der Anteil positiv gefärbter Zellen im Glaskörper nach drei und vier Monaten p.i. ist jedoch geringer. Fast alle positiven Zellen entsprechen morphologisch Makrophagen. Zwei Monate p.i. gibt es jedoch keine OX-8-positiven Zellen. Sechs Monate p.i. findet man keine angefärbten Zellen im Glaskörper, nur sehr vereinzelt welche in einer der auf drei Restschichten degenerierten Retina (Abb. 5).

5.2.1.4.1.4 OX-18 (Anti-MHC-I-Antikörper)

Nach einem Monat p.i. zeigen in manchen Abschnitten alle Retinaschichten bis auf die Photorezeptorenschicht eine diffuse Grundfärbung, wobei diese in der inneren Körnerschicht teils deutlich stärker betont ist. In anderen Teilen der Retina sind die äußere Körner- und besonders die Ganglienzellschicht nur sehr schwach diffus positiv, teils sogar negativ. Eine stärkere Betonung fällt bei den Gefäßen besonders in der Ganglienzell- und der inneren plexiformen Schicht auf. Manche deutlich markierte Einzelzellen sind von der Ganglienzell- bis zur äußeren plexiformen Schicht zu finden, wobei der Schwerpunkt deutlich im Bereich des zweiten Neurons einschließlich benachbarter äußerer plexiformer Schicht liegt, während in der Ganglienzellschicht nur sehr vereinzelt MHC-I-exprimierende Zellen zu finden sind. Zumindest ein Teil gehört zu Gefäßen; besonders in der inneren Körner- und der äußeren plexiformen Schicht sind diese Gefäße lichtmikroskopisch nicht (eindeutig) zuzuordnen. Zwei Monate p.i. ist die partielle diffuse Grundfärbung, als auch die leichte Abstufung zwischen der inneren Körnerschicht und den anderen Schichten weiterhin erhalten. Zusätzlich findet man - jedoch nur selten - MHC-I-exprimierende Zellen in der Photorezeptorenschicht. Drei und vier Monate p.i. hat sich bis auf die im Bereich der Körnerschichten stark ausgeprägte Degeneration und einer damit einhergehenden geringgradig reduzierten Anzahl von MHC-I-exprimierenden Zellen kaum etwas verändert. Lediglich der diffuse Grundton erscheint vier Monate p.i. gleichmäßiger über die noch vorhandenen Retinaschichten verteilt, so daß eine Betonung der inneren Körnerschicht kaum noch auffällt. Nach einem halben Jahr ist die Anzahl der stark MHC-I-exprimierenden Zellen in den drei verbliebenen Retinaschichten deutlich angestiegen; typische Infiltrate sind nicht zu finden, eher stellenweise kleine, lockere Konglomerate von wenigen MHC-I-exprimierenden Zellen (Bild

22). Die Veränderungen im Glaskörper sind bereits beim Anti-CD4-Antikörper beschrieben. Nach immunhistochemischer Färbung mit OX-18-Antikörper werden alle in den Glaskörper eingewanderten Zellen positiv dargestellt. Einen Monat p.i. ist der Glaskörper größtenteils zellfrei. Nur sehr selten findet man - mit der Morphologie eines Makrophagen - eine MHC-I-exprimierende Zelle in direktem Kontakt zur Retina (Abb. 5).

5.2.1.4.1.5 OX-6 (Anti-MHC-II-Antikörper)

Ein und zwei Monate p.i. sind die Präparate negativ. Drei Monate p.i. findet man über den Glaskörper verteilt einschließlich in direktem Kontakt zur Retina eine mäßige Anzahl von Zellen, die nach ihrer Morphologie Makrophagen zu sein scheinen und fast zu 100 % OX-6-positiv sind. Vier Monate p.i. ist der Anteil MHC-II-exprimierender Zellen im Glaskörper bei etwa konstanter Gesamtzahl im Glaskörper befindlicher Zellen auf unter 10 % geschrumpft. In der Retina gibt es drei und vier Monate p.i. große Abschnitte, die vollständig negativ sind, jedoch auch solche in sehr viel kleinerem Umfang, in denen man einzelne, aber auch in kleineren Gruppen locker beieinanderliegende MHC-II-exprimierende Zellen in jeder der drei noch vorhandenen Retinaschichten von Ganglienzell- bis innerer Körnerschicht findet. Dabei scheint die Ganglienzellschicht jedoch etwas weniger betroffen zu sein als die anderen beiden Schichten. Sechs Monate p.i. erscheint im Glaskörper der Anteil MHC-II-exprimierender Zellen etwas erhöht. In der auf drei Restschichten reduzierten Retina sind negative Abschnitte nicht mehr zu finden. Über die gesamte Retina hinweg erstrecken sich nun MHC-II-exprimierende Zellen sowohl einzeln als auch in ganz aufgelockerten Verbänden von wenigen Zellen, wie sie drei und vier Monate p.i. nur lokal begrenzt zu finden sind. Eine stärkere Gewichtung einer der drei noch vorhandenen Retinaschichten ist zu diesem Untersuchungszeitpunkt nicht mehr feststellbar (Abb. 5).

5.2.1.4.1.6 OX-33 (Anti-B-Zell-Antikörper)

Ein, zwei, drei, vier und sechs Monate p.i. sind die Färbungen negativ.

5.2.1.4.1.7 ED3 (Anti-Makrophagen/Mikroglia-Antikörper)

30 Tage p.i. sind wenige ED3-positive Zellen von der Ganglienzell- bis zur äußeren plexiformen Schicht zu finden, wobei ein vermehrtes Auftreten in den inneren beiden Retinaschichten festzustellen ist. In Präparaten, in denen die Nervenfaserschicht sichtbar ist, treten auch in dieser einzelne ED3-positive Zellen auf. Darüberhinaus sind an Gefäßen positiv markierte Zelle die Regel. Der Glaskörper ist größtenteils zellfrei. Nur sehr selten ist eine ED3-positive Zelle im Glaskörper direkt der Retina angelagert zu sehen; deren Morphologie weist auf Makrophagen hin. Zwei Monate p.i. ist die Anzahl markierter Zellen besonders im Glaskörper und in der inneren plexiformen Schicht erhöht, weniger deutlich in den anderen Schichten; die in diesem Präparat sichtbare Nervenfaserschicht zeigt ebenfalls vornehmlich perivaskulär wenige ED3-positive Zellen. Deutlich verschieden zur Situation ein Monat p.i. ist die Verteilung der ED3-positiven Zellen im Glaskörper: Die Zellen liegen über den Glaskörper verteilt, weniger im Bereich der Retina. Drei und vier Monate p.i. ist die Anzahl ED3-positiver Zellen in der Retina deutlich zurückgegangen. Teils sind Abschnitte fast völlig negativ, in anderen reduziert sich das Vorkommen markierter Zellen auf die Ganglienzellschicht, wobei jedoch einige Zellen auf einem kurzen Stück – jedoch nie in Form eines Infiltrates – zu finden sind. Selten beherbergt die innere Körner- oder plexiforme Schicht eine ED3-positive Zelle. Im Glaskörper ist deren Anzahl etwas erhöht, wobei Zellen nun auch in direkter Nachbarschaft zur Retina positioniert sind. Nach sechs Monaten p.i. findet man in der gesamten Retina eine Konzentration ED3-positiver Zellen auf den Bereich der ehemaligen Ganglienzellschicht, wie es zwei und drei Monate vorher nur in Teilen der Retina beschrieben werden konnte. Dabei heben sich Gefäße und versprengte Gruppen von Körnerzellen, die im Verlauf der Degeneration nun im Bereich der ehemaligen Ganglienzellschicht zu finden sind, bezüglich der Infiltration mit markierten Zellen ab (Bild 23). In den beiden äußeren, stark degenerierten Restschichten gibt es selten positive Zellen, in wenigen Abschnitten der Retina sind jedoch ED3-positive Zellausläufer zu beobachten, die sich äußeren Schichten entgegenstrecken. Veränderungen im Glaskörper bezüglich der dortigen Zellen sind nicht festzustellen (Abb. 5).

5.2.1.4.1.8 *Anti-TNF- α -Antikörper*

Ein und zwei Monate p.i. fallen die Färbungen negativ aus. Drei und vier Monate p.i. gibt es nur zentral liegend kleine Retinaanteile, die weitestgehend negativ sind, während in der restlichen Retina ca. 90 % der Zellen in der übriggebliebenen inneren Körnerschicht, jedoch in der Ganglienzellschicht mit ca. 30 bis 50 % deutlich weniger Zellen positiv angefärbt sind. In der inneren Körnerschicht gibt es darüberhinaus manche sich in ihrer positiven Markierung markant abhebende, kleine Zellansammlungen und in der Ganglienzellschicht diffus positiv markierte Gefäße, von denen teils nur das Lumen positiv ist. In der inneren plexiformen Schicht findet man nur selten eine TNF-exprimierende Zelle. Der Glaskörper zeigt eine deutliche Grundfärbung, die sich bis sechs Monate p.i. nicht ändert. Fast alle der sich im Glaskörper befindlichen Zellen sind negativ, jedoch fällt bei allen ein leicht positiver Hof auf. Sechs Monate p.i. ist lediglich teilweise ein stärkerer diffuser Farbton der Retina zu erkennen, völlig negative Abschnitte sind nicht mehr vorhanden, sonst aber bleibt das Färbungsmuster unverändert (Bild 24; Abb. 5).

5.2.1.4.2 Tiere mit Einmalgabe von CY

5.2.1.4.2.1 *Bo-18 / 38/15H7-Antikörper (Anti-BDV-Antigen)*

Zu allen Untersuchungszeitpunkten 24, 37, 45 und 90 Tage p.i. sind der Glaskörper sowie die Retinaschichten vom ersten bis zum dritten Neuron durchgehend in einem deutlichen Grundton eingefärbt. Die Photorezeptorenschicht ist an Tag 24 p.i. nur in kleinen Bereichen am Übergang zur äußeren Körnerschicht positiv. Dabei sind ca. 80 bis 90 % der Zellen der mittleren Neuronenschicht AK-positiv; die anderen beiden Neuronenschichten zeigen einen scheinbar von Lage und Zeitpunkt abhängig hohen Anteil markierter Zellen: während in der äußeren Körnerschicht an Tag 24 p.i. bis ca. 50 % der Zellen positiv scheinen, erhöht sich der Prozentsatz mit längerer Experimentdauer (Bild 1). In zentral gelegenen Ganglienzellabschnitten wird schon an Tag 24 p.i. ein hoher Prozentsatz der Zellen positiv markiert, während in peripheren Anteilen sehr viel weniger positiv sind. Eine Nivellierung im Verlauf des Untersuchungszeitraumes ist nicht eindeutig erkennbar.

5.2.1.4.2.2 OX-38 (*Anti-CD4-Antikörper*)

An Tag 24 p.i. ist die Färbung negativ. Auch an Tag 37 p.i. weist die Retina überwiegend keine positive Markierung auf. In wenigen Abschnitten dagegen zeigen sich in der Ganglienzellschicht nur ein paar perivaskuläre Infiltrate mit reichlich CD4+ Zellen, die bis in die äußerste Retinaschicht versprengt zu finden sind. Isoliert auftretende, markierte Zellen gibt es in mäßiger Anzahl auch außerhalb von Infiltraten in Ganglienzell- und innerer plexiformer Schicht; in seiner ganzen Ausdehnung beinhaltet der Glaskörper - teils der Ganglienzellschicht direkt aufliegend - ebenfalls OX-38-positive Zellen, die morphologisch jedoch Makrophagen entsprechen. Ganz vereinzelt findet man in der inneren Körnerschicht CD4+ Zellen; in der äußeren Körner- und der Photorezeptorenschicht sind eingewanderte CD4+ Zellen nur sehr selten zu beobachten. 45 Tage p.i. sind die Infiltrate der Ganglienzellschicht seltener, kleiner und sehr viel aufgelockerter. Eine Gewichtung der CD4+ Zellen mehr auf die peripheren Bereiche der Retina ist auffällig. Photorezeptoren- und äußere Körnerschicht sind frei von CD4+ Zellen, nur wenige sind bis in die innere Körnerschicht hinein zu verfolgen. Auch zum Schluß des Untersuchungszeitraumes drei Monate p.i. ist ein großer Teil der Retina negativ. Nach dem Verschwinden der Infiltrate in der Ganglienzellschicht sind lediglich sehr wenige, lockere Konglomerate von ein paar CD4+ Zellen übriggeblieben, die jedoch bis in die Photorezeptorenschicht reichen können. Selten findet man einzelne CD4+ Zellen in einer der inneren Schichten zwischen Ganglienzell- und innerer Körnerschicht. Im Glaskörper hat sich der Schwerpunkt der OX-38-positiven Zellen nun in die Nähe der Retina verlagert, wo ein Teil der Zellen weiterhin in direktem Kontakt zur Ganglienzellschicht zu finden ist (Abb. 6).

5.2.1.4.2.3 OX-8 (*Anti-CD8-Antikörper*)

An Tag 24 p.i. ist die Färbung ebenfalls negativ. Auch an Tag 37 p.i. weist der bei weitem überwiegende Anteil der Retina keine CD8+ Zellen auf, während vereinzelt deutliche Infiltrate mit CD8+ Zellen in der Ganglienzellschicht vorkommen; meist gibt es in deren weiterer Umgebung auch wenige, einzeln auftretende CD8+ Zellen von der Ganglienzell- bis zur äußeren plexiformen Schicht. Nach eineinhalb Monaten p.i. gibt es lediglich wenige positiv markierte Zellen in der inneren Körnerschicht

einschließlich benachbarter äußerer plexiformer Schicht, wobei die Zellen gleichmäßiger über die Retina verteilt sind, so daß lange, zusammenhängende Abschnitte ohne OX-8-positive Zellen wie an Tag 37 p.i. kaum mehr zu finden sind. Vereinzelt liegen OX-8-positive Zellen in der Ganglienzell- oder der inneren plexiformen Schicht, nur sehr selten auch in der äußeren Körnerschicht. Nach drei Monaten p.i. sind nur sehr wenige CD8+ Zellen weiterhin eher in der inneren Körnerschicht, als in einer der beiden inneren Retinaschichten zu finden; eine einzelne Zelle ist jeweils in der äußeren Körner- und der Photorezeptorenschicht erkennbar (Abb. 6).

5.2.1.4.2.4 OX-18 (Anti-MHC-I-Antikörper)

24 Tage p.i. gibt es nur sehr umschriebene Retinaabschnitte, die völlig negativ sind. Die mittlere Neuronenschicht zeigt den stärksten und ausgedehntesten Grundton, während die anderen beiden Neuronenschichten sehr viel schwächer und in deutlich geringerem Umfang markiert sind. Die Grundfärbung ist in verschiedenen positiven Retinaabschnitten unterschiedlich stark ausgeprägt. Eine Betonung der Grundfarbe zeigen die Gefäße. Eine deutliche Anzahl MHC-I-exprimierende Einzelzellen findet man in der inneren Körnerschicht, als auch im Übergang zur äußeren plexiformen Schicht. Auffällig erscheint eine höhere Chromatindichte der MHC-I-exprimierenden Zellen gegenüber den andere Zellen der mittleren Neuronenschicht. Zahlenmäßig einen geringeren Anteil deutlich exprimierender Zellen gibt es in der inneren plexiformen, deutlich weniger in der Ganglienzellschicht, nur sehr selten welche in der äußeren Körner- oder der Photorezeptorenschicht. Viele dieser Zellen haben eine lokale Beziehung zu Gefäßen, was man auch in der Nervenfaserschicht beobachten kann. Eine geringe Anzahl morphologisch als Makrophagen erscheinender, MHC-I-exprimierender Zellen liegt im Glaskörper sowohl weiter zentral gelegen, als auch zum etwas größeren Teil im Bereich der Retina oder ihr direkt angelagert. 37 Tage p.i. ist der positive Grundton in wenigen Retinaabschnitten noch stärker ausgeprägt, so daß hier die anderen Retinaschichten sich in ihrer positiven Markierung der inneren Körnerschicht angeglichen haben. In den größeren Abschnitten entspricht die Grundfärbung derjenigen von Tag 24 p.i.. Bezüglich Anzahl und Verteilung MHC-I-exprimierender Zellen von Tag 24 bis 37 p.i. haben sich nur wenige Veränderungen ergeben: die Ganglienzellschicht weist knapp zwei Wochen später vereinzelt perivaskuläre Infiltrate mit einem großen Anteil deutlich markierter Zellen auf, als auch eine leicht gestiegene Anzahl einzeln vorkommender

MHC-I-exprimierender Zellen; in der inneren Körnerschicht und im Grenzbereich innere Körnerschicht - äußere plexiforme Schicht, selten in der inneren plexiformen Schicht finden sich kleinere Konglomerate von wenigen teils deutlich positiv markierten Zellen, wobei nun auch ein deutlicher Anteil von Zellen mit nicht so chromatindichten Kernen darunterfällt. Zuletzt ist die Anzahl stark exprimierender Zellen sehr deutlich im Glaskörper angestiegen und in manchen Abschnitten der äußeren Körnerschicht gibt es ebenfalls erste MHC-I-exprimierende Zellen. Selten ist in der Photorezeptorenschicht eine positive Zelle zu finden. Der Großteil der MHC-I-exprimierenden Zellen im Glaskörper, die morphologisch Makrophagen entsprechen, befindet sich in der Peripherie, teils in direktem Kontakt zur Retina. Bis zum Untersuchungszeitpunkt eine gute Woche später hat sich der leicht ansteigende Trend bezüglich Anzahl und Ausbreitung exprimierender Zellen noch geringgradig fortgesetzt: deutlich mehr positiv markierte Zellen findet man in der Photorezeptoren- und der äußeren Körnerschicht. Gänzlich negative Abschnitte sind kaum noch vorhanden. Eineinhalb und drei Monate p.i. erscheint die Verteilung der MHC-I-exprimierenden Zellen im Glaskörper wieder etwas ausgeglichener zwischen Peripherie und zentraler gelegenen Anteilen. Nach drei Monaten p.i. sind nur sehr vereinzelt Reste von Infiltraten in der Ganglienzell- und der inneren plexiformen Schicht, einmal ein großes Infiltrat, jedoch häufiger kleinere positive Zellgruppen in der inneren Körnerschicht zu sehen. Die Zahl deutlich MHC-I-exprimierender Zellen erscheint in manchen Abschnitten der inneren plexiformen - und in der Photorezeptorenschicht deutlicher erhöht, während sich sonst Anzahl und Ausbreitung markierter Zellen nur geringgradig weiter positiv entwickelt haben (Abb. 6).

5.2.1.4.2.5OX-6 (Anti-MHC-II-Antikörper)

An Tag 24 p.i. gibt es wenige positiv markierte Zellen mehr in der inneren plexiformen Schicht als in der Ganglienzellschicht. Die meisten gibt es in und um erste kleine Infiltrate der Ganglienzellschicht; die Nervenfaserschicht und der Übergang in den N. opticus zeigen im Bereich von Gefäßen ebenfalls einzelne MHC-II-exprimierende Zellen. Die bei weitem größten Retinaabschnitte sind jedoch negativ. Im Glaskörper gibt es nur sehr wenige MHC-II-exprimierende Zellen, die in ihrer Morphologie Makrophagen entsprechen. An Tag 37 p.i. gibt es in der Ganglienzellschicht wenige Infiltrate, von deren Zellen viele positiv markiert sind, und manche kleine positive Zellansammlungen in der inneren Körnerschicht; zusätzlich findet man

im Glaskörper - der größte Teil in direkter oder indirekter Nachbarschaft zur Retina - , in der inneren Körnerschicht einschließlich Grenzbereich zur äußeren plexiformen Schicht und in der inneren plexiformen Schicht eine deutliche Anzahl von Einzelzellen, dagegen nur wenige in der Ganglienzellschicht außerhalb der Infiltrate. In der äußeren Körner- und der Photorezeptorenschicht findet man ebenfalls nur sehr wenige markierte Zellen. Negative Retinaabschnitte sind überwiegend verschwunden, es sind jedoch stärker und schwächer betroffene Passagen zu finden. Ca. eine Woche später kommen seltener perivaskuläre Infiltrate mit positiv markierten Zellen in der Ganglienzellschicht vor; außerhalb von Infiltraten gibt es wenige MHC-II-exprimierende Einzelzellen in der Ganglienzell- oder Nervenfaserschicht, meist in direkter Beziehung zu Gefäßen. In der inneren Körnerschicht zeigen sich dagegen manch kleine positive Zellansammlungen, selten größere; die Schichten von der inneren plexiformen bis zur Photorezeptorenschicht sind etwas stärker und auch gleichmäßiger in den verschiedenen Abschnitten von MHC-II-exprimierenden Zellen infiltriert. Bezüglich des Glaskörpers erscheint die Situation sowohl eineinhalb als auch drei Monate p.i. weitgehend unverändert. Nach drei Monaten p.i. weisen alle Schichten eine große, deutlich angestiegene Anzahl positiv markierter Zellen auf, wobei der Schwerpunkt zu diesem Zeitpunkt bei den inneren Retinaschichten liegt. Kleine und weniger häufig größere Gruppen positiver Zellen findet man besonders in der inneren Körnerschicht oder auch im Grenzbereich zur inneren plexiformen Schicht, deutlich seltener in den anderen Retinaschichten einschließlich äußerer Körner- und Photorezeptorenschicht. Auch die Verteilung der MHC-II-exprimierenden Zellen über die gesamten Abschnitte der Retina ist gleichmäßiger, so daß keine negativen Bereiche mehr vorkommen. Perivaskuläre Infiltrate in der Ganglienzellschicht sind nicht mehr zu sehen (Abb. 6).

5.2.1.4.2.6 OX-33 (Anti-B-Zell-Antikörper)

Während des ganzen Untersuchungszeitraums sind lediglich zwei einzelne Zellen innerhalb eines sehr großen perivaskulären Infiltrates in der Ganglienzellschicht an Tag 37 p.i. positiv markiert. Alle anderen Präparate zeigen eine negative Färbung.

5.2.1.4.2.7 *Anti-TNF- α -Antikörper*

An Tag 24 p.i. scheint die Retina größtenteils negativ zu sein, ist jedoch in unterschiedlich großen Abständen regelmäßig von positiven Markierungen in der Umgebung einzelner Zellen vermehrt in der äußeren plexiformen Schicht und in benachbarten Grenzbereichen der äußeren Körnerschicht, weniger häufig in der äußeren Körnerschicht selber gekennzeichnet. Diese scheinen zum Teil einen lokalen Bezug zu Gefäßen zu haben. Ebenfalls Gefäße mit positivem Lumen und selten in das angrenzende Gewebe reichender diffuser Grundfärbung finden sich in der Ganglienzellschicht, weniger häufig in der Nervenfaserschicht und der inneren plexiformen Schicht. Selten gibt es kleine, diffuse positive Bereiche in der inneren plexiformen - und inneren Körnerschicht. TNF-Expression in der äußeren Körnerschicht ist fast gar nicht zu finden. Deutlich markierte Zellen sind nicht vorhanden; im Glaskörper ist nur eine sehr schwache Tönung erkennbar, während TNF-exprimierende Zellen nicht zu finden sind. 37 Tage p.i. ist die Färbung im Glaskörper etwas stärker. Auch in der Retina gibt es nur leichte Veränderungen: negative Retinaabschnitte sind nur noch lokal sehr begrenzt, die Bereiche der inneren Körnerschicht mit einer deutlichen Grundfärbung sind dagegen teils etwas ausgedehnter, wobei häufig eine lokale Nachbarschaft zu ebenfalls diffus markierten Gefäßen der Ganglienzellschicht auffällig ist. Kleine, deutlich diffus positive Bereiche kommen in der äußeren Körnerschicht nur wenig vor. Auch die nicht zahlreich vorhandenen perivaskulären Infiltrate der Ganglienzellschicht sind gleichsam positiv unterlegt, während deren Zellen nur sehr vereinzelt sich als kräftig markiert hervorheben. In manchen Abschnitten der Retina findet man ein sehr schwachen positiven Grundton in beiden Körnerschichten, der bis in die Innensegmente der Photorezeptorenschicht reicht. Eine gute Woche später finden sich zwar keine perivaskulären Infiltrate, weiterhin sind jedoch die Gefäße in der Ganglienzell- und Nervenfaserschicht oder auch selten in der inneren plexiformen Schicht positiv markiert. Die Ausdehnung der teils recht deutlich positiven Grundfärbung in der inneren Körnerschicht hat weiter zugenommen, eine schwache Tönung erstreckt sich über die gesamte innere Körnerschicht. Stark TNF-exprimierende Zellen findet man nur sehr selten im Bereich von Gefäßen, in der Ganglienzellschicht oder im Bereich des Übergangs von der Retina in den N. opticus; dagegen findet man in ersten Abschnitten der Retina sowohl in der Ganglienzell- als auch in der inneren Körnerschicht erste schwache TNF-exprimie-

rende Zellen. Die Tönung des Glaskörpers ist etwas kräftiger. Drei Monate p.i. zeigen alle Retinaschichten - nur Ganglienzell-, innere plexiforme und Photorezeptorenschicht etwas schwächer ausgeprägt - einen deutlichen positiven Grundton, den noch stärker ausgeprägt auch der Glaskörper aufweist. In der inneren und etwas geringgradiger in der äußeren Körnerschicht sind in manchen Retinaabschnitten bis zu 90–100 % der Zellen positiv, viele sehr kräftig positiv markiert, während in anderen Abschnitten meist zumindest 50 % der Zellen positiv sind. In der Ganglienzell- und inneren plexiformen Schicht gibt es nur vereinzelt Bereiche, in denen ein hoher Prozentsatz der Zellen angefärbt ist, meist liegt der Anteil derer eher bei 10-20 %. Die Zellen im Glaskörper sind negativ, während ein kräftigerer Hof sich vom allgemeinen Grundton abhebt (Abb. 6).

6 Diskussion

Die Borna Krankheit gilt als immunvermittelte entzündliche Erkrankung des ZNS. Hinweise auf die immunpathologische Eigenschaft ergaben sich zunächst aus der Tatsache, daß adult infizierte, durch Cyclophosphamid immunsupprimierte Tiere nicht erkrankten (Narayan et al., 1983a, b). Durch adoptiven Transfer von Milzzellen erkrankter Ratten auf immunsupprimierte BDV-infizierte Tiere konnte die Borna Krankheit ausgelöst werden (Narayan et al., 1983a).

Durch Immunsuppression adulter BDV-infizierter Ratten mit Cyclosporin A (Stitz et al., 1989), das eine stark inhibitorische Wirkung auf T-Zellen besitzt, sowie durch Infektionsexperimente an athymischen Nacktratten (Herzog et al., 1985), die ebenfalls erst nach passivem Transfer erkrankten, konnte nachgewiesen werden, daß die T-zellvermittelte Immunantwort bei der BD den entscheidenden Pathogenesemechanismus darstellt (Herzog et al., 1985; Stitz et al., 1989; Übersicht in Stitz et al., 1993). Daß die CSA-Behandlung von adult BDV-infizierten Ratten mit suboptimalen Dosen zu einer Entwicklung von Enzephalitis ohne Produktion anti-BDV-spezifischer Antikörper führt, dagegen jedoch die i.v. Gabe von BDV bei CSA-behandelten Ratten eine B-Zell-Antwort bei ausbleibender immunpathologischer Erkrankung induziert, läßt eine Beteiligung antiviraler Antikörper an der Pathogenese unwahrscheinlich erscheinen (Stitz et al., 1989).

Untersuchungen mit TGF- β 2 (Stitz et al., 1992), welches eine inhibierende Wirkung auf Differenzierung, Wachstum und Effektorfunktion insbesondere von CD8⁺ T-Zellen besitzt (Fontana et al., 1984; Kehrl et al., 1986a; 1986b; Fontana et al., 1989), und mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen alle T-Zellen oder gegen T-Zellsubpopulationen gerichtet waren (Stitz et al., 1992), ergaben erste Hinweise darauf, daß CD8⁺ T-Zellen an der Pathogenese der Borna Krankheit wesentlich beteiligt sein könnten, denn die Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen korrelierte mit dem Ausbleiben entzündlicher Veränderungen und in Folge dessen auch der Erkrankung.

In weiterführenden Untersuchungen konnten T-Zellen aus dem Gehirn BDV-infizierter Ratten isoliert und charakterisiert werden, wobei mit der Hilfe der Durchflußzyto-

metrie auch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten, deren funktionelle Charakterisierung eine MHC Klasse I-restringierte CD8⁺ zytotoxische Aktivität ergab. Diese klassischen zytotoxischen T-Zellen waren in der Lage, verschiedene BDV-infizierte, syngene Zielzellen, einschließlich der in-vivo relevanten Neuronen und Astrozyten, in-vitro zu zerstören (Planz et al., 1993). Immunhistologisch konnte gezeigt werden, daß CD8⁺ T-Zellen an den Orten der Neuronendegenerationen zu finden sind. Transferexperimente mit BDV-spezifischen, nicht-zytotoxischen CD4⁺ T-Zelllinien führten zum klinischen und pathologischen Bild der BD, wobei im Gehirn der Rezipienten neben CD4⁺ T-Zellen auch in erheblichem Maße - vor allem in Gehirnparenchym - CD8⁺ T-Zellen nachweisbar waren. Die Bedeutung der im Gehirn festgestellten CD8⁺ T-Zellen wurde deutlich, als nach adoptivem Transfer in Rezipienten, bei denen mittels monoklonaler Antikörper die CD8⁺ T-Zellen eliminiert oder funktionell blockiert waren, weder klinische Symptome, noch pathologische Veränderungen auftraten (Planz, 1993; Planz et al., 1995). Die Funktion von CD8⁺ T-Zellen konnte auch in anderer Hinsicht bestätigt werden: nach zweimaligem Transfer einer nicht-zytotoxischen CD4⁺ T-Zelllinie vor Infektion konnte festgestellt werden, daß die Tiere nicht erkrankten und zudem einige Zeit nach Infektion kein Virus mehr im Gehirn aufwiesen. Bei solchen T-Zellrezipienten gelang es, mit immunhistologischen Methoden sowie mit Hilfe der RT-PCR die Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen und auch wesentlich früher als in infizierten Kontrolltieren mRNA des Perforin nachzuweisen, welches als entscheidendes Effektormolekül bei der Zytolyse durch CD8⁺ T-Zellen gilt (Nöske et al., 1998). Bei adult BDV-infizierten Ratten konnte man Perforin mRNA zwischen Tag 13 und 25 p.i., CD8 mRNA ab Tag 11 p.i. demonstrieren.

Adoptiver Transfer von direkt aus dem Gehirn infizierter, akut symptomatischer Ratten isolierten Lymphozyten induzierte bei den Rezipienten schon an Tag 7 p.T. klinische Symptome, die histologisch zu diesem frühen Zeitpunkt bereits mit schweren degenerativen Veränderungen korrelierten. In den transferierten Zellen konnte eine erhebliche MHC Klasse I-restringierte Lyse festgestellt werden. Die durchflußzytometrische Analyse der Gehirnlymphozyten ergab einen stark erhöhten Anteil von CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellen wurden bei den Rezipienten vorwiegend im Gehirnparenchym, die CD4⁺ T-Zellen dagegen überwiegend perivaskulär gefunden. Die disseminierte, lymphozytäre Infiltration des

Parenchyms ging mit einer schweren morphologischen Veränderung einschließlich signifikanter Nekrosen von Neuronen einher (Sobbe et al., 1997).

Diese Untersuchungen zeigten, daß für die zytotoxischen Vorgänge im wesentlichen die Aktivität zytotoxischer MHC Klasse I-restringierter CD8⁺ T-Zellen verantwortlich ist, während CD4⁺ T-Zellen als Helferzellen für die zelluläre und die humorale Immunantwort fungieren (Stitz et al., 1995; Bilzer und Stitz, 1994).

Immunhistochemische Untersuchungen führten zu der Vermutung, daß auch der Mikroglia und Gehirnmakrophagen eine Bedeutung bei der Pathogenese der BD zukomme (Schwerdtfeger, 1994). Hier bedarf es noch der Abklärung durch weitere Experimente.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Folgen einer BDV-Infektion in der Retina immunkompetenter wie immuninkompetenter Ratten darzustellen. Die Retina soll hierbei als im Vergleich zum Hirngewebe übersichtlicheres Modell eines neuroektodermalen Zielgewebes dienen, da es in der Retina parallel zu den Veränderungen im Gehirn bei der BD ebenfalls zu Entzündungen und Atrophie kommt (Hirano et al., 1983; Narayan, 1983a, b; Kompter, 1987; Geiß, 1988).

Bei immuninkompetenten Tieren, seien es neugeborene infizierte oder mit Immunsuppressiva oder monoklonalen Antikörpern behandelte, bleiben sowohl im Gehirn als auch in der Retina zelluläre entzündliche Reaktionen aus (Narayan, 1983a, b ; Herzog et al., 1984; Stitz et al. 1989; Stitz, 1991; Stitz et al., 1992; Bilzer und Stitz, 1993). Die Tiere erschienen klinisch gesund, was zu bestätigen schien, daß es sich bei BDV um ein nicht-zytopathogenes Virus handelt, nachdem es schon früher aufgrund von in-vitro-Untersuchungen so eingestuft worden war (Herzog und Rott, 1980).

Im Gegensatz zu den in-vitro-Ergebnissen fanden sich jedoch in vivo bei immunkompromittierten BDV-infizierten Ratten in Abwesenheit von Entzündungsreaktionen häufig Hinweise auf Gewebsschäden:

1. Narayan et al. (1983b) hatten sowohl bei neugeborenen infizierten als auch immunsupprimierten Tieren degenerierte Neuronen des Gyrus dentatus gefunden, wobei nur bei mit Cyclophosphamid immunsupprimierten Tieren eine minimale Anzahl entzündlicher Zellen auftraten. In der Retina neugeborenen infizierter Ratten hatten sie den Verlust weniger Neuronen der inneren und äußeren Körnerschicht im sieben Monate währenden Untersuchungszeitraum beschrieben. Als Ursache für den Bereich des Gyrus dentatus vermuteten sie eine irreversible Schädigung der Neurone durch virale Replikation (Narayan et al., 1983b).
2. Die Infektion neugeborener Wistar-Ratten, welche nicht erkrankten, führte zu Veränderungen im Lernverhalten gegenüber Kontrolltieren, woraus man schloß, daß das BDV gewisse Veränderungen in höheren integrativen Gehirnzentren bewirkte (Dittrich et al., 1989).
3. Weitere Untersuchungen über abnorme Verhaltensweisen und physiologische Abweichungen bei neugeborenen infizierten Lewis-Ratten führten zu der Annahme, daß BDV einen größeren schädlichen Einfluß auf Funktionen hat, deren zugrundeliegende nervale Strukturen sich bei Viruspräsenz entwickeln, als auf solche, deren neurale Funktionen zum Zeitpunkt der Infektion bereits vollständig ausgeprägt sind (Bautista et al., 1994).
4. Im Einklang mit diesen abweichenden Verhaltensmustern wurde bei neugeborenen infizierten Ratten eine abnormale Entwicklung des Hippocampus gefunden: trotz Abwesenheit einer bei adult BDV-infizierten Ratten gefundenen, nekrotisierenden Enzephalitis wurde eine neuropathologische Störung des ZNS bei neugeborenen infizierten Ratten beobachtet. Nach unauffälligem Befund des Gyrus dentatus 21 Tage p.i kommt es zum Verlust der Neurone des Gyrus dentatus, wobei lediglich Astrozyten und Mikrogliaknötchen zurückbleiben. Diese Veränderungen konnten nur mit einer direkten, zytopathologischen Wirkung des BDV erklärt werden (Carbone et al., 1991a). In Anlehnung an andere Viren (Oldstone, 1990) wurde bezüglich der parallel festgestellten Entwicklung eines disorganisierten, hypoplastischen Kleinhirns vermutet, daß das BDV „luxury functions“ der Neurone und somit die normale Ausbildung interzellulärer Verbindungen und die Migration stö-

ren könnte (Carbone et al., 1991a). „Luxury functions“ sind solche Zellfunktionen, die wichtig für den Organismus jedoch nicht entscheidend für das Überleben der einzelnen Zelle sind (Southern and Oldstone, 1993).

5. Nach weiteren Untersuchungen zur abnormen Entwicklung des Kleinhirns mit Verlust der äußeren Körnerschicht sowie dünnerer innerer Körner- und Molekularschicht wurde die Hypothese einer Störung der „luxury functions“ präzisiert, in der diese eine Folge der BDV-Infektion der Purkinjezellen und Astrozyten sei, wodurch deren entscheidende Funktionen für Replikation, Reifung und/oder Migration der Körnerzellen gestört sei (Bautista et al., 1995).
6. Das mit der Zeit zunehmende Ausmaß von räumlichen Lernprozeß- und Gedächtnisdefiziten scheint aufgrund der zeitlich parallelen Entwicklung mit dem fortschreitenden Verlust der Neuronen des Gyrus dentatus – einhergehend mit einer steigenden Anzahl pyknotischer Neuronen - verknüpft zu sein. Bei ausbleibenden immunpathologischen Prozessen wurden zudem subtile Schäden in anderen Bereichen des Hippocampus einschließlich der Pyramidenzellschicht beschrieben. Die Frage, ob diese Veränderungen aufgrund direkter viraler Lyse oder durch verschiedene indirekte Faktoren, wie immunologische Vorgänge oder Zytokinfreisetzung, excitatorische Aminosäuren oder Streßhormone, entstehen, blieb offen (Rubin et al., 1999a).
7. Neuere Untersuchungen unterstützen die These einer Korrelation zwischen der Entwicklungsstufe des Gehirns zum Zeitpunkt der BDV-Infektion und spezifischen neuroanatomischen Folgen sowie Verhaltensveränderungen, da sich zeigte, daß solche Gehirnabschnitte, die sich zum Zeitpunkt der Infektion in einer Phase der postnatalen Reifung befinden, besonders anfällig für eine Unterbrechung der normalen Entwicklungsprozesse waren: ausgehend von neueren Untersuchungsergebnissen, daß die Neurogenese und die Neuronenmigration zum Gyrus dentatus der Ratte bis über ein Jahr nach der Geburt andauert (Palmer et al., 1997), entspricht es der formulierten These, daß sowohl bei neugeborenen, als auch bei an Tag 15 p.i. BDV-infizierten, jedoch durch CSA-Behandlung immunsupprimierten Ratten eine parallele Degeneration des Gyrus dentatus bei ausbleibenden ent-

zündlichen Veränderungen zu beobachten ist. Da auch die neuralen Strukturen, die verantwortlich sind für die Ausbildung des Salzgeschmacks, sich bis in die dritte und vierte Lebenswoche hinein entwickeln (Moe, 1986), mag auch die bei beiden Untersuchungsgruppen auffällige abnormale Vorliebe für Salzgeschmack die These unterstützen. Mit dieser stimmig war auch die Beobachtung, daß die Hypoplasie des Kleinhirns und die damit assoziierte spontane Hyperaktivität bei neugeborenen infizierten Tieren, jedoch nicht bei der anderen Untersuchungsgruppe gefunden wurde (Rubin et al., 1999b) - vor dem Hintergrund, daß die postnatale Entwicklung des Kleinhirns bei letzterer Gruppe weitestgehend abgeschlossen ist (Altman und Bayer, 1997).

8. Im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen am Kleinhirn fand man in jüngerer Vergangenheit bei sieben Monate alten, neugeborenen BDV-infizierten Ratten einen Verlust von ca. 75 % der Purkinjezellen gegenüber uninfizierten Kontrolltieren. Diese degenerativen Vorgänge laufen offensichtlich erst nach einer postnatalen Reifung der Purkinjezellen ab, wofür entweder ein direkter Effekt des BDV auf diese Zellen oder eine indirekt induzierte Immunantwort verantwortlich sein könnte (Eisenman et al., 1999), zumal bekannt ist, daß Purkinjezellen sensibel auf immunologische Vorgänge reagieren (Graus et al., 1988; Jaeckle et al., 1985; Rodriguez et al., 1988). Das Ausbleiben einer offensichtlichen Ataxie schien darauf hinzuweisen, daß der Verlust der Purkinjezellen nicht plötzlich, sondern allmählich über einen längeren Zeitraum stattfindet (Eisenman et al., 1999). Neuere Untersuchungen bestätigen den kontinuierlich fortschreitenden Verlust von Purkinjezellen beginnend vier Wochen p.i. (Hornig et al., 1999).
9. Die Bestimmung der mRNA-Expression für proinflammatorische Zytokine bei neugeborenen BDV-infizierten Ratten für den Untersuchungszeitraum von Tag 8 bis 135 p.i. ergab eine chronische Hochregulierung für Il-6, TNF- α , Il-1 α und -1 β im Hippocampus und Kleinhirn bei nur sehr geringer und vorübergehender Infiltration von Entzündungszellen. Das Auftreten einer reaktiven Astrozytose und einer starken, anhaltenden Mikrogliose führte zu der Annahme, daß diese ZNS-ansässigen Zellen zum überwiegenden Teil für die Zytokinexpression bei neugeborenen infizierten Ratten verantwortlich sind. Da eine veränderte Expression von Zytoki-

nen vielfältigste Auswirkungen hat, wäre es möglich, daß dies im Bereich des Hippocampus und des Kleinhirns mit zu den neuroanatomischen Abweichungen beitragen könnte, die man in neugeborenen infizierten Tieren bei ausbleibender Entzündungsreaktion beobachten kann (Sauder und de la Torre, 1999).

10. Parallele Untersuchungen an neugeborenen BDV-infizierten Ratten an den Tagen 7 und 28 p.i. ergaben eine Reihe von Veränderungen der Expression verschiedener Zytokine wie $IL-1\beta$, $TNF-\alpha$ und $TGF-\beta_1$, Zytokinrezeptorkomponenten und Neuropeptide in unterschiedlichen Gehirnregionen. Bei Ausbleiben einer signifikanten zellulären, entzündlichen Reaktion kam auch diese Arbeitsgruppe zu der Hypothese, daß diese Abweichungen und insbesondere die chronische Hochregulation der Zytokinproduktion relevant sein könnten für eine Kaskade von Ereignissen, die in einer diffusen Gliose, Gehirnläsionen und Gehirnatrophie resultiert. Welche Zellen für die Produktion der Zytokine verantwortlich sei, erfordere weitere Untersuchungen (Plata-Salaman et al., 1999).
11. Bestätigung fanden diese Ergebnisse in einer neueren Veröffentlichung, in der ein Anstieg der Genexpression von $IL-1\alpha$, -1β , $IL-6$ und $TNF-\alpha$ bei neugeborenen BDV-infizierten Ratten in der Mehrzahl der Gehirnregionen beginnend vier Wochen p.i. beschrieben wird, begleitet von einer aktivierten Mikroglia, reaktiven Astrozyten und einer nur vorübergehenden inflammatorischen Infiltration vorwiegend im Bereich des Cortex. Die zu beobachtenden degenerativen Prozesse scheinen vorwiegend Ergebnis einer Apoptose der Neuronen zu sein, worauf aufgrund des Nachweises von fragmentierter DNA und der gestiegenen Expression von proapoptotischen Genen (Fas, Caspase-1) bzw. verminderter mRNA-Level des antiapoptotischen $bcl-x$ geschlossen werden kann (Hornig et al., 1999).
12. Eine in-vitro-Zytotoxizität des Serums serologisch BDV-positiv, paralysierter Strauße wurde festgestellt. Ob die mögliche Ursache ein direkter Effekt des BDV oder zirkulierende zytotoxische Faktoren sind, die infolge nekrotischer Prozesse in Nervengewebe produziert werden - wie z.B. aktivierte proteolytische Enzyme

oder freie Radikale generierende Faktoren - ist Gegenstand weiterer Untersuchungen (Wormser et al., 1996).

In der nun vorliegenden Arbeit wurde die Histopathologie der Retina sowohl immunkompetenter als auch immuninkompetenter Lewis-Ratten nach experimenteller BDV-Infektion untersucht.

6.1 Adult BDV-infizierte, immunkompetente Tiere

Mit Tag 15 p.i. sind in ersten Neuronen der Ganglienzellschicht BDV-Protein und BDV-RNA per Immunhistochemie bzw. in-situ-Hybridisierung nachweisbar. In der Folge kommt es zur Infektionsausbreitung, die in der inneren Körnerschicht am stärksten ausgeprägt ist und alle Retinaschichten erfaßt. Vier Monate p.i. ist der Nachweis von BDV-Protein deutlich geringer ausgeprägt, wobei es neben negativen auch deutlich positive Retinaabschnitte gibt. Es ist zu beobachten, daß auch zu diesem späten Zeitpunkt in der mittleren Neuronenschicht der deutlich größte Anteil BDV-Protein nachweisbar ist. Dies unterstützt die Ergebnisse von Herzog und Kollegen (1984), die Virusreplikation zu verschiedenen späten Zeitpunkten bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes 242 p.i. in der Retina mittels immunhistochemischer Untersuchungen nachgewiesen haben - ohne dabei jedoch zu quantifizieren oder auf die Verteilung auf die Schichten näher einzugehen. In einer späteren Untersuchung an heterozygoten euthymischen Rowett-Ratten, die in einer ähnlichen Art und Weise wie immunkompetente Lewis-Ratten auf eine BDV-Infektion reagieren, fanden sie BDV-Antigen in Zellen der inneren und äußeren Körnerschicht 35 Tage p.i., wobei auch in dieser Untersuchung Virusreplikation bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes 100 Tage p.i. nachweisbar war (Herzog et al., 1985). Während zu Narayan und Kollegen eine Übereinstimmung bezüglich des ersten Auftretens von BDV in der Retina an Tag 15 p.i. besteht, konnten diese bei vielen Ratten zu späteren Zeitpunkten als 40 Tage p.i. keine Infektivität mehr feststellen (Narayan et al., 1983b). Zwar konnte auch Geiß eine deutliche Reduktion des Virustiter in der Retina bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes 59 Tage p.i. feststellen, nicht jedoch eine völlige Virusfreiheit (Geiß, 1988). In der Retina BDV-infizierter Pferde ist das BDV vorwiegend in der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht nachgewiesen worden, wobei jedoch keine entzündliche Reaktion gefunden werden konnte (Bilzer

et al., 1995). Aktuelle parallele Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe befassten sich mit der Charakterisierung der akuten Immunantwort in der Retina der BDV-infizierten Retina: während an Tag 14 p.i. immunhistochemisch keine Expression von Virusantigenen gezeigt werden konnte, war dies zum nächsten Untersuchungszeitpunkt an Tag 21 p.i. in der Nervenfasern-, Ganglienzell- und inneren plexiformen Schicht möglich. Vier Tage später zeigten äußere plexiforme Schicht und Neuronen der inneren Körnerschicht eine positive Reaktion, bei der letztmaligen Untersuchung an Tag 31 p.i. waren alle Retinaschichten betroffen mit Ausnahme der Photorezeptorenschicht (Stahl et al., 2003), in der jedoch in den hier zugrundeliegenden Untersuchungen in Teilen eine positive Reaktion nachweisbar war. Bei Vergleich der beiden Untersuchungen fällt auf, dass die Virusantigenausbreitung in der anderen Arbeitsgruppe etwas langsamer verlaufend und in der Folge auch die innere Körnerschicht nicht so früh und prominent antigenpositiv beschrieben wird. Daher wäre auch erklärlich, warum zum Ende des Untersuchungszeitraumes an Tag 31 p.i. noch kein Virusantigen in der Photorezeptorenschicht nachweisbar war. Prinzipiell stimmen jedoch beide Untersuchungen überein.

Mit Tag 16 p.i. setzt eine Entzündungsreaktion ein, deren Höhepunkt ca. zwei Wochen später erreicht ist. Diese äußert sich besonders in starken perivaskulären Infiltraten in der Ganglienzellschicht. Bis Ende des zweiten Monats hat die akute Entzündung – lichtmikroskopisch erkennbar an der Anzahl und Größe der Infiltrate - deutlich nachgelassen. Erste leichte Degenerationserscheinungen treten kurze Zeit nach dem Eintreten entzündlicher Erscheinungen ab Tag 20 p.i. auf. Ab Tag 24 p.i. gewinnt die Atrophie der Retina an Geschwindigkeit und schreitet später alle Schichten erstreckend weiter voran. Hierbei ist festzustellen, daß auch nach der akuten Entzündungsreaktion, die histopathologisch geprägt ist durch die perivaskulären Infiltrate, ein Fortschreiten der Degeneration auffällt.

An Tag 16 p.i. findet man immunhistochemisch in den drei inneren Retinaschichten erste einzelne CD8+ T-Zellen und ab Tag 18 p.i. lassen sich innerhalb der Infiltrate sowohl CD4+, als auch CD8+ T-Zellen differenzieren; Infiltrate findet man ab Tag 21 p.i. auch in der inneren Körnerschicht in allerdings jedoch geringerer Anzahl und Größe. Während die meisten CD4+ T-Zellen innerhalb oder in unmittelbarer Umgebung der Infiltrate und nur selten als einzelne Zellen in einer der Retinaschichten zu

finden sind, ist die Lokalisation der CD8+ T-Zellen weniger eindeutig auf die Infiltrate beschränkt, da sie auch losgelöst – parenchymal – vermehrt in den inneren drei, aber auch in den äußeren Retinaschichten liegen. Eine ähnliche Verteilung von CD4+ und CD8+ T-Zellen auf perivaskuläre Infiltrate und Parenchym wurde auch im Gehirn BDV-infizierter Ratten gefunden (Planz et al., 1993; Bilzer und Stitz; 1994; Planz et al., 1995). Während dieser Befund auch im Gehirn natürlich infizierter Tiere bestätigt werden konnte - bei Pferden ergab die Auswertung immunhistologischer Gehirnschnitte ein entsprechendes Verteilungsmuster der CD4+ und CD8+ Lymphozyten -, war in der Retina des Pferdes im Gegensatz zur Ratte trotz Nachweis von BDV-Antigen gar keine Entzündungsreaktion nachweisbar, wofür angenommen wurde, daß die ebenfalls nicht aufgetretene MHC-Antigen-Expression über eine Herunterregulierung der Entzündung ursächlich dafür sein könnte (Bilzer et al., 1995). Bei der Ratte scheint es so zu sein, als ob auch in der Retina die Degenerationerscheinungen weniger dort vonstatten gehen, wo die Infiltrate zu finden sind, sondern vielmehr in den eher von einzelnen, parenchymal gelegenen CD8+ T-Zellen durchsetzten, insbesondere äußeren Retinaschichten, während die von Infiltraten bei weitem am stärksten betroffene Ganglienzellschicht den Anteil der Retina darstellt, der über einen langen Untersuchungszeitraum mit Abstand am wenigsten von Atrophie betroffen ist. Diese lokalen Zusammenhänge von Degeneration und Verteilung von Infiltraten bzw. Verteilungsmuster der CD4+ und CD8+ Lymphozyten sind auch für das Gehirn beschrieben worden (Bilzer und Stitz, 1994; Planz et al., 1993). Dies bestätigt für die Retina die schon am Gehirn festgestellte elementare Bedeutung der CD8+ T-Zellen für die immunpathologische Reaktion. Auch die Tatsache, daß mit dem monoklonalen Anti-CD8-Antikörper OX-8 zumindest für einen begrenzten Zeitraum deutlich einfacher und effektiver eine Unterdrückung einer immunpathologischen Reaktion in der Retina erreichbar war als mit verschiedenen Anti-CD4-Antikörpern (Daten nicht dargestellt), unterstützt die bisherige Sichtweise der Pathogenese. Entsprechende Beobachtungen gab es auch am Gehirn (Stitz et al., 1992; Bilzer und Stitz, 1994; Planz et al., 1993).

Nach vier Monaten findet man viele CD4+, in geringerer Anzahl auch CD8+ Zellen sowohl innerhalb von wenigen noch existierenden Infiltraten, als auch weiterhin in deutlicher Anzahl parenchymal mehr in der Ganglienzellschicht und in den benachbarten Resten der inneren plexiformen Schicht als in der inneren Körnerschicht ein-

schließlich angrenzender Bereiche der stark degenerierten äußeren Körnerschicht. Insgesamt hat sich die Anzahl der CD8+ T-Zellen in der chronischen Phase vier Monate p.i. gegenüber dem akuten Erscheinungsbild drei bis vier Wochen p.i. merklich verringert, während CD4+ Zellen in der chronischen Phase in größerer Zahl zu finden sind; neben den positiv markierten kleinen Zellen mit rundem Nukleus, dichtem Heterochromatin und schmalem Zytoplasma beobachtet man auch eine geringere Anzahl von Zellen mit der Morphologie von Makrophagen. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen, in denen CD4-Antigen auf Peritoneal-, Lymphknoten- und Leber-Makrophagen entdeckt worden sind (Barclay, 1981; Jefferies et al., 1985), weswegen auch im Gehirn BDV-infizierter Ratten nachgewiesene lymphozytendifferente, CD4- und ED1-kreuzreaktive Zellen dem Makrophagen-/Mikroglia-System zugerechnet worden sind (Deschl et al., 1990) – ED1 ist ein Antikörper mit Spezifität für Monozyten und Gewebsmakrophagen (Dijkstra et al., 1985), wird jedoch auch von Mikrogliazellen exprimiert (Graeber et al., 1990; Gehrmann et al., 1992; Schwerdtfeger, 1994). Bezüglich Anzahl und Größe der perivaskulären Infiltrate ist die Retina entsprechend auch den Untersuchungen am Gehirn (Deschl et al., 1990; Stitz et al., 1992) in der chronischen Phase bei weitem weniger betroffen; im retinalen Parenchym findet man jedoch auch in der späten Phase der experimentellen BD eine deutliche Anzahl von CD4+ und CD8+ Zellen, was erst in neueren Untersuchungen auch für das Gehirn beschrieben worden ist (Hatalski et al., 1998). Dabei wurde im Gehirn ein deutlicher Anstieg von B-Zellen besonders im Parenchym gefunden, der sich in den hier zugrundeliegenden Untersuchungen für den Bereich der Retina nicht darstellte. In eigenen Untersuchungen am Gehirn wurden zwar auch B-Zellen immunhistochemisch nachgewiesen, jedoch in einer weniger prominenten Rolle (Eigene Untersuchungen; nicht dargestellt). Auch in den Untersuchungen von Geiß (1988), nahmen die Plasmazellen aufgrund licht- und elektronenmikroskopischer Untersuchungen ohne immunhistochemische Verifizierung den Hauptanteil der Infiltratzellen ab dem Tag 30 p.i. ein, während bis Tag 30 p.i. Makrophagen und große mononukleäre Zellen prominent erschienen und eindeutig identifizierbare kleine Lymphozyten während der gesamten Infektion nur in geringer Zahl angetroffen worden sind (Geiß, 1988). Dies steht im klaren Widerspruch zu den eigenen Untersuchungsergebnissen, als auch zu der heute allgemein anerkannten Rolle der CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten für die Immunpathogenese der experimentellen BD bei der Ratte. In einer neueren Studie basierend auf lichtmikroskopischen, immunhisto-

chemischen sowie elektronenmikroskopischen Bildern konnten im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung bei adult BDV-infizierten Tieren vier und fünf Wochen p.i. keine lymphozytären Infiltrate in der Retina gefunden werden, wobei jedoch keine lymphozyten-spezifische Antikörper verwendet worden sind. Zu diesem sehr untypischen Befund kommt in dieser Studie hinzu, daß die Hälfte der adult BDV-infizierten Tiere nach etwas mehr als zwei Wochen starben, was nicht sehr typisch für den Krankheitsverlauf der experimentellen BD adult infizierter Ratten ist (Kacza et al., 2000). Diese Arbeitsgruppe veröffentlichte nun Untersuchungen, in denen immunhistochemisch CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten entsprechend der hier vorliegenden Ergebnisse in der Retina nachgewiesen worden sind. Allerdings beschreibt diese Gruppe äquivalent zur Virusausbreitung eine langsamere Infiltration der Retina, wobei keine Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten beschrieben worden sind (Stahl et al., 2003). In derselben Untersuchung sind mithilfe eines Anti-CD45R-Antikörpers in der BDV-infizierten Retina an Tag 25 p.i. B-Lymphozyten nachgewiesen worden; da dieser Antikörper unreife B-Lymphozyten, jedoch weder reife B-Zellen, noch Plasmazellen markiert (Kroese et al., 1987) sind sechs Tage später kaum noch Zellen immunhistochemisch darstellbar gewesen (Stahl et al., 2003). Da das Antigen CD45R hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich von reifenden Zellen der B-Linie exprimiert wird, sondern auch von NK-Vorläuferzellen (Kouro et al., 2002), ist fraglich inwieweit dieser Antikörper zum Nachweis von B-Lymphozyten geeignet erscheint. In der dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchung ist unter Verwendung des Antikörpers OX-33 keine Beteiligung von B-Lymphozyten feststellbar gewesen.

In der vorliegenden Arbeit stellen neben den CD4+ und CD8+ Lymphozyten die ED3-positiven Zellen eine bedeutende Gruppe bei der Infiltration der Retina während der experimentellen Bornaretinitis dar. ED3 ist ein Antikörper mit der Spezifität für Gewebsmakrophagen (Dijkstra et al., 1985), wobei in einer späteren Untersuchung festgestellt wurde, daß dieser Antikörper bei der BD der Ratte neben in perivaskulären Infiltraten gelegenen Blutmonozyten und intraparenchymal vorkommenden Zellen des Monozyten-/Makrophagen-Systems auch mit Mikrogliazellen reagiert. Dabei werden überwiegend Typ-2-Zellen (aktiviert, nicht phagozytierend) und Typ-3-Zellen (aktiviert, phagozytierend) angefärbt, weniger deutlich ruhende Typ-1-Zellen (Schwerdtfeger, 1994). Diese von Gehrman (zitiert nach Schwerdtfeger, 1994) vor-

geschlagene Einteilung der Mikroglia beruht auf Unterscheidungen auf funktioneller Ebene, die sich in unterschiedlichen morphologischen Zustandsformen widerspiegeln: „ruhende Mikroglia“ (überwiegend ramifiziert, Typ 1), „aktivierte, aber nicht phagozytierende Mikroglia“ (überwiegend stäbchenförmig, Typ 2) und „aktivierte, phagozytierende Mikroglia“ (überwiegend amöboid, Typ 3).

Erste ED3-positive Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-Systems findet man an Tag 16 p.i. zum Teil perivaskulär gelegen in der Ganglienzellschicht, als auch in zentralen Anteilen der Nervenfaserschicht, wobei in der Folgezeit neben einer erhöhten Frequenz eine Konzentration im Bereich von Gefäßen und besonders erster kleiner perivaskulärer Infiltrate in der Ganglienzellschicht, aber auch einzelne Zellen in der inneren plexiformen Schicht auffallen. An Tag 21 p.i. ist eine deutliche Steigerung zu erkennen, bei der sich viele Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems in der inneren plexiformen Schicht und ein großer Teil in der direkten Umgebung von Infiltraten der Ganglienzellschicht befinden, wobei deren Zellkonzentrationen bis in die weitere Umgebung einschließlich äußerer plexiformer Schicht reichen. Die Dichte der Infiltrationen mit ED3-positiven Zellen fällt gegenüber den zentralen Anteilen der perivaskulären Infiltrate ab. Die beiden äußeren Retinaschichten – die äußere Körner- und die Photorezeptorenschicht – sind nur abschnittsweise von einzelnen, wenigen Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems durchsetzt. Ähnliche Untersuchungsergebnisse sind an einer BDV-infizierten Ratte 28 und 35 Tage p.i. gefunden worden: im H.E.-Schnitt kleine, dicht gefärbte Zellkerne gehäuft in der inneren plexiformen Schicht, mithilfe der Immunhistochemie als GSA-markierte Mikrogliazellen in beträchtlicher Anzahl vorwiegend in den inneren Retinaschichten mit besonderer Bevorzugung der Ganglienzell- und inneren plexiformen Schicht erkannt, wobei eine gehäufte nachbarschaftliche Beziehung zu Blutgefäßen auffällig war; darüberhinaus in der Photorezeptorenschicht GSA-markierte Makrophagen, die sich in der H.E.-Färbung als größere, heterotope Zellen darstellten (Kacza et al., 2000). Immunhistochemische Untersuchungen mithilfe des OX-42-Antikörpers, der Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems markiert, kommen bis auf eine zeitliche Verzögerung gegenüber den dieser Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen zum vergleichbaren Ergebnis (Stahl et al., 2003). Elektronen-mikroskopische Analysen bestätigen, daß sowohl Mikroglia, als auch Makrophagen während der Neuronendegeneration vier und fünf Wochen p.i. phagozytotisch aktiv sind. Die zellulären Interaktionen, die für

die Degeneration der Neuronen und damit für die Phagozytoseaktivität der Mikroglia bei der Borna-Retinitis verantwortlich sind, blieben jedoch im Unklaren. Müllersche Stützzellen – die Hauptmakrogliazellen der Retina – zeigten nur moderate morphologische und zytochemische Veränderungen, was dafür spricht, daß Müllersche Stützzellen zumindest in dieser Phase der BDV-induzierten Retinitis eine untergeordnete Rolle spielen (Kacza et al., 2000). In späteren Untersuchungen mit einem Beobachtungszeitraum von zwei bis acht Monaten wurde elektronenmikroskopisch eine große Zahl aktivierter Mikroglia und Makrophagen in sehr aktiver Phagozytoseaktivität gefunden. Die Müllerschen Stützzellen erschienen in ihrer Zahl nicht reduziert, offenbarten jedoch deutliche Anzeichen einer Gliose (Kacza et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden zwar auch vier Monate p.i. immunhistochemisch Zellen des Mikroglia-/Makrophagensystems gefunden, eine größere Bedeutung zeigten diese jedoch in der akuten Phase mit der zeitgleich rascher fortschreitenden Atrophie, die eine erhebliche Phagozytoseaktivität voraussetzt.

Parallel zur Infiltration mit Entzündungszellen ist in der Retina ab Tag 16 p.i. die Expression von MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Antigenen immunhistochemisch nachweisbar. Dabei ist eine Expression über alle Retinaschichten verteilt zu beobachten, wobei der Schwerpunkt im Bereich der inneren Retinaschichten liegt. MHC Klasse I-Antigen ist offensichtlich auf den inflammatorischen Zellen wie CD4⁺-, CD8⁺ T-Zellen und Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-Systems lokalisiert, darüberhinaus jedoch auch auf scheinbar allen ortsansässigen Zellen, was sich in einer über die gesamte Retina hinweg erstreckenden, diffusen Grundfärbung äußert. Bei den ortsansässigen Zellen handelt es sich dabei fast ausschließlich um die Neuronen der Sehbahn; darüberhinaus scheinen auch die Müllerschen Stützzellen MHC-Klasse I Antigen zu exprimieren. Dagegen wird MHC-Klasse II Antigen auf den meisten Entzündungszellen, nicht jedoch auf Neuronen gefunden. Entsprechende Ergebnisse sind für das Gehirn bekannt (Bilzer und Stitz, 1993, 1994; Carbone et al., 1991a). Während für das Pferd im Gehirn äquivalente Untersuchungsergebnisse bezüglich CD4⁺-, CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen/Mikroglia, als auch MHC-Klasse I und Klasse II-Antigen-Expression beschrieben worden sind, war in der Retina des Pferdes im Gegensatz zur Ratte neben einer fehlenden Entzündungsreaktion keine MHC-Antigen-Expression nachweisbar, was eine Rolle für die Herunterregulierung der Entzündung spielen könnte (Bilzer et al., 1995). Bei der experimentellen Borna-

Retinitis der Ratte ist auch in der chronischen Phase 120 Tage p.i. eine deutliche Expression beider MHC-Antigene in der Retina festzustellen, was in neueren Untersuchungen auch für das Gehirn nochmals bestätigt worden ist (Hatalski et al., 1998; Carbone et al., 1991a).

Das Auftreten von TNF – einem wichtigen Vertreter der Zytokine – wurde ebenfalls immunhistochemisch untersucht. Es zeigte sich, daß mit Einsetzen der ersten Entzündungszellen auch TNF besonders in den von Entzündungszellen infiltrierten inneren Retinaschichten nachweisbar war. Dabei fällt besonders zu Beginn eine Konzentration im Bereich von Gefäßen, später eine positive Durchfärbung der perivaskulären Infiltrate auf. Quelle von TNF können sein aktivierte Makrophagen einschließlich Mikroglia (Yamabe et al., 1994), als auch aktivierte T-Zellen, die alle immunhistochemisch u.a. im Bereich der Infiltrate nachweisbar waren. Außerhalb der Infiltrate scheinen aufgrund ihrer Verteilung in den Schichten besonders CD8+ T-Zellen, aber auch die Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-Systems TNF zu exprimieren. Für eine eindeutige Zuordnung der TNF-Expression wären in fortführenden Untersuchungen immunhistochemische Doppelfärbungen hilfreich. Ab Tag 21 p.i. findet man auch in ersten Abschnitten TNF-positive Neurone in der Ganglienzell- und der inneren Körnerschicht, was in der chronischen Phase 120 Tage p.i. sowohl bezüglich des Ausmaßes, als auch der Intensität stärker ausgeprägt ist. Dabei scheinen alle ortsansässigen Zellen – sowohl Neuronen als auch Müllersche Stützzellen – in der Lage zu sein, TNF zu exprimieren. Neuere quantitative Analysen der Retina mithilfe der RPA-Technik (Ribonuclease Protection Assay) bestätigen eine deutlich erhöhte mRNA-Expression im besonderen Maße von TNF- α und IL-1 β , weniger ausgeprägt von IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- β und IFN- γ ab Tag 25 p.i., wobei eine erhöhte Expression auch an Tag 31 und – bis auf die Ausnahme von IL-6mRNA – an Tag 36 p.i. beschrieben worden ist (Stahl et al., 2003). Im Gehirn war TNF immunhistochemisch an Tag 6 p.i. nachweisbar, wobei sich nur ganz vereinzelt kleine, stäbchenförmige Zellen anfärbten, die nach Vermutungen des Autors Mikrogliazellen vom Typ 2 entsprechen könnten. Auch im Gehirn fand sich eine diffuse Positivität im späteren Verlauf; in perivaskulären Infiltraten wurden 12 Tage p.i. einzelne makrophagenartige Zellen angefärbt, während sich ab Tag 18 p.i. die Infiltrate deutlich durchfärbten. In der Folgezeit kam es zu einer deutlichen Anfärbung des Hirnparenchymneuropils mit besonderer Betonung des Hippocampus. Dabei wurden Somata

von Neuronen wie Nervenfasern, aber auch Mikroglia besonders vom Typ 1 und Typ 2 markiert; letzteren wurde zumindest eine Beteiligung bei der Produktion von TNF zugeschrieben. T-Lymphozyten sind in dieser Untersuchung nicht als TNF-exprimierende Zellen erwähnt worden, obwohl CD4+ T-Zellen mehr als 40 % und CD8+ Lymphozyten ca. 20 % aller Zellen der durchgefärbten perivaskulären Infiltrate ausmachten (Schwerdtfeger, 1994). Eine Mitbeteiligung des Makrophagen-/Mikroglia-systems bei der TNF-Expression wird unterstützt durch Ergebnisse ultrastruktureller Untersuchungen an der Retina BDV-infizierter Tiere, die zeigten, daß Mikroglia und auch Makrophagen in der die schwere neuronale Degeneration begleitenden Phagozytose involviert sind (Kacza et al., 2000).

Auch andere Untersuchungen weisen auf die Bedeutung des TNF für die Pathogenese der Borna-Enzephalomyelitis hin: zuerst wurde mithilfe der RT-PCR Technik (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) die Präsenz verschiedener Zytokin-mRNA's wie Il-6, TNF- α , Il-1 α , IFN- γ und Il-2 nachgewiesen, wobei ein Maximum zum Zeitpunkt der stärksten inflammatorischen Reaktion auffällig war, und in der chronischen Phase der Erkrankung die Expression drastisch sank (Shankar et al., 1992). Spätere quantitative Analysen mithilfe der RPA-Technik (Ribonuclease Protection Assay) bestätigen ein Maximum der mRNA-Mengen dieser proinflammatorischen Zytokine fünf Wochen p.i.. Die Expression dieser mRNA's nimmt im Verlauf der nächsten zehn Wochen deutlich ab. Die maximale Expression der proinflammatorischen Zytokin-mRNA's fällt in die Phase der akuten BD, wobei als Quelle aufgrund des Lymphokinmusters und der Präsenz in dieser Phase CD4+ TH1-Zellen vorgeschlagen wurden. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch CD8+ T-Zellen, NK (natural killer)-Zellen oder aber auch ortsansässige neurale Zellen als Ursprung in Frage kommen (Hatalski et al., 1998). In früheren Untersuchungen wurde beobachtet, daß neuronale Zellkörper nach Hirnverletzungen in vivo u.a. TNF- α exprimieren und hierauf immunreaktiv reagieren. Es wurde gezeigt, daß Zellen des ZNS – und insbesondere Neuronen – die Fähigkeit besitzen, in direkter Reaktion auf eine penetrierende Verletzung des Gehirns mit einem schnellen zytokin-vermittelten Mechanismus zu antworten. Interessanterweise wurde diese Antwort unabhängig einer Infiltration des Gehirns durch periphere, inflammatorische Immunzellen wie Lymphozyten, Monozyten, noch durch aktivierte Mikroglia initiiert (Tchelingierian et al., 1993). Eine neuere Veröffentlichung über das Modell eines andersartigen

Hirntraumas bestätigt die neuronale Expression von TNF- α , welche mit neurologischen Schäden einhergeht. Dabei stellten die verletzten Neuronen die Hauptproduzenten des TNF- α dar; dessen Expression war auf das Gewebe lokalisiert, welches vom Trauma primär betroffen worden ist und später histologische Schäden aufwies. Auch hier zeigte nur eine kleine Population von Astrozyten und anderen Zellen eine TNF- α -positive Markierung, wobei deren Expression unabhängig vom Trauma war (Knoblach et al., 1999). Auch die systematische Administration von Lipopolysacchariden führte zum Nachweis von TNF- α in Neuronen (Breder et al., 1994). Weitere Untersuchungen wiesen die Induktion von TNF- α in humanen neuronalen Zellen durch extrazelluläres HTLV-1 (Human T-cell lymphotropic virus type 1) Tax 1, einem 40-kDa Phosphoprotein mit primärer Funktion in der viralen Transkription, nach (Cowan et al., 1997). Nach Induktion der Experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) bei Lewis-Ratten kommt es zu einer Produktion von TNF- α durch zentrale Neuronen des Rückenmarkes, was jedoch als direkte Antwort auf die massive Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen nach dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke interpretiert wurde (Villarroya et al., 1997). Die experimentelle Infektion von Mäusen mit CDV (canine distemper virus = Staupevirus), einem neurotrophen Virus, führt zu einer selektiven Infektion bestimmter Hirnstrukturen (u.a. Hippocampus und Hypothalamus), in deren Folge eine beträchtliche Anzahl von Neuronen TNF- α und Il-6 exprimieren. Dabei sind im Hippocampus bei Ausbleiben auffälliger inflammatorischer Prozesse oder infiltrierender Lymphozyten in manchen Pyramidenzellen und fast allen Körnerzellen TNF- α -Transkripte nachweisbar. In dieser Untersuchung wurden für den Hippocampus Gliazellen als eine Hauptquelle von Zytokinen ausgeschlossen, wobei dies für andere Hirnstrukturen und zu anderen Untersuchungszeitpunkten nicht ausgedehnt werden konnte (Bencsik et al., 1996). Das CDV gehört zu den Paramyxoviren, die wie das BDV zur Ordnung Mononegavirales gehören und zum BDV Sequenzhomologien aufweisen (McClure et al., 1992). Diese Untersuchungsergebnisse korrelieren mit der Beobachtung in dieser Arbeit, daß auch bei der experimentellen BD der Ratte neben den infiltrierenden immunologischen Zellen auch Neuronen der Retina TNF exprimieren können – eine Vermutung, die für die BD noch gar nicht (und im Bereich der Retina bisher auch für noch kein anderes Modell) dargelegt worden ist.

In der akuten Phase der BD vier Wochen p.i. zeigen Müllersche Stützzellen bei elektronenmikroskopischen Analysen nur moderate morphologische und zytochemische Veränderungen, weswegen diesen zumindest in dieser Phase nur eine untergeordnete Rolle zugeordnet worden ist (Kacza et al., 2000). Desweiteren ist deren Elektrophysiologie geringgradig verändert (Pannicke et al., 2001). In der späteren Phase läßt sich eine Mitbeteiligung der Müllerschen Stützzellen bei der TNF-Expression nicht ausschließen, da 120 Tage p.i. in manchen Abschnitten alle Zellen der inneren Körnerschicht Immunreaktivität zeigen. Auch andere Versuchsmodelle sprechen für solch eine Möglichkeit: In-vitro-Untersuchungen zeigten, daß eine primäre Masernvirus-Infektion humaner Gliazelllinien TNF- α -Expression induziert (Schneider-Schaulies et al., 1993). Für die Retina ist in Studien mit kultivierten retinalen Gliazellen die Hochregulation der TNF- α - und Il-6-Transkriptionslevel nach Exposition von Herpes simplex Virus (HSV) Typ 1 oder inflammatorischer Mediatoren nachgewiesen worden (Drescher und Whittum-Hudson, 1996a, b). Auch die in-vivo-HSV-1-Infektion des anterioren Segments des Mäuseauges induzierte in der Retina eine deutliche Hochregulation der TNF- α - und Il-6-mRNA-Level, wofür aufgrund der in-vitro-Untersuchungen potentiell die Müllerschen Stützzellen als eine intraretinale Quelle in Frage kämen, ohne jedoch immunhistochemische Untersuchungen der Retina durchgeführt zu haben. Die Müllerschen Stützzellen hätten damit die Möglichkeit, als ortsansässige Zellen die inflammatorische Immunantwort zu modulieren. Inwieweit andere Zellen auch bei der Expression von TNF- α eine Rolle spielen, blieb aufgrund fehlender Immunhistochemie offen (Drescher und Whittum-Hudson, 1996b). Auch schon in einer älteren Untersuchung war die Transkription von TNF- α und Il-6 in der Neuroretina von Ratten durch Injektion von Endotoxin induziert nachgewiesen worden, ohne die zelluläre(n) Quelle(n) zu identifizieren (Elner et al., 1990).

Bezüglich der in der H.E.-Färbung untersuchten Degeneration weist das Pigmentepithel nur geringe Veränderungen auf, während Narayan et al. (1983b) solche gar nicht erst erwähnen. Geiß fand in seinen elektronenmikroskopischen Untersuchungen (1988) Einzelzellnekrosen, für die Krey et al. (1979a) bei der BD des Kaninchens als Ursache eine Kumulation von BDV-Antigen im Pigmentepithel als Folge der Phagozytose der Photorezeptorenaußensegmente annahmen. Das Beobachten von

Kapillaren, Entzündungszellen und einer teilweisen Zunahme an Schichtdicke deckt sich größtenteils mit den Untersuchungen von Geiß.

Veränderungen in der Photorezeptorenschicht wurden ab Tag 20 p.i. beobachtet: nach aufgetretener Disorganisation und Infiltration mit Entzündungszellen sind ab Tag 24 p.i. fokal keine Außensegmente mehr zu finden. An Tag 31 p.i. sind die Veränderungen in der Photorezeptorenschicht unterschiedlich ausgeprägt; während sie stellenweise schon vollständig verschwunden ist, zeigen andere Lokalisationen nur eine geringe Reduktion der Schichtdicke. Im weiteren Verlauf geht die Photorezeptorenschicht vollständig verloren. Die Beobachtungen decken sich mit anderen Untersuchungen (Narayan et al., 1983b; Geiß, 1988) mit der Ausnahme, daß die Veränderungen von Geiß zu einem früheren Zeitpunkt beschrieben wurden.

Die Veränderungen der beiden Körnerschichten von anfänglicher Disorganisation der äußeren Neuronenschicht bis zum vollständigen Verlust der beiden ersten Neuronen wurden von Kompter (1987) und Geiß (1988) in ähnlicher Weise beschrieben, wobei Geiß' Untersuchungen jedoch zwei Monate p.i. aufhörten - ein Zeitpunkt, zu dem er noch ein Restzellband bestehend aus erstem wie zweitem Neuron fand. Die Beschreibungen von Narayan et al. (1983b) zeigten in einem Untersuchungszeitraum von 200 Tagen bei den meisten Tieren parallel zu der vorliegenden Arbeit den vollständigen Verlust der beiden ersten Neuronenschichten. In diesen gingen zunächst fokal Neurone verloren, die zumeist lokal mit perivaskulären Infiltraten in der Ganglienzellschicht im Zusammenhang standen. Dies wurde auch in den vorliegenden Untersuchungen gefunden. Der lokale Zusammenhang zwischen perivaskulären Infiltraten der Ganglienzellschicht und ersten Degenerationserscheinungen der beiden Körnerschichten könnte auf die Immunpathogenese der BD hinweisen, wobei jedoch die von perivaskulären Infiltraten augenscheinlich am stärksten betroffene Ganglienzellschicht in der Folgezeit die geringsten und erst zuletzt einsetzenden Degenerationserscheinungen aufweist. Weiterhin wäre denkbar, daß die Veränderungen in unmittelbarer Umgebung der Infiltrate aufgrund der engen anatomischen Gegebenheiten eher „unspezifisch“ aufgrund der raumfordernden Infiltratbildung in Form einer „Verdrängung“ des direkt anliegenden Gewebes verursacht sein könnten.

Die äußere plexiforme Schicht ist nach 38 Tagen p.i. völlig verschwunden. Erste Degenerationserscheinungen treten schon am Tag 20 p.i. in Form von dezenter Vakuolenbildung und beginnender Reduktion der Schichtdicke auf. Geiß (1988) hat

dieselben Beobachtungen geschildert - wie auch Krey et al. (1979b) bei BDV-infizierten Kaninchen - jedoch zu einem früheren Zeitpunkt zwischen Tag 16 und 30 p.i.. Ultrastrukturell findet man eine Schwellung der Axone und Synapsenkörper als Äquivalent einer frühen Ganglienzellschädigung. Der vollständige Verlust der äußeren plexiformen Schicht ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß sowohl die prä- als auch postsynaptischen Neurone degenerieren (Geiß, 1988).

In der inneren plexiformen Schicht wird erst im späteren Verlauf ab Tag 50 p.i. ein Substanzverlust prominent, der deutlich fortschreitet bis hin zum völligen Verschwinden in ausgedehnten Bereichen zum Ende des Untersuchungszeitraumes neuneinhalb Monate p.i.. Geiß (1988) beschrieb auch in der inneren plexiformen Schicht ab Tag 23 p.i. vakuolisierende Veränderungen, die jedoch weniger stark ausgeprägt sind und nie die gesamte Schicht betreffen. Dies war im Rahmen der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit nicht auffällig, jedoch bei Infektion mit einem anderen Virusstamm (eigene Untersuchung; nicht dargestellt). Weiterhin beobachtete er fast unmittelbar der Entwicklung der äußeren plexiformen Schicht folgend schon bis zum Tag 26 p.i. eine deutliche Reduktion der Schichtdicke, die auf seinen lichtmikroskopischen Bildern jedoch erst später auffällig wird. Die von ihm gefundenen Veränderungen entsprechen elektronenmikroskopisch denen in der äußeren plexiformen Schicht mit dem Unterschied, daß es im Untersuchungszeitraum von 59 Tagen zu keinem vollständigen Verlust der inneren plexiformen Schicht gekommen ist, da nur das präsynaptische Neuron degenerierte, während die Neurone der Ganglienzellschicht erhalten blieben (Geiß, 1988).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bisheriger, veröffentlichter Untersuchungen (Narayan et al., 1983b; Kompter, 1987 und Geiß, 1988) wurden in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Auswertungen auch leichte, erst spät einsetzende Veränderungen der dritten retinalen Neuronen gefunden. Ab Tag 64 p.i. reduzierte sich die Anzahl der Neuronen in der Ganglienzellschicht, und im weiteren Untersuchungszeitraum wurden die Abschnitte völlig degenerierter Retina immer größer, in denen auch keine Ganglienzellschicht mehr differenzierbar war. Ähnliche Ergebnisse einer völlig degenerierten, nur noch aus Überresten bestehenden Retina fand man 100 Tage p.i. auch bei heterozygoten Rowett-Ratten, die in Bezug auf eine BDV-Infektion vergleichbar mit Lewis-Ratten reagieren (Herzog et al., 1985). In dieselbe Richtung weisen die Ergebnisse einer aktuelleren Untersuchung, in der bei zwar teils untypischem Verlauf und fehlender lymphozytären Infiltration schon nach vier und

fünf Wochen p.i. eine merkliche Abnahme der Gesamtzahl der Ganglienzellen beschrieben worden ist (Kacza et al., 2000). Spätere Untersuchungen mit Überlebenszeiten von zwei bis acht Monaten zeigen eine um ein Drittel gegenüber Kontrolltieren verringerte Dicke der Retina, eine völlige Zerstörung der Photorezeptorsegmente und einen dramatischen Verlust an Neuronen mit einer Auflösung der laminären Struktur der Retina (Kacza et al., 2001).

In der Gesamtheit sind die Beobachtungen der hier zugrundeliegenden Arbeit weitestgehend äquivalent mit anderen, früheren Untersuchungen (Narayan et al., 1983b; Herzog et al., 1984; Geiß, 1988) mit der Ausnahme zeitlicher Differenzen, wobei hier Unterschiede bei den Versuchstieren zugrunde liegen mögen, und weiterer Beobachtungen infolge eines erheblich längeren Untersuchungszeitraumes. Unerklärlich dagegen sind die in einer aktuellen Untersuchung beschriebenen fehlenden perivaskulären Infiltrate, was sich jedoch auch in einer ebenfalls beobachteten untypischen Klinik einschließlich bei 50 % aller Versuchstiere eingetretener Todesfälle widerspiegeln könnte. Auch die Autoren liefern keine Erklärung für ihre Borna-untypischen Ergebnisse (Kacza et al., 2000).

6.2 Immunkompromitierte BDV-infizierte Tiere

In der vorliegenden Arbeit sollte nun im Gegensatz zum adult BDV-infizierten, immunkompetenten Tier der Einfluß des BDV auf die Retina ohne Beeinträchtigung durch das Immunsystem untersucht werden. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten, die Immunabwehr zu inhibieren:

Ratten werden in einem relativ frühen Entwicklungsstadium mit noch unzureichend funktionierendem Immunsystem geboren (Stitz et al., 1995). So führt eine BDV-Infektion innerhalb der ersten beiden Tage nach der Geburt zu einer persistierenden Infektion ohne Anzeichen einer Entzündung (Narayan et al., 1983b; Carbone et al., 1991a; Stitz et al., 1995). Dies bietet eine Möglichkeit, eine eventuell vorhandene Viruspathologie ohne immunpathologische Auswirkung zu studieren. Der Mechanismus fehlender immunologischer Antwort neugeborenen infizierter Ratten auf das BDV ist nicht endgültig geklärt (Stitz et al., 1995).

Experimente zeigten, daß eine Immuntoleranz gegenüber BDV zumindest für ein Jahr aufrecht erhalten bleibt (Carbone et al., 1991a). In weiteren Versuchen mit Knochmarkstransplantationen und Parabiose wurde vermutet, daß die ausblei-

bende Immunantwort bei neugeborenen infizierten Tieren eine Ursache in der viralen Antigenverbreitung in die extraneuralen Gewebe unabhängig von der neuralen viralen Replikation haben könnte und mit Vorgängen in Verbindung zu stehen scheint, die während der Reifung der Immunzellen nach Verlassen des Knochenmarks geschehen (Carbone et al., 1991a).

Diese Ansicht wurde durch spätere Untersuchungen bekräftigt, in denen die Replikation von BDV in fibroblastischen Stromazellen des Knochenmarks und des Thymus nachgewiesen wurde (Rubin et al., 1995); dabei war auffällig, daß das BDV sehr schnell nach Infektion neugeborener Ratten im Thymus nachweisbar war (innerhalb von 72h p.i.) - zeitlich korrelierend mit der ausbleibenden Immunantwort. Bisher wird angenommen, daß aus dem Knochenmark stammende Makrophagen und dendritenähnliche Stromazellen für Toleranzinduktion im Thymus wichtig sind, während fibroblastische Stromazellen des Thymus eine Hauptrolle bei der Unterstützung reifender T - Lymphozyten spielen (Faas et al., 1993; Hoffmann et al., 1992; Meilin et al., 1992; Schreiber et al., 1991; Webb und Sprent, 1990; Anderson et al., 1993). Aufgrund der BDV- Infektion dieser Zellen wäre ein direkter oder indirekter Einfluß auf die Immunantwort denkbar (Rubin et al., 1995).

Auch bei adult infizierten, immunkompetenten Tieren korreliert der Verlust der BDV-spezifischen, zellvermittelten Immunantwort in der chronischen Phase zeitlich mit der BDV-Replikation im Thymus, während in der akuten Erkrankung nur wenige Tiere BDV-RNA im Thymus aufwiesen (Rubin et al., 1995).

Immunsuppressive Behandlungen BDV-infizierter Tiere mit Cyclophosphamid oder Cyclosporin A unterdrücken entzündliche Veränderungen und Erkrankungen (Narayan et al., 1983a, b; Stitz et al., 1989).

Cyclophosphamid ist eine alkylierende Substanz, die durch kovalente Bindung an Nukleinsäuren in Teilung befindliche Zellen beeinflusst und vorwiegend proliferierendes lymphatisches Gewebe zerstört. In späteren Untersuchungen erschien es jedoch auffällig, daß ein Großteil infizierter immunsupprimierter Kontrolltiere in der Regel nach drei bis vier Wochen p.i. enzephalitische Reaktionen und neurodegenerative Veränderungen im Gehirn aufwies, die etwas später zu BD-spezifischer klinischer Symptomatik führten. Zudem waren in der Regel fünf bis sechs Wochen nach Immunsuppression antivirale Serumantikörper nachweisbar (Nöske, 1996).

Übereinstimmend mit anderen Ergebnissen, nach denen bei BDV-infizierten Lewis-Ratten 35 Tage nach Cyclophosphamid-Immunsuppression ebenfalls positive Antikörper und zehn Tage nach Immunsuppression CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten in den Mesenteriallymphknoten gefunden wurden (Planz, 1993), wurde aus den vorliegenden Daten geschlossen, daß die einmalige hochdosierte Gabe von Cyclophosphamid einen Tag p.i. keine Toleranz gegenüber dem Virus der Bornan Krankheit induziert, sondern daß es nach kurzzeitiger Suppression zu einer Regeneration des Immunsystems mit zeitlicher Verzögerung des Krankheitsbildes kommt (Nöske, 1996). Daraufhin wurde untersucht, ob eine tägliche intraperitoneale Gabe geringerer Mengen (1 bzw. 10 mg/kg KG) dieses Immunsuppressivums über einen längeren Zeitraum (vier Wochen) hinweg eine langfristige Unterdrückung des Immunsystems bzw. sogar eine Toleranz gegenüber BDV - vergleichbar der durch CSA induzierten Toleranz (Stitz et al., 1989; Schilken 1990) - bewirken kann. Nach täglicher Applikation von 10 mg/kg KG Cyclophosphamid über 30 Tage konnte bei allen Tieren bis zu neun Monate p.i. keine BD-spezifische Klinik beobachtet werden. Die meisten Tiere wiesen zudem weder entzündliche Infiltrate im Gehirn, noch antivirale Antikörper auf. Dies zeigte, daß sowohl auf T-, als auch auf B-Zell-Ebene eine optimale Immunsuppression erzielt werden konnte (Nöske, 1996).

Wie in früheren Arbeiten in Testreihen mit verschiedenen Dosen und unterschiedlich langen CSA-Behandlungen gezeigt werden konnte, führte die tägliche subkutane Applikation von 25 mg/kg KG CSA an Lewis-Ratten über einen Zeitraum von vier Wochen beginnend Tag 1 vor der Infektion zu einer dauerhaften Unterdrückung der Immunantwort und damit der Erkrankung. Es wurden weder entzündliche Infiltrate im Gehirn, noch BD-spezifische Krankheitssymptome selbst nach einem sehr langen Beobachtungszeitraum von 40 und 60 Wochen gefunden, während im Verlauf des Experimentes die Virustiter im Gehirn denen immunkompetenter BDV-infizierter Ratten vergleichbar waren (Stitz et al., 1989). Dies stellte das erste Modell einer langanhaltenden Unterdrückung einer immunvermittelten Erkrankung nach persistierender Virusinfektion dar. Ursache ist eine effiziente Inhibition der bei der BDV relevanten T-Zellpopulation durch Unterdrückung der Lymphokinsynthese (Überblick bei Stitz, 1992), wobei auf mRNA-Ebene sowohl die Expression des Il-2-Rezeptors auf T-Lymphozyten (Britton und Palacios, 1982;

Gauchat et al., 1986), als auch die Produktion von Il-2 durch T-Zellen (Bunjes et al., 1981; Britton und Palacios, 1982; Krönke et al., 1984; Autenried und Halloran, 1985) verhindert wird; CSA war ursprünglich entwickelt worden, um in der Humanmedizin Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen oder Gewebepflanzungen zu unterbinden (Borel, 1988). Die wenig relevante B-Zell-Antwort wird hauptsächlich indirekt über eine Hemmung der T-Zell-Hilfe beeinflusst, während CSA keinen bzw. nur einen geringen Effekt auf B-Zellen besitzt (Stitz et al., 1989). Weitere Untersuchungen zu CSA ergaben, daß es sich um eine langanhaltende antigenspezifische Toleranz handelt, die eine Persistenz des Fremdantigens voraussetzt (Stitz, 1992). CSA wurde neben seiner hohen Effizienz als relativ gering toxisch eingestuft (Überblick bei Borel, 1989).

Werden BDV-infizierte Ratten früh während der Infektion mit monoklonalen Antikörpern behandelt, die spezifisch gegen alle T-Zellen oder gegen T-Zellsubpopulationen gerichtet sind, werden die entzündlichen Reaktionen und die BDV-spezifische Klinik auf Dauer erheblich gehemmt oder sogar verhindert. Durch eine Thymektomie wird die Reifung neuer CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten blockiert, womit folglich nur die reifen T-Zellen in der Peripherie eliminiert oder funktionell gehemmt werden brauchen (Stitz et al., 1992). In weiterführenden Untersuchungen wurde allerdings Monate nach der Infektion wie bei immunkompetenten Tieren kein BDV-spezifisches Antigen in der Peripherie gefunden, woraufhin geschlossen wurde, daß es aufgrund einer möglichen Restaktivität auf der T-Zellebene, jedoch auch durch das nicht beeinträchtigte B-Zellsystem zu einer Unterdrückung der Virusausbreitung auf nicht-neurale, periphere Gewebe kommt. Dahingegen ist eine solche extraneurale Virusausbreitung bei langfristiger Behandlung mit CSA oder Cyclophosphamid – im Gegensatz zur weniger wirksamen einmaligen Applikation einer sublethalen Dosis – oder bei neugeborenen infizierten Ratten zu beobachten. Es wurde aufgrund dieser Daten geschlossen, daß die Virusausbreitung auf die peripheren Organe stark von Art und Beständigkeit der Immunsuppression abhängt (Sobbe, 1996), was im Umkehrschluß eine geringere Effizienz der Antikörperbehandlung bei immunsuppressiven Versuchen bedeuten würde.

Bei neugeborenen infizierten Tieren verläuft die Virusausbreitung wesentlich schneller als bei adult infizierten, immunkompetenten Ratten: schon nach neun Tagen hat das BDV einige Neuronen der Ganglienzellschicht und Abschnitte der inneren plexiformen Schicht erreicht. 12 Tage p.i. hat die Infektion neben der weiteren Ausbreitung innerhalb des Ganglion nervi optici auf die innere Körnerschicht und teils auf die äußere plexiforme Schicht übergegriffen. 15 Tage p.i. kann das BDV in zentralen Anteilen der Netzhaut im Bereich des N. opticus in der äußeren Körnerschicht wie in der Photorezeptorenschicht beobachtet werden. Ab 18 Tage bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes 18 Monate p.i. sind alle Retinaschichten infiziert, wobei zu späteren Untersuchungszeiträumen die mittlere Neuronenschicht am stärksten betroffen ist. In früheren Untersuchungen war BD-Virus in der Retina neugeborenen infizierter Ratten an Tag 13 p.i. – dem frühstgewählten Untersuchungszeitpunkt – und an allen weiteren Untersuchungszeitpunkten bis zum Ende an Tag 208 p.i. sowohl immunhistologisch als auch per Infektivitätstest nachweisbar (Herzog et al., 1984). In einer späteren Untersuchung wurde die Verteilung von Virusantigenen innerhalb der Retina athymischer, homozygoter Nacktratten bei ausbleibenden inflammatorischen Läsionen immunhistologisch präzisiert, indem 100 Tage p.i. der Nachweis von BDV in allen drei Neuronenschichten dargestellt wurde (Herzog et al., 1985). Narayan und Kollegen wiesen Virusreplikation in der Retina neugeborenen infizierter Lewis-Ratten erst 15 Tage p.i. per Infektivitätstest nach, jedoch in einer höheren Rate als bei den immunkompetenten adult infizierten Tieren, ohne daß deutlich wurde, ob Nachweistests zu früheren Untersuchungszeitpunkten durchgeführt worden waren. Die höhere Infektivität bei den neugeborenen infizierten Ratten im Vergleich zu den adult infizierten Tieren 15 Tage p.i. läßt jedoch den Schluß zu, daß sich die Virusausbreitung bei jener Gruppe in einem fortgeschrittenerem Stadium befand. Übereinstimmend mit den vorliegenden Untersuchungen stellte man eine persistierende Virusreplikation im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraumes fest (Narayan et al., 1983b).

Die stichprobenartige Untersuchung nach BDV-Antigen ergab auch bei den anderen immuninkompetenten Gruppen einen Infektionsnachweis für alle Schichten der Retina nach Tag 24 p.i..

Die geschwindigkeitsbezogenen Unterschiede der Virusausbreitung in der Retina bei den neugeborenen infizierten Tieren einerseits und den immunkompetenten adult infizierten Ratten andererseits deckt sich mit entsprechenden Beobachtungen im ZNS (Bilzer, unveröffentlichte Ergebnisse; Stitz et al., 1998). In diesen Untersuchungen ist festgestellt worden, daß bei neugeborenen infizierten Tieren sich das BDV am schnellsten im ZNS ausbreitet, bei dauerhaft mit CSA oder Cyclophosphamid behandelten Ratten etwas langsamer, jedoch schneller als bei adult infizierten, immunkompetenten Tieren. Eine mit Letzteren ähnliche Ausbreitungsgeschwindigkeit zeigten solche Gruppen, die lediglich mit einer sublethalen Einmaldosis Cyclophosphamid behandelt worden sind. Zur Ausbreitungsgeschwindigkeit äquivalente Ergebnisse gab es auch bezüglich des Tropismus' in neuralen und nicht-neuralen Geweben. Während bei neugeborenen infizierten, sowie bei dauerhaft mit CSA oder Cyclophosphamid immunsupprimierten Tieren neben einer ähnlichen Ausbreitungsgeschwindigkeit auch eine vergleichbare Virusverteilung in extraneuralen Geweben zu beobachten war (Stitz et al., 1998; Bilzer, unveröffentlichte Ergebnisse; eigene Untersuchungen, nicht dargestellt), zeigten adult-infizierte, mit TGF β (Stitz et al., 1991b), monoklonalen Antikörpern gegen CD4+ und/oder CD8+ Lymphozyten (Stitz et al., 1992) oder mit einer Einmalgabe Cyclophosphamid (Bilzer, unveröffentlichte Ergebnisse) immunsupprimierte Ratten äquivalent immunkompetenten Gruppen keine extraneurale Infektion. Auch diese Daten bezüglich Virusausbreitung und deren Geschwindigkeit unterstützen die Hinweise einer Abhängigkeit derselben von der Qualität der Immunsuppression.

Außer bei manchen Tieren ab Tag 50 p.i. zu findenden vakuolären Erscheinungen in der äußeren plexiformen Schicht gibt es in den ersten drei Monaten p.i. bei neugeborenen infizierten Ratten keine degenerativen Veränderungen. An Tag 100 p.i. sind erste geringgradige Unregelmäßigkeiten bezüglich der Ordnung im Grenzbereich der äußeren Körner- zur plexiformen Schicht lichtmikroskopisch zu beobachten, was sich in einem zackeligen Grenzverlauf zwischen diesen beiden Schichten äußert. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten 12, 14, 18 und 20 Monate p.i. sind leichte, später deutlichere Degenerationserscheinungen zu beobachten. Dabei sind zunächst äußere plexiforme und äußere Körnerschicht, sowie die Photorezeptorenschicht, später auch die innere Körnerschicht von einer Degeneration betroffen, bis daß es zum Ende des Untersuchungszeitraumes in peripheren Anteilen der Retina zu einer

rudimentären Restschichtung der primären drei Neuronen der Sehbahn bzw. einer fast völligen Atrophie gekommen ist, wobei in zentraleren Anteilen der Retina eine deutlich geringer ausgeprägte Degeneration zu beobachten ist. Die Degenerationserscheinungen scheinen sich in der Art und in der Reihenfolge der betroffenen Schichten nicht von denen immunkompetenter, adult infizierten Ratten zu unterscheiden. Das Ausmaß und der Zeitablauf differieren dagegen völlig.

Während Herzog et al. (1984) bei neugeborenen BDV-infizierten Lewis-Ratten in keinem Fall spezifische Zelldegenerationen im sieben Monate andauernden Untersuchungszeitraum finden konnten, beschrieben Narayan et al. (1983b) für neugeborenen infizierte Lewis-Ratten bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes sieben Monate p.i. den Verlust mancher Neurone der inneren wie äußeren Körnerschicht, wobei jedoch alle Neuronenschichten grundsätzlich intakt blieben. Die aufgetretenen Veränderungen waren minimal im Vergleich zur massiven Retinopathie bei adult infizierten Ratten. Für eine Erblindung der Tiere fanden sich keine Anzeichen.

Diese Beobachtungen fügen sich gut ein in die eigenen Ergebnisse einer erst sehr spät, ganz allmählich beginnenden Degeneration der Retina, die über einen sehr langen Zeitraum voranschreitet. Narayan et al. (1983b) beschrieben sogar eine etwas ausgeprägtere Degeneration zu einem, früheren Zeitpunkt als bei den vorliegenden Untersuchungen. Als Ursache vermutete man eine selektive Zerstörung durch virale Replikation zumindest der ebenfalls zugrundegegangenen Neuronen des Gyrus dentatus (Narayan et al., 1983b).

Über den weiteren Verlauf der Degeneration über den 20. Monat p. i. hinaus könnte man vermuten, daß sie sehr langsam weiter voranschreiten wird, zumindest bis sie in allen Retinaabschnitten dasgleiche Ausmaß erreicht hat. Warum in der Peripherie der Retina nahe der Ora serrata eine scheinbar weiter fortgeschrittene Zerstörung auftritt, bleibt unklar.

Für adult infizierte, immunkompetente Tiere traf es ebenfalls zu, daß zum Übergang hin zwischen Pars caeca retinae auf der Rückseite der Iris und des Ziliarkörpers und Pars optica retinae eine fortgeschrittenere Degeneration zu beobachten war, was von anderen Autoren nicht beschrieben worden ist. Eine Erklärungsmöglichkeit bestünde darin, daß aufgrund einer zur Ora serrata hin abnehmenden Rezeptorendichte eine gleichmäßige Degeneration in der Peripherie auffälliger erschiene.

Für die BDV-Infektion neugeborener Ratten führten in der Vergangenheit einige Untersuchungen zu der Beobachtung einer Korrelation zwischen der Entwicklungs-

stufe mancher Hirnanteile zum Zeitpunkt der BDV-Infektion und spezifischen neuroanatomischen Folgen sowie Verhaltensänderungen, da sich zeigte, daß solche Gehirnabschnitte, die sich zum Zeitpunkt der Infektion in einer Phase der postnatalen Reifung befinden, besonders anfällig für eine Unterbrechung der normalen Entwicklungsprozesse waren: dies gilt sowohl für den Hippocampus, wo es bei ausbleibender Entzündung zu einer Degeneration mit dem Verlust von Neuronen des Gyrus dentatus kommt, als auch für das Kleinhirn mit einer sich ausbildenden Hypoplasie, bei der ein Verlust der äußeren Körnerschicht, sowie eine dünnere innere Körner- und Molekularschicht zu beobachten sind (Carbone et al., 1991a; Bautista et al., 1994, 1995; Rubin et al., 1999a, b).

Schon frühere fortlaufende Untersuchungen mit im Vergleich zu Kontrolltieren geringeren Kleinhirnquerschnitten ließen den Schluß zu, daß die bei neugeborenen infizierten Ratten zu beobachtende Kleinhirnatrophie eher ein Ergebnis eines Defekts des normalen Wachstums als die virusinduzierte Rückbildung eines normal entwickelten Kleinhirns waren. Als Ursache war angenommen worden, daß es sich um einen sekundären Effekt des BDV auf die Funktionen, auf die „luxury functions“, von Purkinjezellen und Astrozyten handeln könnte, welche entscheidend für Replikation, Reifung und Migration der Körnerzellen sind (Bautista et al., 1995). Letztlich bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen, um die Mechanismen der neuronalen Degeneration solcher Gehirnanteile, die sich während der Infektion in postnataler Reifung befinden, erklären zu können (Rubin et al., 1999b).

Die Befunde degenerativer Veränderungen sich unter BDV-Infektion entwickelnder Gehirnanteile wie Hippocampus und Kleinhirn weisen einen bedeutenden Unterschied zu den vorliegenden Untersuchungen auf, da hier die Retina in ihrer postnatalen Entwicklung offensichtlich – zumindest lichtmikroskopisch nicht erkennbar – nicht gestört wird und sich ca. innerhalb einer Woche nach der Geburt eine völlig normale anatomische Struktur ausbildet. Da die pathologischen Abweichungen in Kleinhirn und Hippocampus einerseits und der Retina andererseits zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien auftreten, scheint die in späten Phasen deutlich vorgeschrittene Degeneration der Retina neugeborenen infizierter Tiere eher nicht durch eine Unterbrechung der normalen Entwicklung infolge der BDV-Infektion während der postnatalen Reifungsphase erklärbar zu sein.

Mit den beobachteten degenerativen Veränderungen der Retina übereinstimmend wurden – unabhängig von Entwicklungsstadien verschiedener Gehirnareale – sowohl

Hydrocephalus, als auch Großhirnrindenatrophie bei den 20 Monate alten neugeborenen BDV-infizierten Tieren gefunden (Bilzer, unveröffentlichte Ergebnisse; eigene Untersuchungen, nicht dargestellt).

Am Kleinhirn fand man bei sieben Monate alten, neugeborenen BDV-infizierten Ratten einen Verlust von ca. 75 % der Purkinjezellen gegenüber uninfizierten Kontrolltieren. Diese degenerativen Vorgänge laufen offensichtlich erst nach einer postnatalen Reifung der Purkinjezellen ab, wofür entweder ein direkter Effekt des BDV auf diese Zellen oder eine indirekt induzierte Immunantwort verantwortlich sein könnte (Eisenman et al., 1999), zumal bekannt ist, daß Purkinjezellen sensibel auf immunologische Vorgänge reagieren (Graus et al., 1988; Jaeckle et al., 1985; Rodriguez et al., 1988). Das Ausbleiben einer offensichtlichen Ataxie schien darauf hinzuweisen, daß der Verlust der Purkinjezellen nicht plötzlich, sondern allmählich über einen längeren Zeitraum stattfindet (Eisenman et al., 1999). Neuere Untersuchungen bestätigen den kontinuierlich fortschreitenden Verlust von Purkinjezellen beginnend vier Wochen p.i. (Hornig et al., 1999). Darüberhinaus wurde eine Verringerung der Gehirnmasse zwischen zwei und 24 Wochen p.i. beobachtet. Weitere Ergebnisse waren der Verlust von Neuronen im cerebralen Cortex, im Gyrus dentatus als auch in verschiedenen Nuclei im Bereich des Hirnstammes mit einer einsetzenden Mikrogliose und Astrozytose (Hornig et al., 1999). Auch in dieser Untersuchung wurden unabhängig von Reifungsprozessen degenerative Veränderungen gefunden, wie sie offensichtlich auch bei der Retina zu beobachten sind.

Die Auswirkungen ausbleibender entzündlicher Veränderungen aufgrund eines noch unreifen Immunsystems wurden auch bei der Masernvirus-Infektion neugeborener Hamster untersucht: Im Gegensatz zum BDV-Modell kam es jedoch schon innerhalb von vier Tagen zu einer Ausbildung von in den Glaskörper hineinragenden retinalen Falten als Ergebnis einer retinalen Dysplasie, die bei der Infektion 25-Tage-alter Hamster wahrscheinlich aufgrund ihrer schon voll ausgebildeten Retina nicht zu beobachten war. Bei den erwachsenen Hamstern kam es zu hämorrhagischen Retinaveränderungen (6-13 d.p.i.), gefolgt von fokaler Retinitis (13-17 d.p.i.) ohne bleibende Läsionen (Khalifa et al., 1991). Hier gibt es eher Parallelen zur Entwicklungsstörung des Kleinhirns neugeborenen BDV-infizierter Ratten, da die Retina bei diesen Tieren in der Entwicklung nicht gestört wird. Inwieweit in jenem Tiermodell eine Viruspathologie oder eine Störung regelrechter postnataler Entwicklung bei Viruspräsenz eine Rolle spielen, blieb offen.

Bei der intracerebralen Infektion neugeborener Ratten führt das LCMV zu einer akuten Retinopathie mit dysplastischen Veränderungen der inneren Körnerschicht und fortschreitendem Zellverlust des ersten und dritten Neurons bis zur Destruktion aller Retinaschichten, wobei hier allerdings immunpathologische Vorgänge beteiligt zu sein scheinen (Del Cerro et al., 1982; Monjan et al., 1972; Monjan und Hogan, 1979), was bei neugeborenen BDV-infizierten Ratten nicht auftritt.

Die persistente, tolerante Infektion neugeborener Ratten mit BDV ist ein einzigartiges, experimentelles Modell und steht im Gegensatz zur gesteigerten Virulenz vieler Virusarten bei Infektion neugeborener Ratten.

Bei mit CSA immunsupprimierten Tieren treten erste minimalste degenerative Veränderungen ab Tag 70 p.i. in Form vereinzelter Vakuolen der äußeren plexiformen Schicht auf. Im weiteren Verlauf findet man besonders in peripheren Anteilen deutliche Degenerationserscheinungen, die in Art, Umfang und Zeitablauf den Veränderungen der neugeborenen BDV-infizierten Ratten ähneln. Periphere Anteile der Retina im Bereich des Ziliarkörpers, sowie die äußeren drei Retinaschichten sind dabei im besonderen Maße betroffen.

In einer früheren Untersuchung war lediglich das Ausbleiben einer entzündlichen Infiltration als auch einer BD-spezifischen Klinik für einen Zeitraum bis zu 60 Wochen beobachtet worden, während mögliche degenerative Veränderungen unerwähnt blieben (Stitz et al., 1989). In einer aktuelleren Studie wurde neben einem sonst unauffälligen Gehirn nur die Degeneration des Gyrus dentatus im Alter von 60 bis 160 Tagen bei solchen Tieren beschrieben, die 15 Tage nach der Geburt mit dem BDV infiziert und mit CSA immunsupprimiert worden sind. Da aber die Neurogenese und die Migration der Neuronen im Hippocampus bei Ratten bis zu einem Jahr andauert (Palmer et al., 1997), scheint wie bei den neugeborenen BDV-infizierten Tieren eine Störung der postnatalen Reifung durch die virale Infektion für die aufgetretenen Veränderungen verantwortlich zu sein. Bei diesen Tieren war das Kleinhirn von Veränderungen unbetroffen. Da 15 Tage nach der Geburt die Entwicklung des Kleinhirns weitestgehend abgeschlossen ist (Altman und Bayer, 1997), hätte eine viral bedingte Störung der postnatalen Reifung auch nicht die Ursache für eine möglicherweise aufgetretene Atrophie sein können (Rubin et al., 1999b). Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Ergebnissen stehen die spät (u.a. 17 Monate) nach Infektion zu beobachtenden gering- bis mittelgradigen neurodegenera-

tiven Veränderungen im Hippocampus- und Cortexbereich bei CSA-immunsupprimierten Tieren, wobei zudem bei der Mehrheit der Tiere vor allem in den betroffenen Gehirnbereichen eine geringgradige diffuse entzündliche Infiltration nachweisbar war (Nöske, 1996). Diese in sehr späten Phasen zu beobachtende Degeneration – und im Falle des Cortex auch eines Areales, das weniger einer postnatalen Reifung unterliegt - steht im Einklang mit den dieser Arbeit zugrundeliegenden Ergebnissen bei der Retina.

Virusträger, die über vier Wochen mit Cyclophosphamid immunsupprimiert worden sind, zeigten nach ca. zwei Monaten p.i. erste Anzeichen einer Degeneration in der äußeren plexiformen Schicht. Schon ca. einen Monat später ist die Atrophie in deutlichem Maße vorangeschritten, wobei wie in den anderen Untersuchungsgruppen in erster Linie die äußeren Retinaschichten von der äußeren plexiformen Schicht bis zur Photorezeptorenschicht von Substanzverlust betroffen sind. In der Folgezeit bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes am Tag 178 p.i. werden die Degenerationserscheinungen auch in den inneren Schichten – und im besonderen Maße auch in der inneren Körnerschicht - deutlich erkennbar. Lediglich eine degenerierte Ganglienzell- und innere plexiforme Schicht, darüberhinaus nur noch stellenweise eine reduzierte innere Körnerschicht sind vom ursprünglichen Retinaaufbau noch erhalten, wobei stellenweise die Ordnung in Schichten aufgelöst ist. Unterschiede zu den vorher beschriebenen Untersuchungsgruppen der neugeborenen BDV-infizierten bzw. mit CSA immunsupprimierten Tieren bestehen lediglich bezüglich der Geschwindigkeit der degenerativen Prozesse, die bei letzteren Gruppen sehr viel langsamer ablaufen. Zu der Gruppe mit den Tieren, die mit einer Einzeldosis Cyclophosphamid immunsupprimiert worden sind, bestehen keine Unterschiede, soweit diese aufgrund der deutlich unterschiedlichen Beobachtungszeiträume vergleichbar sind. Da auch in letzterer Gruppe nur Tiere weitestgehend ohne BD-typische Klinik verwendet worden sind, scheint dieses aufgrund der nur schwach ausgeprägten Immunreaktion plausibel, obwohl schon zu erwarten gewesen wäre, daß die Atrophie in der Gruppe mit der Einzeldosis Cyclophosphamid aufgrund der Regeneration des Immunsystems (Planz, 1993; Sobbe, 1996; Nöske, 1996) erkennbar schneller ablaufen würde.

Diese Ergebnisse stehen nicht im Gegensatz zu den Beobachtungen von Narayan et al. (1983b), die bei durch eine Einzeldosis Cyclophosphamid immunsupprimierten Ratten neben dem im Hippocampus beobachteten Verlust von Neuronen des

Gyrus dentatus weder Enzephalitis, Retinitis, Hydrocephalus oder Retinopathie noch eine klinische Erkrankung feststellen konnten, da der Untersuchungszeitraum 50 Tage p.i. endete und damit zu einem Zeitpunkt, an dem auch in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen noch keine wesentlichen Veränderungen degenerativer Art beobachtet werden konnten. Auch bei über vier Wochen mit Cyclophosphamid behandelten Tieren fand man im Gehirn bereits einen Monat p.i. eine diffus verbreitete Degeneration von sehr wenigen Nervenzellen. Der Grad der Neuronendegeneration nahm im Laufe der Zeit zu (Nöske, 1996).

Eine vergleichbar schnelle und in späten Phasen sehr stark ausgeprägte Degeneration der Retina zeigten Lewis-Ratten, die im Alter von drei Wochen thymektomiert und zwei Wochen später mehrfach mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (mAk OX-8, -38 oder -52) behandelt und infiziert worden sind. Immunhistologische Untersuchungen bei mit monoklonalen Antikörpern behandelten Virusträgern im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit bestätigten die bereits geäußerte Vermutung, daß durch eine Antikörper-Behandlung zwar eine ausreichende Immunsuppression erreicht wird, um die Pathogenese der Bornan Krankheit zu verhindern, jedoch eine Restaktivität auf T-Zellebene erhalten bleibt, was sich darin äußert, daß durch diese gemeinsam mit den von der Behandlung nicht direkt betroffenen B-Lymphozyten ein Immundruck aufrechterhalten wird, der dazu führt, daß kein BDV-spezifisches Antigen in der Peripherie feststellbar ist (Sobbe, 1996). Diesen Umstand beobachtet man nur bei immunkompetenten Virusträgern oder solchen, die mit nur einer hohen Dosis Cyclophosphamid behandelt worden sind und bei denen es nach nur kurzzeitiger Suppression zu einer Regeneration des Immunsystems kommt (Planz, 1993; Sobbe, 1996; Nöske, 1996). Solch eine Regeneration konnte auch bei den Antikörper-behandelten Tieren mithilfe immunhistochemischer Färbungen nachgewiesen werden, was sich in einer erheblichen Infiltration der Retina mit CD4+ und CD8+ T-Zellen, sowie ED3-positiven Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems in späteren Phasen des Untersuchungszeitraumes (2,5 und 6,5 Monate p.i.) äußerte (Eigene Untersuchungen; Ergebnisse nicht dargestellt).

Die immunhistochemischen Untersuchungen bei den neugeborenen BDV-infizierten Tieren zeigten, daß CD8+ T-Zellen lediglich in den recht frühen Zeiträumen zwischen sechs und zwölf Wochen p.i. in sehr geringer Anzahl nicht regelmäßig auftauchend in

der inneren plexiformen oder inneren Körnerschicht zu finden sind. CD4+ Zellen sind in geringer Anzahl vier und sechs Wochen p.i. zunächst eher in den peripheren, später auch in zentralen Anteilen der Retina zu finden, wobei vorwiegend die Ganglienzellschicht mit ihren beiden benachbarten Schichten, vereinzelt auch mal die Photorezeptorenschicht oder auch die innere Körnerschicht betroffen ist. Im weiteren Verlauf stellte sich die Retina weitestgehend negativ dar. Im Glaskörper findet man über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg morphologisch eindeutig identifizierbare Makrophagen, die zumeist direkt der Retina aufgelagert zu finden sind. Deren Anzahl ist ebenfalls parallel zum Auftreten CD4+ Zellen in den Retinaschichten selber sechs und acht Wochen p.i. erhöht. In der Retina handelt es sich zumindest teilweise um CD4+ Lymphozyten. Ob ein Teil der immunhistologisch markierten Zellen auch möglicherweise dem Makrophagen-/Mikroglia-System zugerechnet werden kann, ist nicht eindeutig, erscheint jedoch als möglich, zumal ED3-positive Zellen zeitgleich in den entsprechenden Schichten nachweisbar sind und CD4-Antigen in der Vergangenheit auch auf Peritoneal-, Lymphknoten- und Leber-Makrophagen entdeckt worden ist (Barclay, 1981; Jefferies et al., 1985); deswegen sind im Gehirn BDV-infizierter Ratten nachgewiesene lymphozytendifferente, CD4- und ED1-kreuzreaktive Zellen dem Makrophagen-/Mikroglia-System zugerechnet worden (Deschl et al., 1990) - ED1 ist eine Antikörper mit Spezifität für Monozyten und Gewebemakrophagen (Dijkstra et al., 1985), wird jedoch auch von Mikrogliazellen exprimiert (Graeber et al., 1990; Gehrmann et al., 1992; Schwerdtfeger, 1994). Während in früheren Untersuchungen an neugeborenen BDV-infizierten Lewis-Ratten keine Anzeichen einer entzündlichen Infiltration des Gehirns oder des Auges gefunden wurden, jedoch auch nicht die Möglichkeit ausgeschlossen worden ist, daß eine geringe Anzahl inflammatorischer Zellen möglicherweise in den H.E.-Färbungen unberücksichtigt bleiben würde (Narayan et al., 1983a, b; Herzog et al., 1984; Carbone et al., 1991a), ließen sich diese Ergebnisse in aktuellen, parallel laufenden Untersuchungen, bei denen jedoch im Gegensatz zu den älteren Untersuchungen immunhistochemische Färbungen ausgewertet worden sind, am Gehirn nicht wiederholen (Sauder und de la Torre; 1999; Hornig et al., 1999). Sauder und de la Torre (1999) beobachteten an den Tagen 22 und 33 p.i. milde, perivaskuläre Infiltrate bevorzugt im Cortex, weniger stark ausgeprägt im Kleinhirn und konnten über den Tag 48 p.i. hinaus nur sehr selten solche finden. Insgesamt fanden sie über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg bei den neugeborenen BDV-infizierten Ratten

im Hirnparenchym eine gegenüber Kontrolltieren geringgradig erhöhte Anzahl einzelner CD2+ Zellen. Das CD2-Molekül ist ein Antigenrezeptor aller T-Zellen, kann jedoch auch von Gewebsmakrophagen exprimiert werden, so daß die beobachtete CD2-Immunreaktivität auch durch letztere bedingt sein könnte. Deshalb wurden Analysen mit Hilfe der RPA-Methode (ribonuclease protection assay), bei der die Expression der RNA für die δ -Kette des CD3-Komplexes, einem Teil des T-Zell-Rezeptorkomplexes (T3 delta RNA), quantitativ erfaßt werden, durchgeführt, die die immunhistochemischen Ergebnisse bestätigten, wobei jedoch nur bei manchen Tieren an Tag 22 und 33 p.i. eine im Vergleich zu Kontrolltieren leicht erhöhte T3 delta RNA Expression gemessen werden konnte. Dabei erreichte die Expression im Cortex bis zu 25 %, im Kleinhirn und im Hippocampus ca. 10 % der Expression, die in Gehirnen adult BDV-infizierter Ratten mit akuter BD gefunden wird. Die Ergebnisse dieser Untersuchung ähneln den eigenen Beobachtungen einer schwach ausgeprägten vorübergehenden entzündlichen Infiltration der jeweils untersuchten Anteile des ZNS, wobei zwar zeitliche Differenzen bezüglich des zeitlichen Auftretens von Infiltraten, entscheidender jedoch Unterschiede bezüglich der Ausprägung der perivaskulären Infiltrate, klinischer Erscheinungen, als auch in 10 % der Fälle aufgetretener Mortalität auffällig sind. In den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden keine perivaskulären Infiltrate beobachtet, weder kam es zu Todesfällen, noch zu klinischen Erscheinungen einer BD. Äquivalente Beobachtungen bezüglich klinischer Erscheinungen beschrieben Hornig und Kollegen (1999), die lediglich subtile Zeichen einer Dysfunktion des ZNS fanden. Diese hatten in Pilotstudien Hinweise darauf gefunden, daß die Erkrankung des ZNS eher nach dem Muster einer BD adult BDV-infizierter Tiere abläuft, falls die Infektion später als zwölf Stunden nach der Geburt erfolgt oder eine Virussuspension mit niedrigerem Titer verwendet worden ist. Auch Sauder und de la Torre (1999) zogen selber in Betracht, daß unterschiedlich lange Zeiträume zwischen Geburt und Infektion zu Variationen in der klinischen Manifestation und den unterschiedlich ausgeprägten vorübergehenden Inflammationen beitragen könnten – zumal die Infektion in der Regel innerhalb der ersten 18 Stunden, ein Wurf jedoch erst zwischen 18 und 24 Stunden nach der Geburt infiziert worden ist, von dem fünf Ratten klinische Symptome entwickelten. Die in diesen Untersuchungen verwendete Virusisolierung und deren vorherige Passagen, als auch mögliche genetische Unterschiede unter den Lewis-Ratten aus unterschiedlichen Quellen mögen nach der Einschätzung der Autoren bei der

Entwicklung einer BD bei neugeborenen infizierten Tieren eine Rolle spielen, zumal auch die untersuchten adult BDV-infizierten Ratten keine charakteristische, BD-spezifische, klinische Symptomatik trotz Zellinfiltration zeigten, was letztere Annahmen zu unterstützen scheint.

Adult BDV-infizierte Kontrollen bleiben in der Arbeit von Hornig und Kollegen (1999) unberücksichtigt. Bei den neugeborenen BDV-infizierten Ratten wurden auch in diesen Untersuchungen mit der vierten Woche beginnend moderate, teils sogar deutliche mononukleäre Infiltrate im Cortex beschrieben, die sich bis zur fünften Woche deutlich reduzierten und bis zur sechsten Woche wieder gänzlich verschwunden sind, während u.a. im Hippocampus und im Kleinhirn nur sehr spärlich Entzündungszellen zu finden waren. Die perivaskulären Infiltrate bestanden in erster Linie aus T-Lymphozyten, wobei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in beinahe gleichem Umfang beobachtet wurden. Diese doch recht deutliche Infiltration mit Entzündungszellen unter Ausbildung von perivaskulären Infiltraten kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht gestützt werden, da die oben beschriebenen perivaskulären Infiltrate des Gehirns in der der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Versuchsgruppe bei der Retina nur in einem Fall eines nicht weiter berücksichtigten Ausreißers gefunden wurden (Ergebnisse nicht dargestellt). Die in ihrer Deutlichkeit auch ohne immunohistochemische Färbungen unschwer zu erkennenden, perivaskulären Infiltrate wurden auch in den im Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten Kontrolluntersuchungen am Gehirn nicht bzw. in weitaus geringerem Ausmaß gefunden, während in früheren, aber auch relativ aktuellen Untersuchungen dies gar nicht beschrieben worden ist (Narayan et al., 1983a, b; Herzog et al., 1984; Carbone et al., 1991a; Nöske, 1996). Auch die von Hornig und Kollegen (1999) dargestellte äquivalent hohe Beteiligung beider CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellsubpopulationen an den Infiltraten kann für den Bereich der Retina nicht bestätigt werden, da in der Netzhaut neugeborenen infizierter Tiere CD8⁺ T-Zellen in deutlich geringerem Ausmaß zu finden waren. Trotz der von Hornig und Kollegen (1999) relativ deutlich gefundenen inflammatorischen Infiltration scheint deren Bedeutung unklar bzw. fragwürdig, da z.B. Gyrus dentatus, als auch das Kleinhirn diejenigen Strukturen darstellen, die bei weitgehender Abwesenheit von Infiltraten in diesem Modell am stärksten von atrophischen Schäden betroffen sind. Darüberhinaus sind Verhaltensstörungen noch vor Auftreten von Infiltraten und desweiteren auch degenerative Erscheinungen in Form von Apoptose der Neuronen nach Auflösung der kortikalen Inflammation beschrieben

worden. Darüberhinausgehende Untersuchungen in Form von Zytotoxizitätstests und Studien an thymektomierten Ratten zeigten, daß diese T-Zellen weder spezifisch für BDV-Antigen waren, noch einen Anteil an der Degeneration hatten, die im Gyrus dentatus, im Kleinhirn oder im Cortex zu beobachten ist (Hornig et al., unveröffentlichte Ergebnisse, 1999). Daher scheinen die T-Zellen in diesem Modell unspezifisch zu sein, da es die Möglichkeit gibt, daß eine kleine Anzahl aktivierter T-Zellen in das ZNS unabhängig einer Antigen-Spezifität einwandert (Hickey, 1991) oder T-Zellen wiederholt durch das ZNS zirkulieren, ohne daß sie aktiviert worden wären (Seabrook et al., 1998). Eine eher untergeordnete Bedeutung der zeitlich limitierten, lymphozytären Infiltration wird unterstützt durch verschiedene weitere Beobachtungen. So entsprach der Grad der Inflammation bei Tieren gleichen Alters und ähnlicher Zytokinexpression nicht unbedingt untereinander. Auch das in Hippocampus und Cerebellum gefundene Niveau an Zytokin-RNA ähnelte dem adult BDV-infizierter, immunkompetenter Tiere mit schwerer lymphozytärer Infiltration des ZNS, obgleich die der Anzahl inflammatorischer Zellen entsprechende T3 delta RNA Expression bei den neugeborenen infizierten Ratten zumindest zehnfach niedriger eingestuft worden ist. Während bei diesen lediglich im Cortex eine zeitliche Übereinstimmung der Zytokin-RNA-Expression mit dem Grad der Entzündung zu finden war, traf auch dieses für Hippocampus und Cerebellum nicht zu (Sauder und de la Torre, 1999). Ähnliche Ergebnisse beschrieben auch Hornig und Kollegen (1999). Schon in Folge früherer Transfer-Experimente war die Hypothese entwickelt worden, daß CD4⁺ T-Zellen im Gehirn klinisch gesunder Rezipienten mehrheitlich nicht antigen-spezifisch seien. So hing die Entwicklung BD-spezifischer Symptome bei den Rezipienten nicht von dem Auftreten CD4⁺ T-Zellen ab, jedoch von dem Vorhandensein CD8⁺ T-Zellen, was durch die weder aufgetretene Enzephalitis, noch durch eine BD-typische Klinik bei mit Antikörpern gegen CD8⁺ T-Zellen behandelten Rezipienten bestätigt wurde. Die bei diesen Tieren aufgetretenen perivaskulären Infiltrate – bestehend aus CD4⁺ T-Zellen – konnten alleine offensichtlich keine Erkrankung auslösen (Planz et al., 1995). Ähnliche Ergebnisse sind auch bei TGF β -behandelten Ratten beschrieben worden (Stitz et al., 1991b). Daher scheint auch für die Situation in der Retina neugeborenen infizierter Tiere die Bedeutung der nur spärlich infiltrierten T-Zellen lediglich als geringgradig eingeschätzt werden zu können.

Bei den CSA-behandelten Virusträgern sind im ersten Monat p.i. weder CD4+, noch CD8+ T-Lymphozyten in der Retina nachweisbar; mit diesen Ergebnissen übereinstimmend sind auch im Gehirn BDV-infizierter CSA-behandelter Tiere weder durch RT-PCR, noch immunhistologisch ein bis vier Wochen p.i. CD8-spezifische mRNA bzw. CD8+ T-Zellen nachgewiesen worden (Nöske, 1996), während bei adult-infizierten immunkompetenten Lewis-Ratten zwischen Tag 11 und Tag 35 p.i. mittels RT-PCR mRNA für CD8 im Gehirn nachgewiesen werden konnte (Sobbe, 1996). Jedoch fand man in jener Untersuchung mit CSA-immunsupprimierten Virusträgern zu späteren Zeitpunkten bis 17 Monate p.i. hauptsächlich im Hippocampus, jedoch auch im Cortex lokalisierte geringgradige diffuse entzündliche Infiltrate aus CD4+ und CD8+ T-Zellen (Nöske, 1996), was sich nun auch in der Retina in Form von nur sehr vereinzelt auftretenden CD4+ und CD8+ Zellen zwischen drei und 17 Monate p.i. bestätigt. Da in vorangegangenen Untersuchungen in Zeiträumen von bis zu 60 Wochen p.i. weder klinische noch pathologische Anzeichen einer Enzephalitis beobachtet wurden (Stitz et al., 1989; Rubin et al., 1999b), ist anzunehmen, daß möglicherweise infolge fehlender immunhistochemischer Kontrollfärbungen - wie auch bei anderen älteren Untersuchungen mit verschiedenartig immunsupprimierten, BDV-infizierten Tieren - schwach ausgeprägte entzündliche Infiltrationen nicht erkennbar waren. Eine solche minimale Anzahl an Entzündungszellen im Gehirn und in der Retina beschrieben Narayan et al. (1983b) – entsprechend der heute bekannten Regeneration des Immunsystems (Planz, 1993; Sobbe, 1996; Nöske, 1996) - bei ihren einmalig mit Cyclophosphamid behandelten Versuchsgruppen nach Untersuchungen von H.E.-Schnitten, wobei aber auch hier angenommen werden kann, daß das wahre Ausmaß der entzündlichen Infiltration erst durch Verwendung immunhistochemischer Färbungen eindeutig einzuordnen gewesen wäre. In der Retina sind entsprechend bei solchen Versuchsgruppen vorangegangenen Beobachtungen im Gehirn (Planz, 1993; Sobbe, 1996; Nöske, 1996) perivaskuläre Infiltrate mit CD4+ und CD8+ T-Zellen gefunden worden. An Tag 37 p.i. war diese Infiltration am stärksten ausgeprägt, während schon ca. zehn Tage später eine deutliche Reduktion der enzephalitischen Erscheinungen eingetreten ist, was sich bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes weiter fortgesetzt hat. Die in dieser Versuchsgruppe aufgetretenen entzündlichen Erscheinungen sind im Vergleich zu immunkompetenten Virusträgern sehr viel schwächer ausgeprägt, wobei in der vorliegenden Untersuchung nur Tiere verwendet worden sind, die keine BD-typische

Klinik aufwiesen. Dagegen bildete ein Tier aus dieser Versuchsreihe ebenfalls 37 Tage p.i. eine wesentlich stärkere Enzephalitis aus, was sich jedoch sowohl in der Klinik als auch in der Bildung von Antikörpern widerspiegelte. Bei den BDV-infizierten, über vier Wochen mit einer geringeren Dosis Cyclophosphamid behandelten Ratten wurden im Zeitraum der ersten vier Monate p.i. immunhistochemisch keine CD4+ oder CD8+ T-Lymphozyten in der Retina gefunden, was dafür spricht, daß die in dieser Art vorgenommene Immunsuppression sehr effektiv ist. Bei dem nach ca. einem halben Jahr p.i. getöteten Tier sind kaum immunreaktive Zellen zu finden bis auf sehr vereinzelte CD4+ und CD8+ Zellen, wobei nur vermutet werden kann, daß es sich zumindest bei den CD4+ Zellen z.T. auch um Makrophagen handeln könnte, da das morphologische Erscheinungsbild eher auf letztere hindeuten mag; die Morphologie kann letztlich alleine nicht als Unterscheidungskriterium herangezogen werden, weswegen in weiterführenden Untersuchungen immunhistochemische Doppelfärbungen hilfreich wären. Daß Makrophagen mit OX-38-Antikörpern immunhistochemisch nachgewiesen werden können, haben frühere Untersuchungen gezeigt, in denen CD4-Antigen auf Peritoneal-, Lymphknoten- und Leber-Makrophagen entdeckt worden sind (Barclay, 1981; Jefferies et al., 1985); deswegen sind auch im Gehirn BDV-infizierter, immunkompetenter Ratten lymphozytendifferente, CD4+ Zellen dem Makrophagen-/Mikroglia-System zugerechnet worden (Deschl et al., 1990). In Bezug auf das Gehirn ist in vorangegangenen Experimenten festgestellt worden, daß eine tägliche Gabe von 10 mg/kg KG Cyclophosphamid i.p. über 30 Tage an BDV-infizierten Lewis-Ratten zwar über einen Zeitraum von neun Monaten BDV-spezifische klinische Symptome unterdrückt, jedoch das Auftreten von entzündlichen Infiltraten im Gehirn bei dieser Dosierung nicht gänzlich, aber über einen langen Zeitraum bis zu ca. vier Monate p.i. verhindern konnte, ohne daß diese Infiltrate zu einer BD-spezifischen klinischen Manifestation geführt hätten. Eine fehlende Milzatrophy über drei Monate p.i. ließ darauf schließen, daß sich zu diesem Zeitpunkt das Immunsystem der Tiere vollständig regeneriert hatte, was ein allgemein zu beobachtender Befund war. Dennoch kam es zu späteren Zeitpunkten nach Infektion bei den Cyclophosphamid-immunsupprimierten Virusträgern nicht zur Ausbildung einer BD-spezifischen klinischen Symptomatik (Nöske, 1996).

Die durch die CSA-Behandlung erreichbare antigenspezifische Toleranz und die daraus resultierende ausbleibende Immunpathologie bei persistierender Virus-

infektion erscheint derjenigen Situation vergleichbar, die bei neugeborenen BDV-infizierten Tieren durch Fremdartigeninokulation vor dem Erreichen einer immunologischen Kompetenz erreicht wird, was möglich ist, da Ratten in einem relativ frühen Stadium der Entwicklung mit noch unzureichend funktionierendem Immunsystem geboren werden (Stitz et al., 1995). Bei der CSA-Behandlung kommt es nicht zu einer Unterdrückung des Immunsystems z.B. durch einen toxischen Effekt (Stitz, 1992), wodurch eine 100 %ige Aufhebung aller immunpathologischen Prozesse gegen ein Fremdartigen sicherlich nicht möglich wäre, sondern durch „Überlistung“ des Immunsystems zu einer Toleranz des Fremdartigen, denn Untersuchungen an Mäusen ergaben, daß die Immunabwehr gegenüber einem anderen Fremdartigen weiterhin aktiv bleibt, meßbar an einer zytotoxischen T-Zellaktivität (Stitz, 1992). Die Ähnlichkeiten der immunologischen Toleranz gegenüber BDV zeigt sich auch in der vergleichbaren Virusausbreitung und -verteilung bei CSA-behandelten und neugeborenen BDV-infizierten Tieren (Stitz et al., 1998). Entsprechend verläuft auch die Retinadegeneration in beiden Versuchsgruppen in ähnlicher Geschwindigkeit ab.

Im Gegensatz zum Vergleich bei neugeborenen infizierten Tieren gibt es Parallelen zwischen BDV-infizierten Ratten und LCMV-infizierten Mäusen nach Immunsuppression durch CSA-Behandlung: bei der LCMV handelt es sich wie bei der BDV um eine immunpathologische Erkrankung, für die ebenfalls CD8+ T-Zellen verantwortlich sind (Cole et al., 1983; Bänziger et al., 1986; Doherty et al., 1990). Eine CSA-Behandlung resultiert im Ausbleiben der immunpathologischen Erkrankung während des neun Monate laufenden Untersuchungszeitraums ohne immunologische Reaktionen im Gehirn., wobei das LCMV, welches nicht zytopathogen ist, in den Versuchstieren persistiert (Stitz, 1992). Auch in der Retina bleiben nach Immunsuppression Veränderungen aus (Übersicht bei Geiß, 1988). Dagegen sind bei BDV-infizierten immunsupprimierten Tieren spätere degenerative Veränderungen zu finden.

In beiden Tiermodellen ist die Immunantwort gegen leicht oder gar nicht zytopathogene Viren die Ursache der Erkrankung. Völlig gegensätzlich dazu stellt sich die Situation mit und ohne Immunsuppression durch Cyclophosphamid bei der okulären murinen Zytomegalievirus (MCMV)-Infektion dar. Ein intaktes Immunsystem führt zur Beseitigung jeglicher Viren in der Retina ohne oder mit nur minimalen Veränderungen der retinalen Architektur, während eine Immunsuppression eine Viruspräsenz in den meisten retinalen Schichten ermöglicht mit der Folge einer häufig hämorrhagischen Nekrose und ausgeprägtem Zerfall der retinalen Struktur (Bale et al., 1991).

Die starke zytopathogene Eigenschaft des MCMV in diesem Modell wird erst bei ausbleibender Immunantwort bedeutsam. Während das Immunsystem bei der BD und LCM einen zerstörerischen, die Krankheit auslösenden Charakter hat, besitzt es bei der MCMV einen protektiven.

Die immunhistochemische Untersuchung mit dem ED3-Antikörper ergab, daß bei den neugeborenen BDV-infizierten Ratten nach einem unauffälligem Befund vier Wochen p.i. zu allen Untersuchungszeitpunkten immunreaktive Zellen in der Retina nachweisbar sind. Parallel zu der temporären schwachen diffusen Infiltration mit CD4+ und vereinzelt auch CD8+ Lymphozyten ist auch die Anzahl der ED3-positiven Zellen im zweiten Monat p.i. vornehmlich von der Nervenfaserschicht bis einschließlich innerer plexiformer Schicht leicht erhöht. Auffällig ist eine Konzentration an Gefäßen besonders der Nervenfaser- und Ganglienzellschicht. Jedoch zeigt schon die immunhistochemische Untersuchung des unbehandelten Kontrolltieres eine schwache positive Reaktion von Zellen der Nervenfaserschicht, als auch von Zellen im Bereich von Gefäßen (Ergebnis nicht dargestellt). Neben dem den eigenen Ergebnissen entsprechenden Nachweis von ED3-Immunreaktivität entlang der inneren Grenzmembran und perivaskulär (Zhang et al., 1997) ist auch die Expression verschiedener Makrophagen-Marker wie ED1 oder OX-42 in den inneren Schichten der Retina unbehandelter Ratten nachgewiesen worden (Yang et al., 1996; Zhang et al., 1997), wobei der Antikörper ED1 bei der Borna-Enzephalitis eher ruhende Mikrogliazellen (Schwerdtfeger, 1994) und OX-42 sowohl aktivierte, als auch in weniger intensiver Färbung ruhende Mikroglia markiert (Hornig et al., 1999). Der ED3-Antikörper reagiert mit Zellen des Monozyten-/Makrophagen-Systems (Dijkstra et al., 1985), darüberhinaus mit insbesondere aktivierten, jedoch in schwächerer Reaktion auch mit ruhenden Mikrogliazellen (Graeber et al., 1990; Gehrman et al., 1992; Schwerdtfeger, 1994), weswegen die Reaktion beim unbehandelten Kontrolltier nur sehr schwach ausfällt. Aufgrund des Vorkommens von CD4-Antigen auf verschiedenen Makrophagen (Barclay, 1981; Jefferies et al., 1985) sind Kreuzreaktionen mit Anti-CD4-Antikörpern möglich (Deschl et al., 1990). Bei der Gruppe mit den über vier Wochen mit Cyclophosphamid behandelten Virusträgern sind nur leichte Differenzen zu der vorherigen Gruppe zu nennen: bereits nach einem Monat p.i. sind wenige ED3-positive Zellen nachweisbar und zum Ende des Untersuchungszeitraumes sechs Monate p.i. ist eine etwas ausgeprägtere Infiltration mit Zellen des

Makrophagen-/Mikroglia-Systems zu beobachten. Erklären ließe sich dieses mit der in der Gruppe der Cyclophosphamid-behandelten Tiere schneller und umfangreicheren Atrophie, was in der Konsequenz bedeuten würde, daß zumindest eine entsprechend höhere Phagozytoseleistung zur Beseitigung des nekrotischen Zellmaterials notwendig wäre. Auch in der letzten Gruppe der CSA-behandelten Tiere sind ED3-positive Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-Systems durchweg in vergleichbarer Art nachweisbar. Eine stärkere Infiltration im Verlaufe des zweiten Monats läßt sich hier nicht beurteilen, da erst drei Monate p.i. die nächste immunhistochemische Kontrolle durchgeführt worden ist. Zum Ende des Untersuchungszeitraumes scheint ähnlich der vorangegangenen Gruppe auch in der letzten Versuchsreihe eine weiter fortgeschrittene Degeneration der Körnerschichten mit einer erhöhten Anzahl von Zellen mit immunreaktiven Zellfortsätzen zu korrespondieren. Eine bei Gerbil-Mäusen angenommene Suppression der mikroglialen Aktivität durch CSA (Kondo et al., 1995) war in der vorliegenden Untersuchung bei Lewis-Ratten im Vergleich mit den anderen immuninkompetenten Versuchsgruppen zumindest für den ersten Monat p.i., in dem die Ratten mit CSA behandelt worden sind, anhand der immunhistochemischen Färbungen nicht auffällig.

Schon in den frühen Untersuchungen über neugeborene BDV-infizierte Ratten hatte man im Gehirn eine schwere Gliose festgestellt, die über den spätesten Untersuchungszeitpunkt 44 Wochen p.i. hinaus andauerte. In der Folge der neuronalen Degeneration im Gyrus dentatus findet ein Ersatz des zugrundegegangenen Gewebes durch reaktive Gliazellen statt (Carbone et al., 1991a). In einer neueren Veröffentlichung ist ab der dritten Woche p.i. eine Mikrogliose in allen Hirnregionen nachweisbar. Dabei geht der Beginn und die Verbreitung der Gliazell-Proliferation mit dem Verlust an Neuronen einher. Die Morphologie der mit dem Antikörper OX-42 angefärbten Mikroglia entsprach derjenigen aktivierter Zellen: vergrößertes Zytoplasma, kurze, dicke Fortsätze, intensive Färbung mit OX-42. Eine Fortdauer der Mikrogliose beobachtete man bis über die 76. Woche p.i. hinaus (Hornig et al., 1999). Eine parallele Untersuchung mit dem ED1-Antikörper beschreibt darüberhinaus eine gesteigerte Immunreaktivität ca. ein bis eineinhalb Monate p.i. (Sauder und de la Torre, 1999), die mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit an der Retina vergleichbar ist. Gemäß früheren Untersuchungen entsprechen die ED1-gefärbten Zellen jedoch zum größten Teil ruhenden, ramifizierten Mikrogliazellen vom Typ 1,

während der hier verwendete ED3-Antikörper überwiegend aktivierte Mikroglia vom Typ 2 und 3, weniger deutlich den ruhenden Typ 1 anfärbt (Schwerdtfeger; 1994). Eine vermehrte Ansammlung aktivierter Mikroglia in der Nachbarschaft von Gefäßen, wie sie häufig zu beobachten war, wurde auch in der Retina immunkompetenter Virusträger nachgewiesen, wobei ähnlich der eigenen, auch in dieser Untersuchung Mikroglia bevorzugt in den inneren Retinaschichten – Ganglienzell- und innere plexiforme Schicht – zu finden war (Kacza et al., 2000). Die schon für immunkompetente BDV-infizierte Ratten demonstrierte Phagozytoseaktivität durch aktivierte Mikroglia (Kacza et al., 2000) scheint auf die Situation immuninkompetenter Tiere übertragbar.

Bezüglich der immunhistochemischen Untersuchung der MHC-I-Expression fällt auf, daß Gefäße sowohl beim uninfizierten Kontrolltier (Ergebnis nicht dargestellt), als auch bei immunkompetenten wie immuninkompetenten Versuchsgruppen positiv markiert werden. Dies stimmt mit einer früheren Untersuchung überein, in der bei unbehandelten Lewis-Ratten eine MHC-I-Expression der retinalen Endothelzellen nachgewiesen worden ist (Zhang et al., 1997).

Bei den immuninkompetenten Virusträgern war auffällig, daß, falls der N.opticus im Präparat zu sehen ist, im Bereich des Überganges von der Nervenfaserschicht in den Nerv – neben einer diffusen Grundfärbung - eine überproportional große Anzahl an Zellen MHC-I exprimieren, wobei es nun unabhängig davon zu sein scheint, ob dies relativ früh– im zweiten Monat p.i. – oder mit einer Beobachtungsdauer von 17 Monaten erst sehr spät nach Infektion ist. Darüberhinaus zeigen auch die Gefäße der Nervenfaserschicht, falls zu sehen, eine Immunreaktion.

Bei allen immuninkompetenten Gruppen kommt es im Laufe der Zeit zu einer diffusen Färbung fast der gesamten Retina. Während bei den mit Cyclophosphamid behandelten Virusträgern noch innerhalb des ersten Monats sich in ersten Abschnitten alle Neuronenschichten einschließlich der dazwischenliegenden plexiformen Schichten diffus immunreaktiv darstellen – und hierbei hebt sich die innere Körnerschicht von den anderen etwas ab - , sind bei den neugeborenen infizierten oder CSA-behandelten BDV-infizierten Tieren erst die beiden plexiformen Schichten und nur in wenigen Abschnitten bzw. nur recht schwach die innere Körner- oder die Ganglienzellschicht angefärbt. Im Laufe des zweiten und dritten Monats ist diese Grundfärbung bei allen immuninkompetenten Gruppen zumindest in Teilen in jeder Neuro-

nenschicht erkennbar. Dies scheint darauf hinzuweisen, daß - wie schon bei adult infizierten Tieren sowohl im Gehirn (Bilzer und Stitz, 1993, 1994; Carbone et al., 1991a), als auch in der Retina bekannt - die Neuronen in der Retina BDV-infizierter, immuninkompetenter Tiere - wenn auch nur schwach - MHC-I-Antigen exprimieren. Bei der mit einer hohen Dosis Cyclophosphamid immunsupprimierten Gruppe findet man entsprechend der schon festgestellten vorübergehenden Immunantwort angefärbte Infiltrate. Darüberhinaus gibt es jedoch bei allen immunsupprimierten Gruppen im Verlaufe des ersten Monats meist im Bereich der inneren Körner- oder aber in deren Nachbarschichten einschließlich der Ganglienzellschicht einzelne stärker MHC-I exprimierende Zellen. Bei einem Teil der positiven Zellen kann es sich dabei um Endothelzellen oder aber auch um perivaskulär gelegene Mikrogliazellen handeln. Dies scheint besonders für die neugeborenen infizierten und die CSA-behandelten Tiere zu gelten, bei denen die innere Körnerschicht weniger und erst später betroffen ist und im ersten Monat p.i. eher Zellen im Bereich von Gefäßen der Ganglienzell- und äußeren plexiformen Schicht angefärbt sind. Im weiteren Verlauf findet man bei allen immuninkompetenten Gruppen immunreaktive Zellen vereinzelt auch in den beiden äußeren Schichten, während zumeist in der inneren Körnerschicht auch kleine, lockere Gruppen positiver Zellen zu beobachten sind. Bei den Gruppen, die über ein Jahr kontrolliert worden sind (neugeborenen infizierte und CSA-behandelte Virusträger), ist eine deutliche Reduktion der MHC-I-Expression nachweisbar, was sich sowohl in der diffusen Grundfärbung, als auch in der Anzahl immunreaktiver Zellen widerspiegelt.

Neben der Darstellung auf Neuronen und infiltrierten inflammatorischen Zellen ist die Expression von MHC-I-Antigen im Gehirn adult BDV-infizierter Tiere auch auf Astrozyten sowohl in vivo, als auch in vitro nachgewiesen worden (Bilzer und Stitz, 1993, 1994; Carbone et al., 1991a). In der Retina stellen die Astrozyten nur einen Vertreter der Gliazellen dar, die sich aufgrund verschiedener entwicklungsgeschichtlicher Herkunft in drei Gruppen unterteilen lassen: die Müllerschen Stützzellen entstammen gemeinsam mit den retinalen Neuronen pluripotenten Vorläuferzellen (Cepko, 1995), die retinalen Astrozyten (Typ-1-Astrozyten) finden sich in der Nervenfaserschicht und wandern vom N. opticus in die Retina (Shaw und Weber, 1983; Ling und Stone, 1988; Huxlin et al., 1992), und die Mikroglia entwickelt sich vermutlich aus Monozyten-Vorläuferzellen (Linden et al., 1986; Hickey und Kimura, 1988). In-vitro-Untersuchungen mit kultivierten retinalen Gliazellen zeigten, daß diese nach Induktion

durch r(ekombinantes)IFN- γ neben ICAM-1, einem interzellulärem Adhäsionsmolekül, welches die Extravasation und Migration inflammatorischer Zellen beeinflusst, als auch wichtig für die Antigenpräsentation ist (Simmons et al., 1988; Springer, 1990), sowohl MHC-I, als auch MHC-II exprimieren. Diese Fähigkeiten weisen auf eine mögliche bedeutende Rolle dieser Zellen bei lokalen immunologischen und inflammatorischen Vorgängen in der Retina hin (Drescher und Whittum-Hudson, 1996a). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit dem ED3-Antikörper in Verbindung mit den schon dargestellten Fähigkeiten von Gliazellen deuten darauf hin, daß die Gliazellen infolge der BDV-Infektion MHC-I exprimieren. Allerdings scheint es sich bei den ED3-positiven Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-Systems um eine Subpopulation der MHC-I-exprimierenden Zellen zu handeln, da das Vorkommen letzterer Gruppe zwar in den inneren Retinaschichten schwerpunktmäßig jedoch in der inneren Körnerschicht, der Schwerpunkt der ED3-immunreaktiven Zellen eher in den inneren Retinaschichten bis einschließlich innerer plexiformer Schicht liegt. Zwar ist in vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen worden, daß der ED3-Antikörper bei der Borna-Enzephalitis der Ratte nicht nur perivaskulär, sondern auch intraparenchymal Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-Systems markiert (Schwerdtfeger, 1994), jedoch wird dieser Antikörper eventuell nicht alle Mikrogliazellen markieren, weil die Möglichkeit besteht, daß nur aus Knochenmark-Vorläuferzellen stammende Mikroglia, welche perivaskulär lokalisiert zu finden ist, mit diesem Antikörper reagiert. Entsprechende Vermutungen sind bereits für die Antikörper ED1 und ED2 sowohl für Gehirn (Wucherpfennig, 1994), wie für die Retina (Yang et al., 1996) geäußert worden. Auch in der Retina des Menschen gibt es die Unterteilung in die peri- oder paravaskuläre Makrophagen-Antigen-positive und die parenchymale Makrophagen-Antigen-negative Mikroglia, die jedoch beide MHC-Antigen exprimieren können (Provis et al., 1995, 1996). Demnach könnte auch eine möglicherweise vorhandene ED3-negative Subpopulation der Mikrogliazellen, die im ZNS parenchymal auftritt, – oder eventuell auch Müllersche Stützzellen – MHC-I-Antigen exprimieren, was in weiterführenden Versuchen aber noch durch immunhistochemische Doppelfärbungen mit OX-42 für Makrophagen und Mikroglia und/oder dem GFAP (glial fibrillary acidic protein)-Antikörper für die Müllerschen Stützzellen zweifelsfrei nachgewiesen werden müßte. Inwieweit Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen OX-42 und ED3 bestehen, ließe sich ebenfalls durch Doppelfärbungen einschätzen.

Die Möglichkeit einer virus-induzierten Hochregulation von Oberflächenmolekülen durch Müllersche Stützzellen oder anderen retinalen Gliazellen – hier bei der BDV-Infektion eventuell eher letztere Gruppe, da schon bei immunkompetenten Virus-trägern, zwar lediglich für den Verlauf des ersten Monats geltend, Müllersche Stützzellen kaum Auffälligkeiten zeigten (Kacza et al., 2000) – und die damit möglicherweise verbundene Beteiligung an der lokalen Immunantwort wurde schon in der Vergangenheit diskutiert (Drescher und Whittum-Hudson, 1996a). So ist durch die West Nile-Virusinfektion *in vitro* die MHC-I und -II-Antigenexpression auf Astrozyten des ZNS bei der Maus induziert worden (Liu et al., 1989). Desweiteren konnte *in vivo* bei mit Koronaviren infizierten Ratten eine MHC-II-Expression der Astrozyten des ZNS nachgewiesen werden. Dies war sogar möglich bei zunächst IFN- γ -depletierten Tieren, was die Vermutung bekräftigt, daß es einen direkten virus-vermittelten Effekt auf eine MHC-Expression gibt (Massa et al., 1987). Bei der BDV-Infektion gilt bislang nur für die MHC-II-Antigenexpression die Meinung, daß das Virus selber nicht direkt eine Hochregulation dieses Antigens verursachen kann, lediglich über eine Induktion mithilfe von IFN- γ , da weder im Gehirn infizierter Ratten (Stitz et al., 1991a), noch in Astrozytenkulturen *in vitro* (Richt und Stitz, 1992; Planz et al., 1993; Richt et al., 1990) BDV allein in der Lage war, eine MHC-II-Expression zu induzieren. Lediglich in einer älteren Untersuchung war bei neugeborenen BDV-infizierten Tieren zu keinem Zeitpunkt eine MHC-I-Expression im Gehirn zu finden (Carbone et al., 1991a), was jedoch im Widerspruch steht zu den vorliegenden Ergebnissen in der Retina. Darüberhinaus war bei allen immuninkompetenten, BD-infizierten Gruppen auch in immunhistochemischen Kontrollpräparaten des Gehirns eine MHC-I-Expression nachweisbar, was auch im Einklang steht mit *in-vitro*-Untersuchungen, in denen BDV-infizierte, kultivierte Astrozyten jenes Antigen aufwiesen (Planz et al., 1993). Unterstützung erhalten diese Befunde durch *in-vivo*-Untersuchungen an mit r(ekombinantem) TGF- β 2 immunsupprimierten Tieren, bei denen lediglich eine leicht reduzierte MHC-I-Expression erkennbar war (Stitz et al., 1991b), deren Reduktion aber wahrscheinlich auf die ausgebliebene entzündliche Infiltration und der damit auch reduzierten Anzahl antigenexprimierender Zellen zurückzuführen ist.

Die im Glaskörper gut erkennbaren MHC-I-exprimierenden Makrophagen zeigen, daß solche, die auch mittels des ED3-Antikörpers nachweisbar sind, auch in der Retina zu den immunreaktiven Zellen gehören können.

In den Untersuchungen bezüglich des MHC-II-Antigens ist im Verlauf des ersten Monats bei sehr effektiver Immunsuppression keine Expression immunhistochemisch nachweisbar. Nur bei suboptimaler Inhibition des Immunsystems nach einmaliger Gabe von Cyclophosphamid sind MHC-II-exprimierende Zellen in der Retina im Verlauf des ersten Monats zumeist im Bereich von Infiltraten nachweisbar. In den nächsten Monaten sind immunreaktive Zellen auch in den anderen Gruppen dargestellt, wobei zumeist die inneren Schichten, insbesondere die innere plexiforme und die innere Körnerschicht, durchsetzt sind. Mit der vorübergehenden schwach ausgeprägten entzündlichen Infiltration bei den neugeborenen infizierten Tieren treten auch in dieser Gruppe MHC-II-exprimierende Zellen im Laufe des zweiten Monats auf, während die über vier Wochen mit einer geringeren Dosis Cyclophosphamid behandelten Virusträger ein und zwei Monate p.i. völlig unauffällig waren. Letztere Gruppe als auch die mit CSA immunsupprimierten Tiere weisen jedoch zu späteren Zeitpunkten ab drei Monate p.i. eine gegenüber den neugeborenen infizierten Ratten höhere Anzahl MHC-II-exprimierender Zellen auf; bei letzteren sind zu späteren Untersuchungszeitpunkten lediglich ganz vereinzelt immunreaktive Zellen in den inneren Schichten zu beobachten.

Wenn die Nervenfaserschicht deutlich sichtbar ist oder der Übergang in den N. opticus im Präparat getroffen ist, sind hier im Bereich von Gefäßen angefärbte Zellen nachweisbar.

Im Glaskörper sind bei den adult infizierten, immunsupprimierten Tieren MHC-II-exprimierende Zellen zum großen Teil in nachbarschaftlicher Beziehung zur Retina zu finden, die von der Morphologie her als Makrophagen einzuordnen sind. Bei den mit einer Einzeldosis suboptimal immunsupprimierten Virusträgern treten diese am frühesten und im stärksten Maße auf. Bei den über vier Wochen mit einer geringeren Dosis behandelten Tieren und in einer noch reduzierteren Form bei der CSA-behandelten Gruppe sind erst zu späteren Zeitpunkten ab drei Monate p.i. in geringerer Anzahl entsprechende MHC-II-exprimierende Zellen zu beobachten. Daß es sich im Glaskörper wahrscheinlich um Makrophagen handelt, wird durch den hohen prozentualen Anteil der Zellen mit ED3- und/oder OX-38-positiver Immunreaktion unterstützt.

Während in Kontrolluntersuchungen am Gehirn bei allen immuninkompetenten Virusträgern ebenfalls die Existenz MHC-II-exprimierender Zellen nachweisbar war (Ergebnisse nicht dargestellt), waren frühere immunhistochemische Untersuchungen

bei neugeborenen infizierten, als auch bei mit CSA immunsupprimierten Virusträgern negativ (Carbone et al., 1991a; Stitz et al., 1991a). Wie schon bei der den eigenen Ergebnissen entgegenstehenden Untersuchung bezüglich der MHC-I-Expression wurde bei den neugeborenen infizierten Tieren auch keine MHC-II-Expression gefunden (Carbone et al., 1991a), wobei jedoch - wie auch bei der Kontrolle der CSA-behandelten Virusträger (Stitz et al., 1991a) - keine Angaben über den Beobachtungszeitraum gemacht worden sind. Es wäre denkbar, daß im Rahmen dieser älteren Untersuchungen nur der Zeitraum, in dem bei den immunkompetenten Virusträgern eine akute Immunantwort auftritt, immunhistochemisch kontrolliert worden ist und aufgrund der im ersten Monat fehlenden Immunreaktivität - was den eigenen Ergebnissen entspricht - Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten in der Annahme weiterhin fehlender MHC-Expression nicht weiter fortgeführt worden sind, zumal für die Autoren keine offensichtliche Infiltration von Entzündungszellen zu späteren Zeitpunkten erkennbar war, da in beiden Untersuchungen keine immunhistochemischen Kontrollfärbungen zum Nachweis von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Lymphozyten durchgeführt worden sind.

Für das Gehirn ist im Zusammenhang mit der BDV-Infektion die Expression von MHC-II-Antigen durch infizierte Astrozytenkulturen nicht spontan, jedoch nach Stimulation mittels IFN- γ nachgewiesen worden (Richt et al., 1990; Richt und Stitz, 1992; Planz et al., 1993). Auch kultivierte retinale Gliazellen exprimierten in einer dosis- und zeitabhängigen Weise MHC-II-Antigen nach vorheriger Exposition von IFN- γ , wobei sich die Gliazellen der Retina neben retinalen Astrozyten auch aus Müllerschen Stützzellen und Mikroglia zusammensetzen (Drescher und Whittum-Hudson, 1996a). In-vivo-Untersuchungen an IFN- γ -behandelten Ratten zeigten, daß bis auf eine Subpopulation retinaler Mikroglia weder Müllersche Stützzellen, noch retinale Astrozyten oder sonst eine ortsansässige Zellgruppe MHC-II-Antigen exprimierte. Identische Verteilungsmuster MHC-II-exprimierender und OX-42-positiver Zellen, wobei die Anzahl letzterer Zellen größer war, ließen den Schluß zu, daß es sich bei den MHC-II-exprimierenden Zellen um eine Subpopulation OX-42-positiver Zellen handelt. Weitergehende Untersuchungen mit dem ED1-Antikörper, welche eine Überlappung der Immunreaktion mit OX-6- (Anti-MHC-II-) und OX-42-positiven Zellen offenbarten, führten zu der weiteren Annahme, daß es in der Retina eine Subpopulation dendritischer Zellen mit Charakteristiken von Makrophagen gibt und diese Zellen aus dem Knochenmark stammen. Retinale Mikrogliazellen, beson-

ders die mit der Herkunft aus dem Knochenmark, scheinen in der Lage zu sein, MHC-II-Antigen zu exprimieren und an der Antigen-Präsentation und der folgenden retinalen Immunreaktion zu partizipieren, wie es bei der S(oluble)-Antigen-induzierten experimentellen autoimmunen Uveoretinitis zu beobachten ist (Zhang et al., 1997). Auch in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen ist eine Konzentration MHC-II-exprimierender, als auch ED3-positiver Zellen in den inneren Schichten auffällig, so daß zu vermuten ist, daß es sich entsprechend der erwähnten Untersuchung bei den OX-6-positiven Zellen um eine aus dem Knochenmark stammende Subpopulation von ortsansässigen Mikrogliazellen handeln könnte. Um diese Vermutungen zu bekräftigen, wären bei beiden Arbeiten immunhistochemische Doppelfärbungen mit dem ED3- oder dem OX-42- und dem OX-6-Antikörper notwendig. Darüberhinaus weisen die immunreaktiven Zellen des Glaskörpers daraufhin, daß auch Makrophagen in der Retina auftreten und MHC-II-Antigen exprimieren könnten. In der Dystrophie der RCS-Ratten (Royal College of Surgeons) scheinen ebenfalls MHC-II-positive Zellen eine Rolle zu spielen. Hier waren jedoch eher in der äußeren Körnerschicht in Doppelfärbungen OX-6- und ED1-immunreaktive Zellen nachweisbar, deren Herkunft entweder direkt oder entwicklungs-geschichtlich das Knochenmark ist (Akaishi et al., 1998).

Während kultivierte, BDV-infizierte, cerebrale Astrozyten spontan kein MHC-II-Antigen exprimierten (Richt et al., 1990; Richt und Stitz, 1992; Planz et al., 1993), scheinen die vorliegenden Ergebnisse neben MHC-Antigen-exprimierenden Makrophagen auf eine virus-induzierte MHC-Antigenexpression durch eine entwicklungs-geschichtlich aus dem Knochenmark stammende Subpopulation retinaler Mikroglia hinzuweisen, was in in-vitro-Untersuchungen noch zu verifizieren wäre. Da der Spiegel an IFN- γ bei neugeborenen BDV-infizierten Tieren gegenüber uninfizierten Kontrolltieren unauffällig war (Hornig et al., 1999), scheidet zumindest für diese Gruppe eine IFN- γ -induzierte MHC-Antigenexpression aus. Allerdings zeigt diese Gruppe nach der temporären, schwach ausgeprägten Infiltration im Gegensatz zu den anderen immuninkompetenten Gruppen auch nur eine äußerst schwache MHC-II-Expression.

Bei allen BDV-infizierten, immuninkompetenten Gruppen sind im Verlauf der Beobachtungszeiträume immunreaktive Zellen im Glaskörper nachweisbar. Dabei scheint die Morphologie und der hohe prozentuale Anteil ED3- und auch OX-38-

positiver Zellen auf Makrophagen hinzuweisen. Bei den CSA-immunsupprimierten Virusträgern, als auch bei - mit Ausnahme der Phase der temporären, schwachen Immunreaktion - neugeborenen BDV-infizierten Ratten ist das Vorkommen von intravitrealen Immunzellen nur sehr schwach ausgeprägt, während bei den Cyclophosphamid-behandelten Gruppen – und hierbei früher und in stärkerem Maße bei der mit einer Einmaldosis supprimierten Gruppe - dies stärker zu beobachten ist. Durchgehend ist innerhalb des Glaskörpers jedoch ein Schwerpunkt der Zellen in Kontakt zur oder in Nachbarschaft zur Retina auffällig, was vermuten läßt, daß die Zellen aus den Gefäßen der Retina stammen.

Bezüglich der immunhistochemischen Untersuchung mit dem Anti-TNF-Antikörper fällt auf, daß bei den Cyclophosphamid-behandelten Gruppen nach ca. drei Monaten p.i. ein hoher Prozentsatz der Zellen aus der inneren Körnerschicht, weniger stark die anderen Neuronenschichten positiv reagieren, wobei negative Retinaabschnitte kaum zu finden sind. Bei den mit einer Einmalgabe behandelten Ratten sind jedoch auch schon zu früheren Untersuchungszeitpunkten entsprechend der nachlassenden Immunsuppression kleine, positive Infiltrate in der Ganglienzellschicht, positiv markierte Gefäße in Ganglien-, wie in der Nervenfaserschicht, als auch zunehmend positive Abschnitte der inneren Körnerschicht zu beobachten. Bei allen immuninkompetenten Gruppen zeigen Gefäße und deren Umgebung, als auch deren Lumina eine positive Reaktion. Auch bei der Negativ-Kontrolle sind Gefäße positiv markiert. Verschiedene Untersuchungen bestätigen eine geringgradige Expression von TNF- α -mRNA in verschiedenen Bereichen des ZNS bei Negativ-Kontrollen, ohne jedoch mittels immunhistochemischer Untersuchungen die Expression näher zu lokalisieren (Hornig et al., 1999; Sauder und de la Torre, 1999; Plata-Salaman et al., 1999). In vitro-Untersuchungen exprimierten unstimulierte kultivierte retinale Gliazellen zu ca. 60 % geringe Mengen von TNF- α (Drescher und Whittum-Hudson, 1996a). In-vivo-Untersuchungen der Retina bei uninfizierten BALB/c-Mäusen bestätigten die Präsenz von TNF- α , was darauf hinweist, daß eine oder mehrere ortsansässige Zellpopulationen der Retina diesen Mediator produzieren (Drescher und Whittum-Hudson, 1996b). Bis auf die erwähnten Reaktionen im Bereich von Gefäßlumina sind neugeborene BDV-infizierte Tiere und auch CSA-behandelte Virusträger im ersten Monat p.i. unauffällig. Die neugeborenen-infizierten Ratten weisen parallel zur temporären Infiltration im zweiten Monat p.i. immunreaktive Abschnitte besonders in der äußeren

plexiformen Schicht zumeist im Bereich von Gefäßen und zum Teil deutlich TNF-exprimierende Zellen in der inneren plexiformen, in geringerem Umfang in der Nervenfasern- und der inneren Körnerschicht auf, während CSA-behandelte Tiere im zweiten Monat nicht kontrolliert worden sind. Drei Monate p.i. sind bei beiden Gruppen die Neuronenschichten neben dem Befund negativer Abschnitte deutlich geringer ausgeprägt positiv markiert als bei den Cyclophosphamid-behandelten Tieren. Erst zu sehr späten Untersuchungszeitpunkten nach ca. 12 Monaten p.i. und später sind viele der noch vorhandenen Neurone TNF-positiv, wobei die Gruppe der neugeborenen BDV-infizierten Tiere in geringerem Ausmaß betroffen ist. Deutlicher TNF-exprimierende Zellen kommen in allen Gruppen vor und sind vorwiegend von der Nervenfasern- bis zur inneren Körnerschicht zu finden, wobei diese bei den neugeborenen infizierten Virusträgern – bis auf den Zeitraum der temporären, schwachen Infiltration – und bei den CSA-behandelten Tieren eher in späteren Phasen auftauchen. Auch die Degeneration verläuft in diesen Gruppen langsamer ab, als bei beiden Cyclophosphamid-Gruppen. Der Glaskörper ist bei der Gruppe der neugeborenen BDV-infizierten Tiere im geringsten Maße diffus positiv markiert, während dies bei den CSA-Tieren zum Ende des Untersuchungszeitraumes etwas stärker ausgeprägt ist. Auch hier zeigen beide Cyclophosphamid-Gruppen frühere und teils stärkere Reaktionen.

In der Retina sind sowohl deutlicher immunreaktive Zellen, als auch weniger intensiv markierte Zellen nachweisbar. Bei letzteren handelt es sich dabei jedoch um das Groß der markierten Zellen. Wie schon bei den immunkompetenten Virusträgern sind dies die Neuronen besonders der inneren Körnerschicht. Bezüglich der prozentual weitaus kleineren Gruppe der stärker TNF-positiven Zellen scheinen aufgrund des nur teilweise – eher für den Bereich der Ganglienzellschicht geltend - übereinstimmenden Färbemusters auch nicht ED3-positive Zellen TNF zu exprimieren bzw. positiv markiert zu sein. Wie schon weiter oben erwähnt, besteht aber die Möglichkeit, daß besonders parenchymal gelegene, nicht aus dem Knochenmark stammende Mikrogliazellen ED3-negativ sind, die jedoch als Quelle von TNF in Frage kämen. Diese auch möglicherweise MHC-I-exprimierenden Zellen ließen sich eventuell – wie schon in einem vorherigen Abschnitt bemerkt - durch den Antikörper OX-42 markieren. Die Tatsache eines aktivierten Zustandes in Form einer Antigenexpression und eine vom zeitlichen Auftreten und der Verteilung innerhalb der Retinaschichten – besonders in der inneren Körnerschicht mit den angrenzenden

Schichten – her scheinbare partielle Kongruenz der Immunreaktivität für das MHC-I- und TNF-Antigen, legt die Vermutung nahe, daß zumindest ein Teil der MHC-I-exprimierenden Zellen auch Quelle des TNF's sein könnte. Auch hier wären in weiterführenden Untersuchungen Doppelfärbungen notwendig, um diese Vermutung zu bestätigen.

Da die Neuronen in einer weniger intensiven Reaktion mit dem Anti-TNF-Antikörper reagieren und Lymphozyten bei den immuninkompetenten Tieren entweder keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen, bleiben lediglich die Gliazellen der Retina mit ihren drei Unterarten Müllerscher Stützzelle, Astrozyt und Mikroglia außer einer begrenzten Zahl von eingewanderten Makrophagen als mögliche TNF-Produzenten übrig.

Daß Neuronen durchaus in der Lage sind, TNF zu exprimieren ist schon im Abschnitt der immunkompetenten Gruppe dargestellt worden. Entsprechendes gilt auch für die retinalen Gliazellen, wobei kombinierte Untersuchungen mit Hilfe der in-Situ-Hybridisierung und der RT-PCR an kultivierten Zellen das Potential der Müllerschen Stützzellen als eine Quelle dieses intraretinalen löslichen Mediators bekräftigen (Drescher und Whittum-Hudson, 1996b).

Verschiedene aktuelle Untersuchungen neugeborenen BDV-infizierter Ratten mit Hilfe der RPA (RNase-Protection Assay) zeigten auch für unterschiedliche Gehirnregionen eine Hochregulation der mRNA-Expression von TNF- α neben derjenigen einiger anderer Zytokine und Zytokinrezeptorkomponenten (Sauder und de la Torre, 1999; Hornig et al., 1999; Plata-Salaman et al., 1999). Die parallel beobachtete aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozytose führte die Autoren zu der Annahme, daß diese Zellgruppen für die hochregulierte Zytokinexpression verantwortlich sein könnten, wobei jedoch immunhistochemische Untersuchungen mit dem Anti-TNF-Antikörper zur Unterstützung dieser These nicht durchgeführt worden sind (Sauder und de la Torre, 1999; Hornig et al., 1999). Allerdings wurde für den Bereich des Cortex in der einen Untersuchung reaktive Astrozyten und Mikroglia als Produzenten erhöhter Mengen an Zytokinen eher ausgeschlossen (Sauder und de la Torre, 1999) und in der anderen hält man die aktivierte Mikroglia und Astrozyten zwar für eine wahrscheinliche Quelle hochregulierter proinflammatorischer Zytokine, schränkt jedoch ein, daß der Mechanismus der glialen Aktivierung eher ein indirekter zu sein scheint, da scheinbar keine Mikroglia und nur wenige Astrozyten infiziert zu sein scheinen (Hornig et al., 1999). Die Möglichkeit einer TNF-Expression durch die Neuronen

selbst ist in beiden Untersuchungen - im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit - nicht in Erwägung gezogen worden.

Die frühe Behandlung BDV-infizierter, thymektomierter Ratten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4+ - (OX 38), CD8+ - (OX 8) oder gegen alle T-Zellen (OX 52) führte zu einer in allen drei Gruppen etwa vergleichbaren Unterdrückung immunpathologischer Reaktionen in der Retina: ab ca. einem Monat p.i. scheinen vereinzelte Entzündungszellen präsent. Immunhistochemische Kontrolluntersuchungen ca. 2,5 Monate p.i. zeigten eine starke immunpathologische Infiltration der Retina mit CD4+, CD8+ T-Lymphozyten und ED3-positiven Zellen des Mikroglia-/Makrophagen-Systems, als auch einer starken Expression von MHC-I- und MHC-II-Antigen, sowie von TNF, wobei jedoch die Klinik nicht stark ausgeprägt war (Ergebnisse nicht dargestellt).

Degenerationserscheinungen treten in allen drei Gruppen im Verlauf des zweiten Monats p.i. beginnend auf, wobei bei den OX 38-behandelten Tieren innerhalb eines relativ kurzen Beobachtungszeitraums von drei Monaten eine etwas vorangeschrittenere Atrophie zum Teil aller Schichten zu beobachten ist. Nach OX 8- oder OX 52-Behandlung läuft diese etwas langsamer, jedoch auch alle Schichten erstreckend vergleichbar mit den Verläufen bei mit Cyclophosphamid immunsupprimierten Tieren ab. Nach neun bis zehn Monaten ist es in beiden Gruppen zu einer lokal völligen Degeneration mit vollständiger Auflösung der Retina gekommen.

Frühere Untersuchungen an Anti-CD4- oder Anti-CD8-behandelten BDV-infizierten Tieren zeigten, daß diese monoklonalen Antikörper bei früher Gabe eine starke Verringerung oder sogar ein vollständiges Ausbleiben lokaler entzündlicher Reaktionen im Gehirn bewirken (Stitz et al., 1992). Dabei waren die pan-T-Zell-Antikörper (OX 52) sowie die CD8-spezifischen Antikörper (OX 8) effektiver gegenüber den monoklonalen Antikörpern, die gegen die CD4+ Zellen gerichtet sind (OX 38; W3/25). Diese zeigten erst eine ähnliche Effektivität, wenn sie wiederholt über einen längeren Zeitraum gegeben wurden wie in der vorliegenden Arbeit geschehen. Die Beobachtungen bezogen sich jedoch auf einen viel kürzeren Untersuchungszeitraum von acht Wochen bei OX 8- und OX 52- und zehn Wochen bei OX 38- behandelten Tieren. Sowohl bei den OX 52-, wie auch bei den OX 38- behandelten Tieren waren in jenen

Untersuchungen spät nach Infektion antivirale Antikörper mit zu unbehandelten Kontrolltieren vergleichbaren Titerwerten nachweisbar, deren Ausbleiben jedoch als Parameter für die Effizienz der CD4-spezifischen Antikörperbehandlung herangezogen worden war. Diese Tatsache wurde dahingehend gedeutet, daß es unmöglich zu sein scheint, durch eine in-vivo-Behandlung mit monoklonalen Antikörpern jegliche spezifische Immunreaktion gegen ein bestimmtes Antigen aufzuheben, was z.B. im Verbrauch oder der Zerstörung oder einer begrenzten Halbwertszeit der Antikörper begründet liegen könnte (Stitz et al., 1992). Diese Vermutung stimmt mit Ergebnissen in der Literatur überein, die besagen, daß eine Dezimierung oder Blockierung von T-Zellen in vivo durch monoklonale Antikörper kaum eine Wirksamkeitsrate von 90 % übersteigt (Ahmed et al., 1988; Alters et al., 1990) und eine allmähliche Regeneration CD4-Zellen-dezimierter Ratten durch den Restpool eintritt (Waldmann, 1989), obwohl dies aufgrund der Thymektomie auszuschließen sein sollte. Eine langanhaltende Inhibition der CD8-Funktionen scheint dagegen leichter erreichbar (Waldmann, 1989), obwohl auch bei OX-8-behandelten Tieren eine minimale Infiltration und in einer zweiten Versuchsreihe zu späteren Zeitpunkten in wachsendem Umfang Enzephalitiden ohne klinische Erkrankung beobachtet wurden (Stitz et al., 1992), was durch die eigenen immunhistochemischen Untersuchungen an der Retina in deutlicher Form unterstützt wird.

Weitere Untersuchungen ergaben, daß es nach Behandlung mit monoklonalen Antikörpern gegen CD4+ T-Zellen (OX-38; W3/25) in einem Zeitraum von zehn Wochen bis drei Monaten p.i. zu einem deutlichen Substanzverlust im Gehirn kam, während OX-8-behandelte Tiere (Anti-CD8) nur einen geringen Verlust an Gehirns substanz zeigten (Bilzer und Stitz, 1994; Planz et al., 1993). Ursache schienen eine ausgebliebene Expression von MHC-Klasse I Antigen durch Neurone und Astrozyten bei fast kompletter Abwesenheit von CD8+ Zellen zu sein (Bilzer und Stitz, 1994; Stitz et al., 1993), den Elementen, die einen entscheidenden Anteil an der Pathogenese der BD bei immunkompetenten Ratten innehaben (Bilzer und Stitz, 1993; Planz et al., 1993; Bilzer und Stitz, 1994; Planz et al., 1995). Die schwach aufgetretene Entzündungsreaktion umfaßt CD4+ T-Zellen und Makrophagen (Bilzer und Stitz, 1994), wovon der Großteil der CD4+ T-Zellen nicht antigenspezifisch zu sein scheint und keinen pathologischen Effekt bei Abwesenheit von CD8+ T-Zellen aufweist (Planz et al., 1995; Bilzer und Stitz, 1996). Anti-CD4-Antikörperbehandlung führte neben einer Suppression von CD4+ T-Zellen sowohl zu einer verringerten Anzahl an CD8+ T-

Zellen als auch zu einer reduzierten MHC-Klasse I Antigenexpression mit dem Ergebnis eines gegenüber immunkompetenten BDV-infizierten Tieren geringeren Ausmaßes an verlorener Gehirns substanz. Die Bedeutung MHC-Klasse II restringierter zytotoxischer Aktivität von CD4+ T-Zellen beschränkt sich auf die Wirkung gegenüber Astrozyten (Planz et al., 1993; Bilzer und Stitz, 1994).

Aufgrund der deutlichen immunpathologischen Reaktion in den immunhistochemischen Kontrolluntersuchungen an der Retina Antikörper-behandelter Tiere zweieinhalb Monate p.i. ist in der vorliegenden Arbeit auf weitere immunhistochemische Färbungen zu früheren Zeitpunkten verzichtet worden, da die anderen immunsupprimierten Gruppen eine erfolgreichere Unterdrückung der entzündlichen Reaktionen zeigten. Die in den H.E.-Schnitten jedoch erkennbare geringgradige Infiltration und die bei immunkompetenten Virusträgern äquivalenten Reaktionen im Gehirn und in der Retina weisen daraufhin, daß die für das Gehirn beobachteten Gegebenheiten bei den Antikörper-behandelten Tieren ebenso für die Retina gelten. Es läßt sich durch die in-vivo-Behandlungen mit monoklonalen Antikörpern nur eine temporäre Ausschaltung der immunpathologischen Antwort erreichen, so daß bei den Antikörper-behandelten Tieren die Möglichkeit besteht, daß die verzögert einsetzende entzündliche Reaktion zumindest teilweise für die Degeneration der Retina verantwortlich sein könne, obwohl nur eine gering ausgeprägte Klinik feststellbar ist. Bei OX-38-behandelten Tieren scheint die Immunpathologie von noch größerer Bedeutung.

Bei adult BDV-infizierten Tieren kommt es in der Retina zu einer starken immunpathologischen Reaktion, in der wie beim Gehirn CD8+ T-Zellen als MHC I restringierte Effektorzellen eine entscheidende Rolle spielen. Noch während der Entzündungsreaktion beginnt die atrophische Zerstörung der Retina bis zum vollständigen Verlust derselben.

Bei den immunkompromittierten BDV-infizierten Ratten entwickeln sich keine oder nur in geringem Maße und ohne BD-typische Klinik immunpathologische Reaktionen.

Die häufig schweren degenerativen Veränderungen der Retina müssen besonders bei den effektiv immunsupprimierten Tieren eine andere als MHC-Klasse I restringierte CD8-vermittelte oder durch CD4+ T-Zellen bewirkte Ursache haben. Es ist zu vermuten, daß auch bei der Versuchsgruppe mit nur temporärer Immun-

suppression (Einmalgabe Cyclophosphamid) die zu beobachtenden infiltrierenden Lymphozyten eine weniger starke Mitbeteiligung an den degenerativen Vorgängen haben, da bei den über vier Wochen mit einer geringeren Dosis Cyclophosphamid behandelten Ratten trotz einer sehr effektiven Immunsuppression mit ausbleibendem Auftreten von CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten eine vergleichbar schnelle Degeneration der Retina zu beobachten ist. Daß CD4⁺ T-Zellen nicht antigen-spezifisch und damit ineffektiv sein können, ist schon für frühere Untersuchungen bei TGF β - und OX-8-behandelten Tieren vermutet worden (Stitz et al., 1991b; Planz et al., 1995; Bilzer und Stitz, 1996). Möglich wäre aber auch eine fehlende Präsentation von viralem Fremdantigen aufgrund funktioneller Dysfunktionen der antigenpräsentierenden Zellen, so daß die anwesenden Effektorzellen ihre Funktion nicht ausüben könnten. Eine solche funktionelle Dysfunktion ist schon als mögliche Ursache der bislang ungeklärten Reduzierung der Entzündungsreaktion in der chronischen Phase der BD in Betracht gekommen (Sobbe, 1996).

Es ist nicht auszuschließen, daß die dauerhafte Applikation von Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid und Cyclosporin A, die allgemeine toxische Eigenschaften haben, auch degenerative Auswirkungen auf das ZNS und - bezogen auf die vorliegende Arbeit - insbesondere auf die Retina haben. Allerdings zeigte Cyclophosphamid in einem in-vitro-Modell zur Testung der Neurotoxizität von Chemotherapeutika keinen Effekt (Nicolini et al., 1998). Zu CSA gibt es neben konträren Aussagen bezüglich eines neuroprotektiven Charakters nach einer temporären Ischämie der frontalen Anteile des Gehirns (Kondo et al., 1995, 1999; Yagita et al., 1996) auch einen Fallreport über eine durch CSA toxisch bedingte akute Enzephalopathie, deren Veränderungen nach Absetzen des Medikamentes jedoch reversibel waren (Monteiro et al., 1993). Obwohl es eine vorherrschende Meinung einer CSA-vermittelten Neurotoxizität gibt (Tauboll et al., 1998; Tezcan et al., 1998; Townsend et al., 1998), scheint dies in der vorliegenden Untersuchung eher vernachlässigbar zu sein, da es Ähnlichkeiten bezüglich der Degenerationsgeschwindigkeit zur Gruppe der neugeborenen BDV-infizierten Tiere gibt und die Degenerationen bei den Cyclophosphamid-behandelten Tieren trotz offensichtlich fehlender Neurotoxizität schneller abläuft. Zudem wären eventuelle Schäden durch das Ende der Gabe von CSA wahrscheinlich ebenfalls reversibel. In früheren Untersuchungen ist CSA neben seiner hohen Effizienz als relativ gering toxisch eingestuft worden (Übersicht bei Borel, 1989).

BDV ist bisher als nicht-zytopathogenes Virus eingestuft worden, nachdem in-vitro-Versuche keine offensichtliche zytopathogene Eigenschaft des Virus hatten nachweisen können (Herzog und Rott, 1980).

Atrophieerscheinungen im Gyrus dentatus und in der Retina bei neugeborenen infizierten Ratten ohne nekrotisierende Entzündung (Carbone et al., 1991a; Gosztonyi und Ludwig, 1995; Narayan et al., 1983b) stellten Abläufe dar, hinter denen direkte virale Effekte (Carbone et al., 1991a), eine direkte virus-induzierte Zytopathologie (Carbone et al., 1991a; Gosztonyi und Ludwig, 1995) und eine Zerstörung von Neuronen durch virale Replikation (Narayan et al., 1983b) vermutet wurden. Darüberhinaus wurden Entwicklungsstörungen des Kleinhirns neugeborenen BDV-infizierter Ratten beobachtet, die aus einer virus-induzierten Funktionsstörung von Purkinjezellen und Astrozyten zu resultieren schienen (Carbone et al., 1991a; Bautista et al., 1995). In diesen Untersuchungen reichten die dem BDV zugeordneten Eigenschaften von selektiv direkt zytopathogen bis zu viral-bedingten Funktionsstörungen infizierter Zellen.

Einer älteren Untersuchung zufolge wird angenommen, daß es nach BDV-Infektion als erste Wirtsantwort im Gehirn zu einer Aktivierung von IEG's (immediate early response gene) mit folgender Expression von Transkriptionsfaktoren, gewisser proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- α und von Chemokinen durch ZNS-ansässige Zellen wie z.B. Neurone oder Gliazellen kommt (Morimoto et al., 1996). Daß Neurone TNF- α produzieren können, darauf ist schon an vorheriger Stelle hingewiesen worden. Eine ähnliche Hochregulierung solcher Gene ist vorher beim Newcastle disease virus in Astrozyten und Mikrogliazellen beobachtet worden (Vanguri und Farber, 1994). Weitergehende Vermutungen beinhalten, daß die nächste Stufe zur Induktion der inflammatorischen Antwort entweder direkt infolge viraler Replikation oder indirekt aufgrund von IEG-Produkten wie z.B. Transkriptionsfaktoren in einer Aktivierung der late-response-Gene (LG) besteht (Morimoto et al., 1996; Fu et al., 1993b), die proinflammatorische Faktoren kodieren. Bei der BD handelt es sich dabei um TNF- α , Il-6 und zwei Substanzen aus der Gruppe der Chemokine (Morimoto et al., 1996). Aktuellere Untersuchungen bestätigten eine erhöhte RNA-Expression für Il-6 und TNF- α , darüberhinaus aber auch für Il-1 α/β im

ZNS adult BDV-infizierter Tiere (Sauder und de la Torre, 1999). Nach Behandlung BDV-infizierter Ratten mit Dexamethason, einer sehr starken antiinflammatorischen Substanz mit dem Haupteffekt der Unterdrückung der Expression zahlreicher Zytokine und Chemokine durch Makrophagen, sind die durch IEG- und LG-Aktivierung exprimierten Mediatoren, d.h. unter anderem TNF- α und IL-6, weiterhin nachweisbar, ohne - jedoch offensichtlich innerhalb eines nur sehr beschränkten Zeitraumes von nur 30 Tagen - zu einer Erkrankung zu führen oder eine Entzündungsreaktion bzw. neuropathologische Läsionen zu induzieren. Daher kam man zu dem Schluß, daß ihre Hauptaufgabe immunmodulatorischer Natur sei (Morimoto et al., 1996).

In aktuelleren Untersuchungen ist das vermehrte Auftreten der proinflammatorischen Zytokine IL-1 α , -1 β und -6 und TNF- α bei neugeborenen BDV-infizierten und damit ebenfalls immuninkompetenten Tieren nachgewiesen worden (Sauder und de la Torre, 1999; Hornig et al., 1999; Plata-Salaman et al., 1999). Die bei den Dexamethason-behandelten Tieren nicht zu beobachtenden neuropathologischen Schäden haben ihre Ursache sehr wahrscheinlich in dem offensichtlich sehr kurzen Beobachtungszeitraum von nur einem Monat. Alle drei Untersuchungen an den neugeborenen infizierten Ratten im Bereich des Gehirns, als auch die vorliegende Arbeit mit Bezug auf die Retina unterstützen die Hypothese, daß die Zytokine - in der vorliegenden Arbeit TNF - über eine immunmodulatorische Aufgabe hinaus in der Neuropathogenese des Gehirns neugeborenen BDV-infizierter Tiere involviert sind. Während jedoch Hornig und Kollegen, sowie Sauder und de la Torre lediglich die aktivierte Mikroglia und reaktive Astrozyten als wahrscheinliche Quelle der hochregulierten proinflammatorischen Zytokine ansehen, nahmen Plata-Salaman und Kollegen an, daß die Zytokinhochregulation das Ergebnis einer direkten Aktivierung transkriptioneller Mechanismen in BDV-infizierten Zellen des ZNS ist, was dem Modell von Morimoto entsprechen würde, und worauf auch die immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit dem Ergebnis einer positiven Reaktion der Neuronen auf den Anti-TNF-Antikörper hinweisen. Zytokine wie IL-1 β und TNF- α sind in der Lage, eine Astrozytose zu induzieren (Balasingam et al., 1994; Ide et al., 1996; Rostworowski et al., 1997; Seilhean et al., 1997; Yong, 1996), so daß denkbar ist, daß die Astrozytose - zumal Astrozyten nur in geringer Anzahl BDV-infiziert zu sein scheinen (Hornig et al., 1999) - das Ergebnis und vielleicht in der Folge auch Quelle proinflammatorischer Zytokine sein könnte. Nichtsdestotrotz nennen auch Plata-Salaman und Kollegen neben neuronalen

Komponenten in erster Linie Mikroglia und Astrozyten, aber auch Endothelzellen sowie infiltrierende Immunzellen der Peripherie als mögliche Produzenten.

Allgemein gibt es eine Übereinstimmung in der Hypothese, daß die Antwort ZNS-ansässiger Zellen auf die BDV-Infektion eine erste und wichtige Stufe in einer ganzen Kaskade von Mechanismen ist, die zur Entzündung im ZNS immunkompetenter Tiere führt (Morimoto et al., 1996; Sauder und de la Torre, 1999). Die Expression von TNF- α scheint dabei eine hervorgehobene Bedeutung inne zu haben.

Eine konstitutionelle Expression von Zytokinen als neurotrophe Faktoren und als mögliche Neurotransmitter oder Neuromodulatoren scheint an interneuralen oder Neuronen-Glia-Interaktionen beteiligt zu sein (Rivest et al., 1992; Cunningham and DeSouza, 1993; Molenaar et al., 1993). Neben der Induktion nach viralen Infektionen (Gillespie et al., 1993; Campbell et al., 1994; Lewandowski et al., 1994; Pearce et al., 1994; Wessenlingh et al., 1994) ist eine solche auch nach Verletzungen (Tchelingierian et al., 1993) oder anderen Traumata zu beobachten. Die neuronalen Zellen selber stellen dabei die Quelle der Zytokine dar, z.B. Astrozyten (Lieberman et al., 1989), Mikroglia (Lee et al., 1993) oder Neuronen (Tchelingierian et al., 1993, 1994; Schöbitz et al., 1993).

Die pleiotrope Rolle der Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 im ZNS äußert sich neben der Einbeziehung in der Modulation der zentralen Homöostase (Giulian und Lachman, 1985; Barna et al., 1990; Gadiant et al., 1990; Selmaj et al., 1990) und der Stimulation neuroendokriner Antworten (Dunn, 1990; Smith, 1992) auch in einer zytotoxischen Wirkung (Selmaj und Raine, 1988). So können die neurodegenerativen Veränderungen nach BDV-Infektion bei immunkompetenten wie –inkompetenten Tieren durch beispielsweise TNF- α als zytolytisch wirkendes Zytokin, das außer durch infiltrierende T-Lymphozyten auch von Mikrogliazellen bzw. Makrophagen produziert wird, verursacht worden sein (Nöske 1996; Sawada et al., 1989; Fischer et al., 1991; Mosmann und Sad, 1996). TNF kann in Mikrogliazellen das Enzym Superoxid Dismutase (SOD) induzieren, das ein Indikator für die Anwesenheit freier Sauerstoffradikale ist und mittels Stabilisierung reaktiven Stickstoffs zu Gewebszerstörungen beiträgt (Ignarro et al., 1987; Colton und Gilbert, 1987; Harris et al., 1991). Sowohl Superoxid Dismutase, als auch Stickoxid ist während der akuten Phase der BD in den Gehirnen BDV-infizierter Lewis-Ratten nachweisbar (Koprowski et al., 1993; Zheng et al., 1993; Hooper et al., 1995; Dietzschold, 1995; Sobbe et al., 1997). Bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis gibt es sogar einen wech-

selseitig stimulierenden Effekt zwischen NO und TNF- α , was zu einer inflammatorischen Exazerbation im ZNS führt (Sun et al., 1998). Allerdings zeigten neueste Untersuchungen, daß die Expression von iNOS (inducible nitric oxide synthase) bei neugeborenen BDV-infizierten Ratten auf isolierte Makrophagen vier Wochen p.i. beschränkt waren; zwar mag NO mit zu einem neuronalen Zelluntergang beitragen, doch gibt es keine Hinweise auf eine bedeutende Rolle (Weissenböck et al., 2000).

TNF- α hat antivirale Eigenschaften entweder allein (Rossol-Voth et al., 1991) oder synergistisch mit IFN- β oder IFN- γ (Wietzerbin et al., 1990; Chen et al., 1993; Schijns et al., 1991) neben einer indirekten Form durch Steigerung der Widerstandsfähigkeit gegenüber einer Infektion auch direkt durch Abtöten infizierter Zellen.

TNF- α und auch IL-1 β , welches bei neugeborenen infizierten Virusträgern ebenfalls hochreguliert wird (Sauder und de la Torre, 1999; Hornig et al., 1999; Plata-Salaman et al., 1999), weisen eine Assoziation zur Apoptose auf (Rothwell et al., 1997; Sei et al., 1995). Die Bindung von TNF- α an einem entsprechenden Rezeptor kann Apoptose induzieren (Benveniste, 1997). Die Immunreaktion der Neuronen in der vorliegenden Arbeit könnte auch von solch gebundenem TNF herrühren. TNF- α ist in der Lage, Apoptose in einer Vielzahl von Zelltypen in Gang zu setzen (Janicke et al., 1994, 1996; Benveniste, 1997), wie z.B. eine neuronale Apoptose induziert durch das HIV-1 Tat-Protein und TNF- α bei HIV-1-Infektion des ZNS (Shi et al., 1998).

Apoptotischer Zelluntergang spielt offensichtlich auch zumindest bei der Neuro-pathologie neugeborenen BDV-infizierter Tiere eine Rolle: neuere Untersuchungen zeigen, daß deren Neuronen im Gyrus dentatus, im Kleinhirn und im Cortex vornehmlich durch Apoptose zugrundegehen (Hornig et al., 1999; Weissenböck et al., 2000), was durch morphologische Kriterien, durch immunhistochemisch nachgewiesene fragmentierte DNA, als auch durch den Nachweis gesteigerter RNA-Expression proapoptotischer Produkte (Fas, Caspase-1) bzw. verringerter Expression des anti-apoptotischen bcl-x belegt werden konnte.

Daß auch in der Retina Apoptose eine Rolle spielen sollte, wird durch die Expression von Fas und des Fas-Liganden in der humanen Retina sowohl in der normalen Retina, als auch in gesteigerter Form bei einer Uveitis unterstützt (Chan et al., 1997). Für die Retina der Ratte deuten Untersuchungsergebnisse daraufhin, daß nach Axotomie bzw. nach Läsion des N. opticus Veränderungen bezüglich der Expression der antiapoptotischen bcl-2-Genfamilie mit einer gesteigerten Apoptosis der retinalen Ganglienzellen einhergehen (Isenmann et al., 1997; Levin et al., 1997). Darüber-

hinaus haben in letzter Zeit verschiedene Gruppen für beide Körnerschichten der Rattenretina die Bedeutung neuronaler Apoptose und Nekrose bei den durch eine temporäre Ischämie induzierten pathologischen Mechanismen aufgezeigt (Kuroiwa et al., 1998, 1999; Joo et al., 1999; Shibuki et al., 1998). Hierbei spielen im Gegensatz zum antiapoptotischen bcl-x proapoptotische Proteasen der Caspase-Familie (u.a. Caspase-1) eine wichtige Rolle (Katai und Yoshimura, 1999). Diese Ergebnisse für den Bereich der Retina lassen vermuten, daß bei den immuninkompetenten Virus-trägern apoptotische Vorgänge eine gewichtige Rolle in der Neuropathologie entsprechend jüngsten Ergebnissen im Gehirn und Kleinhirn (Hornig et al., 1999; Weissenböck et al., 2000) spielen sollten, was durch zukünftige Untersuchungen mittels Immunhistochemie und RPA (RNase-Protection Assay) belegt werden müßte. Versuche mit Caspase-Inhibitoren bei axotomierten retinalen Ganglienzellen führten zu einer im Vergleich zur Retina ohne Gabe von Inhibitoren verringerten Anzahl reaktiver Mikroglia, was auf eine komplexe Beziehung zwischen retinalem Ganglienzelltod und Aktivierung ortsansässiger Mikroglia/Makrophagen hindeutet (Chaudhary et al., 1999). Daß aktivierte Mikroglia/Makrophagen bei der Neuropathologie immuninkompetenter BDV-infizierter Ratten eine Rolle spielen, ist in der vorliegenden Arbeit deutlich geworden. Auch dies spricht nicht gegen eine tragende Bedeutung der Apoptose bei immuninkompetenten Virusträgern. Um die Rolle der Apoptose weiter zu verfolgen, wäre in zukünftigen Untersuchungen die Behandlung von immuninkompetenten, BDV-infizierten Ratten mit Caspase-Inhibitoren interessant. Ob die Aktivierung der Mikroglia/Makrophagen eher ursächlich für die oder reaktiv auf die degenerativen Vorgänge ist, bleibt unklar.

Neben einem durch TNF- α induziertem neuronalem Zelltod gibt es jedoch auch eine N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-induzierte Apoptose in der Ratten-Retina. Nach intravitrealer Injektion von NMDA wurde morphologisch, biochemisch und pharmakologisch NMDA-Rezeptor-vermittelte Apoptose in der Ganglienzell- und der inneren Körnerschicht der Retina adulter Ratten nachgewiesen. Die äußere Körnerschicht war dagegen unbetroffen (Lam et al., 1999). Bei vorliegender Apoptose ist die inflammatorische Reaktion im Gewebe minimal (Gerschenson und Rotello, 1992; Johnson und Deckwerth, 1993; Vaux, 1993), was auch für die immuninkompetenten Tiere der vorliegenden Arbeit zutrifft. In einer jüngeren Studie wurde die Beteiligung von NMDA-Rezeptoren und NO an dem Granula-vermittelten Zelltod ausdifferenzierter Neuronen demonstriert, wobei die Granula von zytotoxischen T-

Zellen stammen und u.a. Perforin enthalten (Malipiero et al., 1999), welches als entscheidendes Effektormolekül bei der Zytolyse durch CD8⁺ T-Zellen gilt und deren mRNA bei adult BDV-infizierten Ratten nachgewiesen worden ist (Nöske et al., 1998; Sobbe et al., 1997). Da NO bei neugeborenen infizierten Virusträgern nur eine untergeordnete Rolle spielt (Weissenböck et al., 2000), erscheint die NMDA-Rezeptorvermittelte Zytotoxizität eher im Zusammenhang der Perforin-vermittelten Zytolyse bei immunkompetenten Tieren für weitere Untersuchungen interessant.

Eine direkte virus-induzierte Apoptose von Neuronen ist für virulentere Stränge des Sindbis Virus, einem Alphavirus, welche eine gewichtige Rolle bei durch Moskitos verursachter viraler Enzephalitis spielt, bekannt (Griffin, 1998).

Ein anderer möglicher Mechanismus der Schädigung von Neuronen und Gliazellen könnte die Beeinträchtigung von Oligodendrozyten durch TNF- α sein, wie es nach Freisetzung durch aktivierte Makrophagen/Mikroglia bei HIV-assoziierten neurologischen Erkrankungen vorgeschlagen worden ist (Yoshioka et al., 1995).

TNF- α werden auch mittelbar toxische Wirkungen auf Zellen des ZNS (Selmaj und Raine, 1988) zugeschrieben. Zellen, deren Proteinsynthese oder Transkriptionsfähigkeit chemisch gestört werden, sind anfälliger gegen TNF (Kull und Cuatrecasas, 1981). Daraus ließe sich ableiten, daß Zellen Proteine synthetisieren, die aktiv gegen TNF schützen. Daher ist zu vermuten, daß bei forcierter intrazellulärer Vermehrung von Viren, wie z.B. des BDV's, mit der damit einhergehenden Inanspruchnahme der zellulären Proteinsynthese die Kapazität der Zelle zur Produktion von Schutzfaktoren nicht mehr ausreicht, so daß dem BDV hier eine Form von indirekter Pathogenität zukäme (Schwerdtfeger, 1994).

Im Glaskörper vorhandenes TNF- α scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen, da intravitreales TNF- α zu einer axonalen Degeneration des N. opticus nicht jedoch zu Veränderungen der Glia der neuralen Retina führte (Madigan et al., 1996).

Ein BDV-vermittelter Pathogenitätsmechanismus mag auch durch die IEG-induzierten Transkriptionsfaktoren ausgelöst werden, die für neuronalen Zelluntergang verantwortlich sein könnten, da es erwiesen ist, daß fortlaufende c-fos-Expression (IEG) einem programmierten Zelltod vorangeht (Smeyne et al., 1993). Daß es bei adult BDV-infizierten Ratten zu einer Expression von c-fos in Hippocampus und Cortex kommt, ist bereits vor längerer Zeit nachgewiesen worden (Fu et al., 1993b).

In der Retina ist c-fos in der durch ein Lichttrauma induzierten Apoptose der Photorezeptoren involviert (Hafezi et al., 1997).

In der Vergangenheit ist eine erheblich erhöhte TF (tissue factor) - Expression durch Astrozyten im Gehirn neugeborenen BDV-infizierter Tiere gefunden worden (Gonzalez-Dunia et al., 1996). TF ist ein Initiator der Blutkoagulation (Edgington et al., 1991). Es gehört zu der Familie der Klasse-II-Zytokin-Rezeptoren und wird vornehmlich durch Astrozyten produziert. Ihm kommt eine bedeutende Rolle bei der zellulären Signalübermittlung, der Gehirnfunktion und der neuralen Entwicklung durch seine Wirkung auf die Koagulationsproteasen-Kaskade zu (Übersicht bei Briese et al., 1999). Da es schon in früheren Jahren zunehmend Hinweise darauf gab, daß Proteine des Koagulations- und Fibrinolysesystems neben der Blutgerinnung im ZNS weitere Funktionen ausüben können wie z.B. die Regulation normaler Gehirnentwicklung (Marx, 1992), schien es möglich, daß ein Ungleichgewicht in den Proteaseaktivitäten zu Neuronenschädigungen beiträgt (Gonzalez-Dunia et al., 1996). TF ist in verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. in der Alzheimer'schen Erkrankung verwickelt (Marx, 1992; McComb et al., 1991), was vermuten läßt, daß TF-Expression vielleicht eine wichtige Rolle in der BDV-vermittelten, funktionellen Beeinträchtigung des ZNS spielt (Gonzalez-Dunia et al., 1996). Ob es auch in der Retina zu einer TF-Hochregulierung bei neugeborenen BDV-infizierten Ratten kommt, muß offen bleiben. Im Kleinhirn ist jedoch trotz deutlich prominenter Astrozytose keine TF-Hochregulation zu beobachten (Briese et al., 1999).

Aktuellere Untersuchungen an neugeborenen BDV-infizierten Tieren zeigten, daß das BDV eine progressive und deutliche Abnahme der Expression synaptischer Marker, die in neuroplastischen Prozessen/der Ausbildung von Synapsen involviert sind, induziert, was von einem signifikanten Verlust kortikaler Neurone gefolgt wird. Es wird vermutet, daß die persistente BDV-Infektion neuroplastische Prozesse spezifischer Zellpopulationen stört, was wiederum Auswirkungen auf Wachstumsfaktoren und andere Moleküle haben könnte, die für das Überleben selektiver neuronaler Populationen innerhalb des Cortex und des limbischen Systems notwendig sind (Gonzalez-Dunia et al., 2000).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei den immuninkompetenten BDV-infizierten Ratten es zu einer sehr langsamen Degeneration der Retina kommt, wie sie auch am Gehirn zu beobachten ist. Nach viraler Infektion kommt es zu komplexen Veränderungen gegenüber Kontrolltieren, was sich in veränderter Expression von Selbstantigenen, aber auch von Zytokinen äußert, wobei $\text{TNF-}\alpha$ eine wichtige Rolle zu spielen scheint – sei es eine immunmodulatorische oder eine zytotoxische. Die beobachtete Aktivierung des Mikroglia/Makrophagen-Systems könnte sowohl ursächlich für als auch die Folge der degenerativen Veränderungen sein. Demgegenüber steht die sehr viel schneller ablaufende Atropie der Retina adult BDV-infizierter Tiere. Hier steht die immunpathologische Reaktion im Vordergrund, die durch CD8^+ T-Zellen mittels einer MHC-Klasse I restringierten zytotoxischen Aktivität ausgelöst wird, bei der auch CD4^+ T-Zellen und Makrophagen/Mikrogliazellen eine wichtige Rolle spielen.

7 Abbildungen und Diagramme

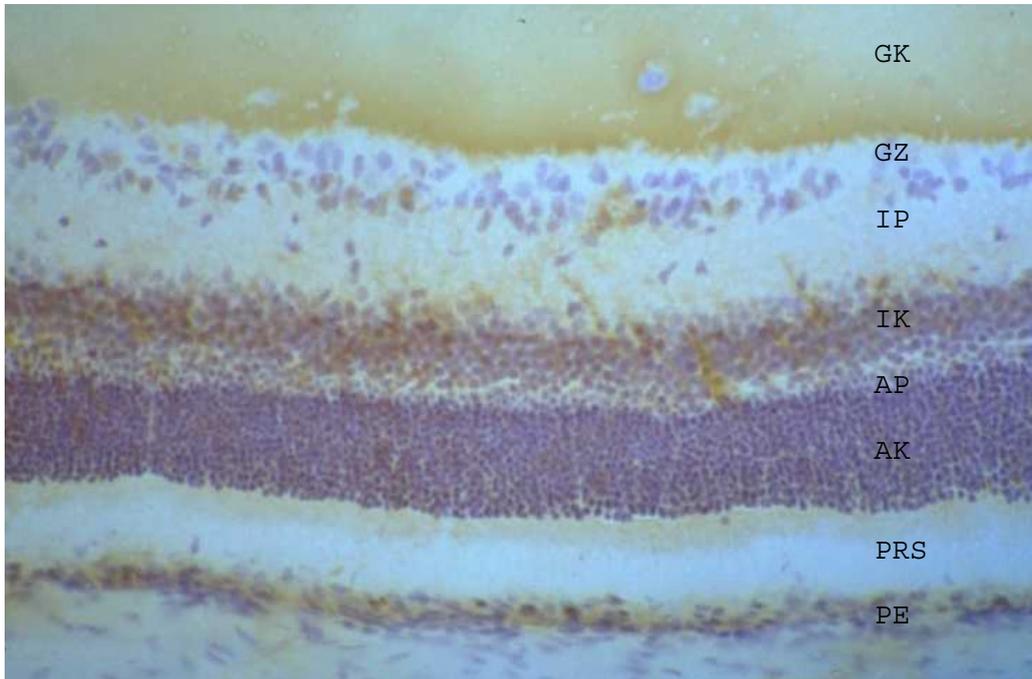


Bild 1: Darstellung von BDV-Protein durch Bo-18 / 38/15H7-Antikörper bei einem adult infiziertem, mit einer Einmalgabe CY immunsupprimiertem Tier 37 d.p.i. (Vergrößerung: 190-fach); GK: Glaskörper; GZ: Ganglienzellschicht; IP: Innere plexiforme Schicht; IK: Innere Körnerschicht; AP: Äußere plexiforme Schicht; AK: Äußere Körnerschicht; PRS: Photorezeptorenschicht; PE: Pigmentepithel

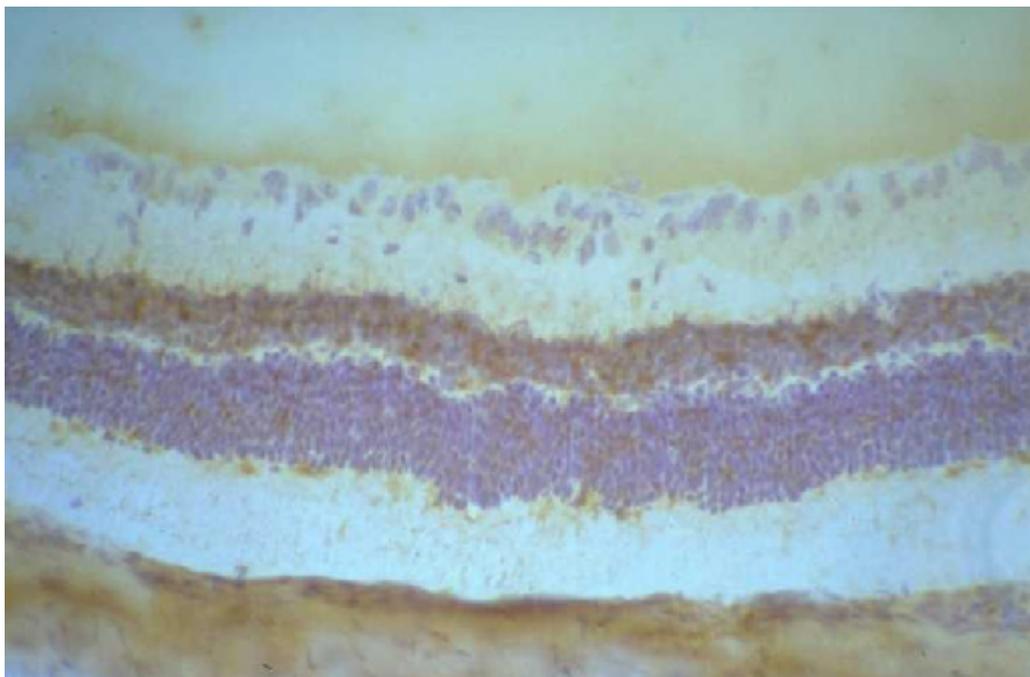


Bild 2: Darstellung von BDV-Protein durch Bo-18 / 38/15H7-Antikörper bei einem neugeborenen infiziertem Tier 12 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

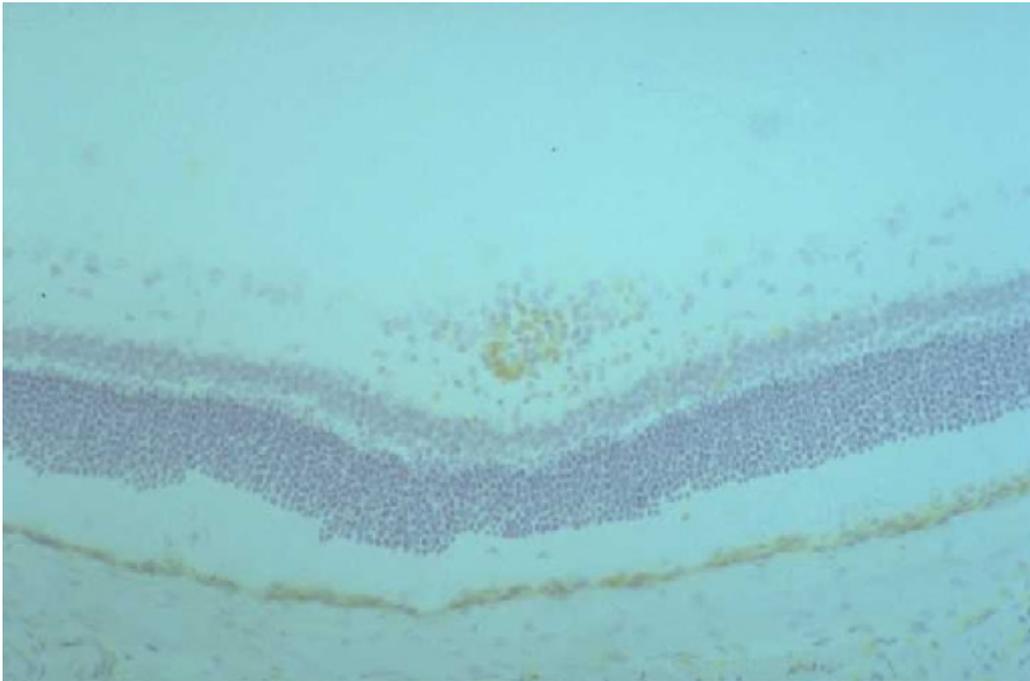


Bild 3: Darstellung von CD4+ T-Lymphozyten durch den OX-38-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem Tier 21 d.p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

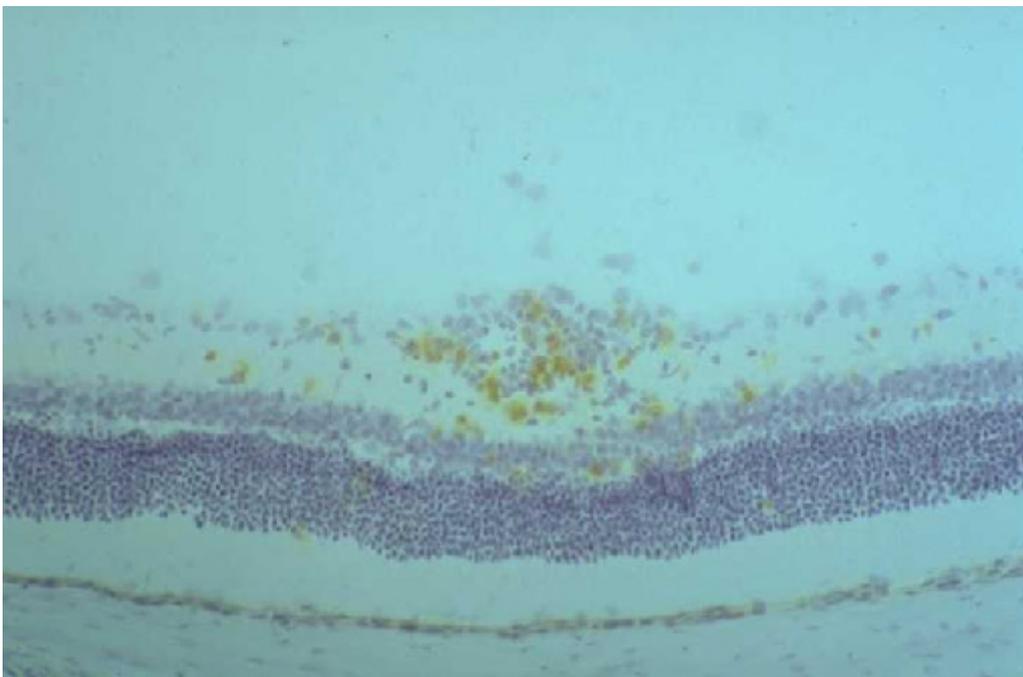


Bild 4: Darstellung von CD8+ T-Lymphozyten durch den OX-8-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem Tier 21 d p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

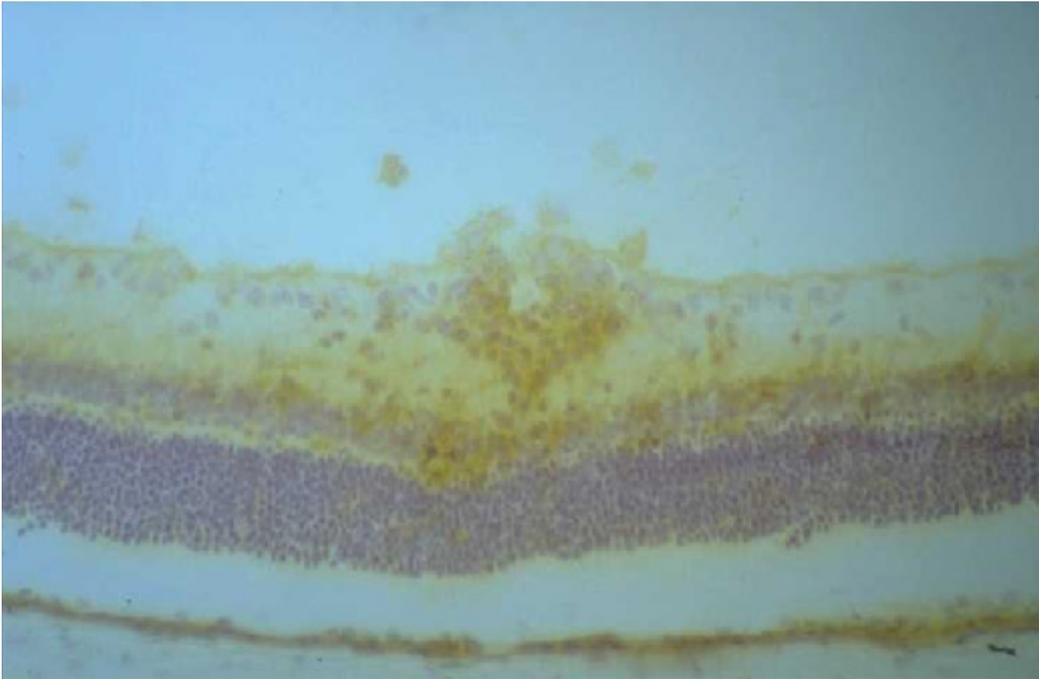


Bild 5: Darstellung von MHC Klasse I Antigen durch den OX-18-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem Tier 21 d.p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

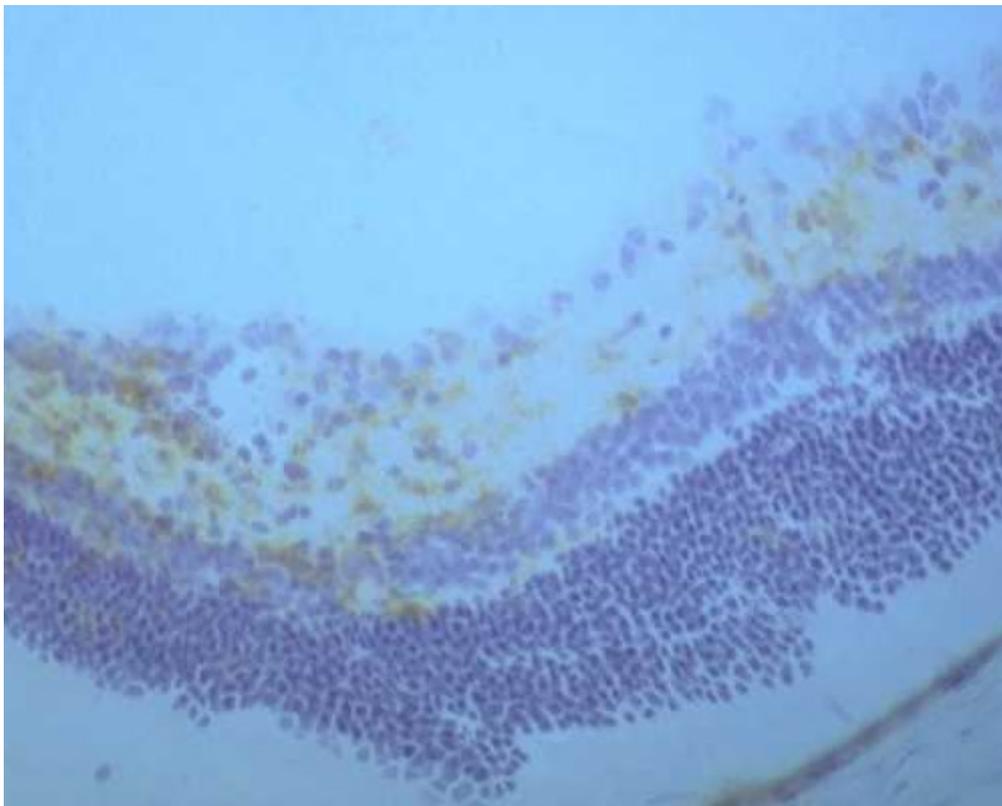


Bild 6: Darstellung von Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-systems durch den ED3-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem Tier 21 d.p.i. (Vergrößerung: 270-fach)

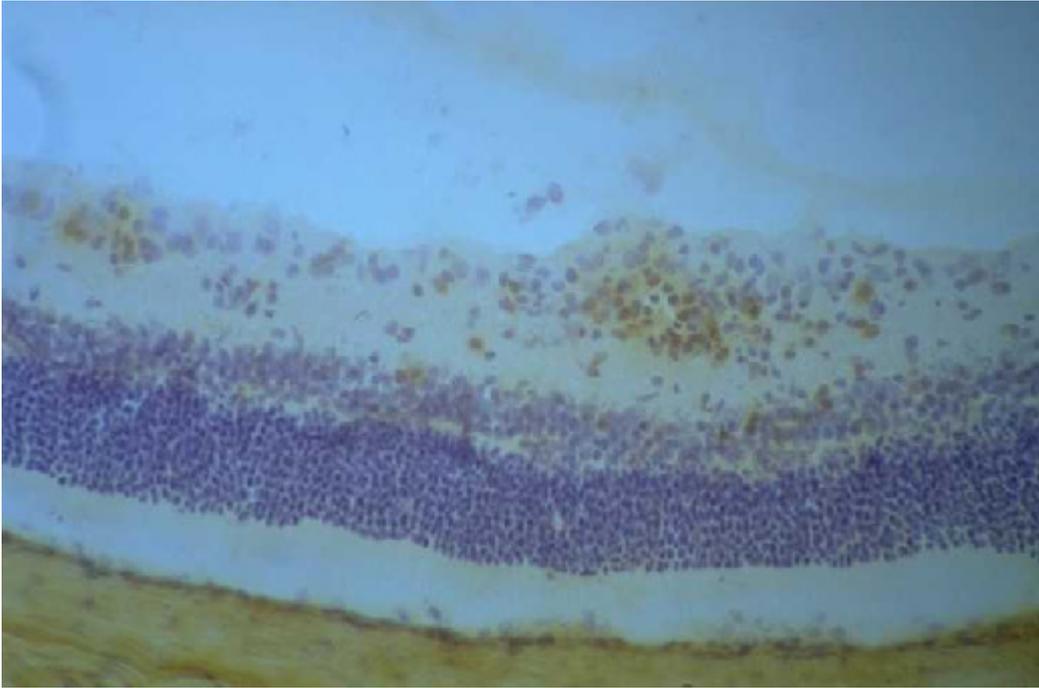


Bild 7: Darstellung von TNF bei einem adult BDV-infiziertem Tier 21 d.p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

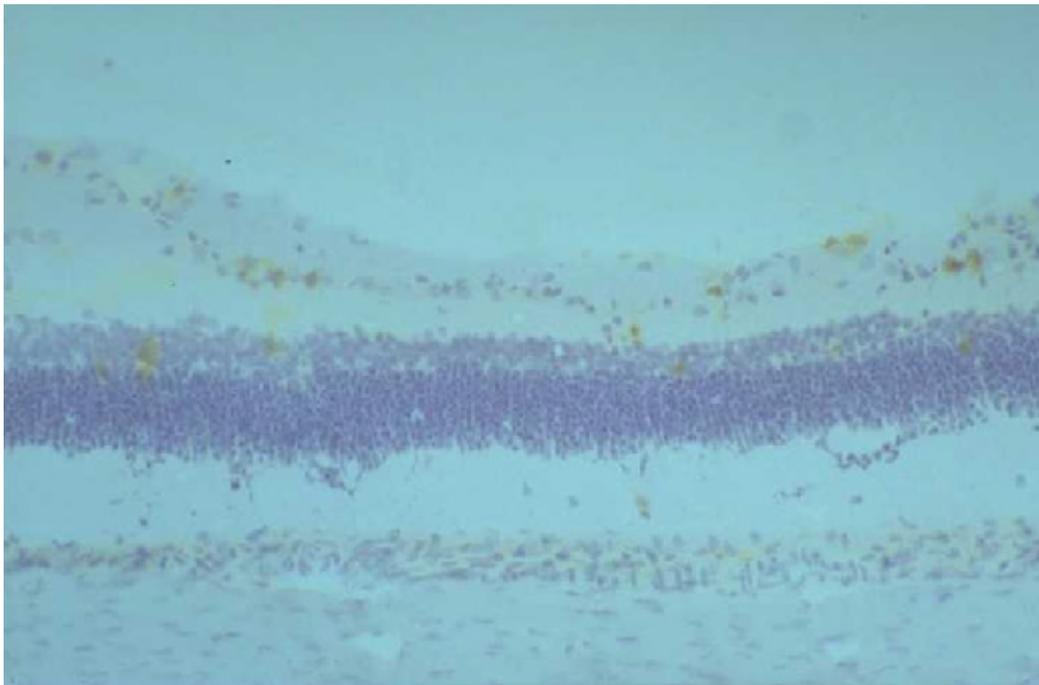


Bild 8: Darstellung von CD8+ Zellen durch den OX-8-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem Tier 4 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

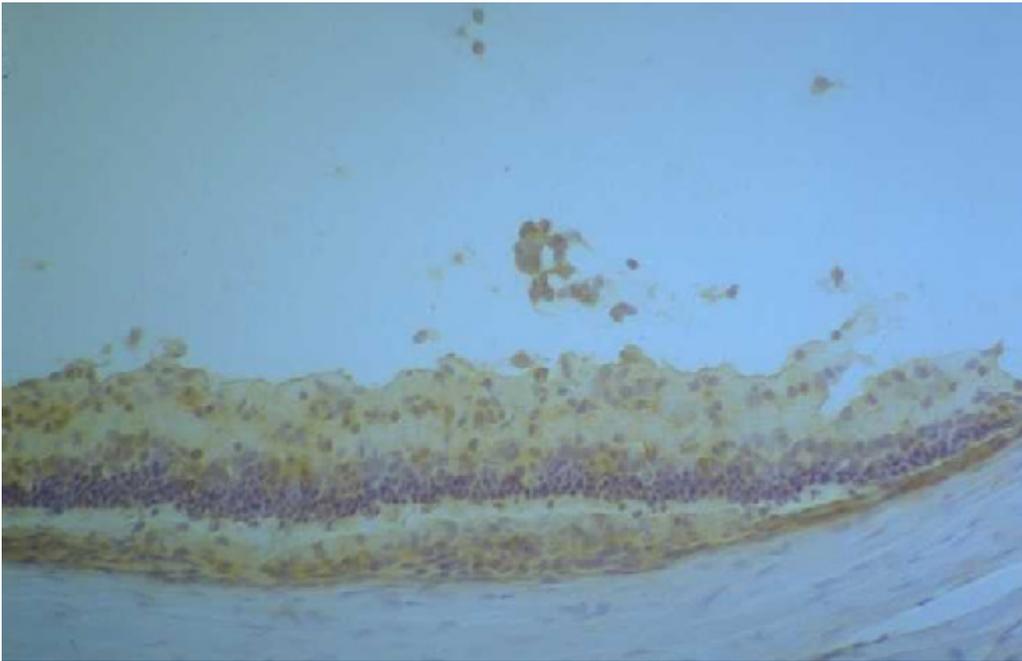


Bild 9: Darstellung von MHC Klasse I Antigen durch den OX-18-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem Tier 4 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

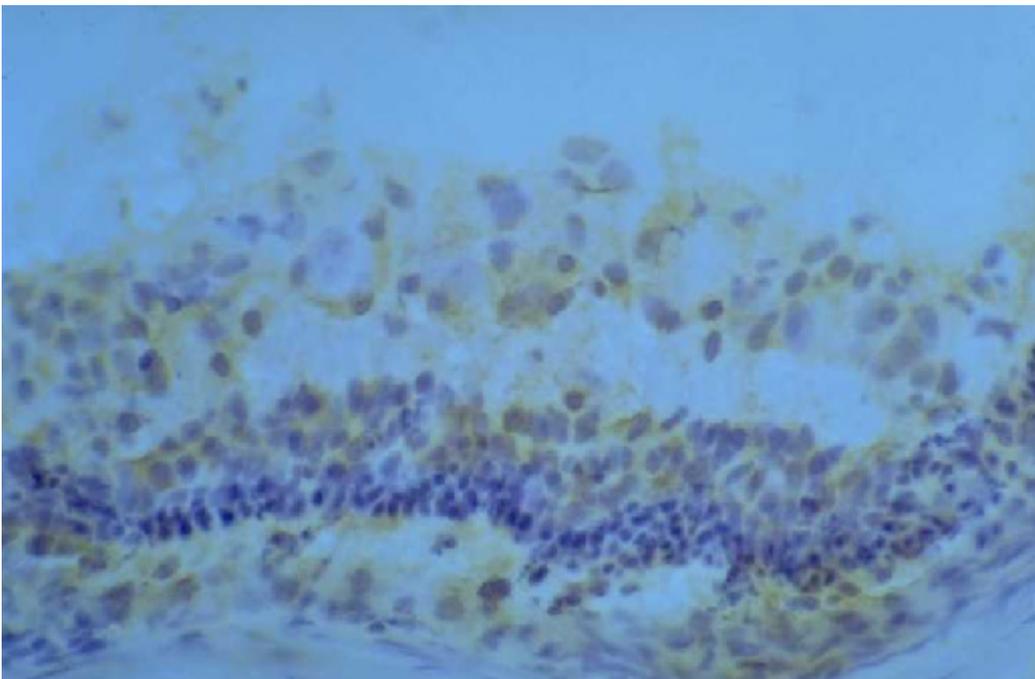


Bild 10: Darstellung von MHC Klasse II Antigen durch den OX-6-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem Tier 4 Monate p.i. (Vergrößerung: 370-fach)

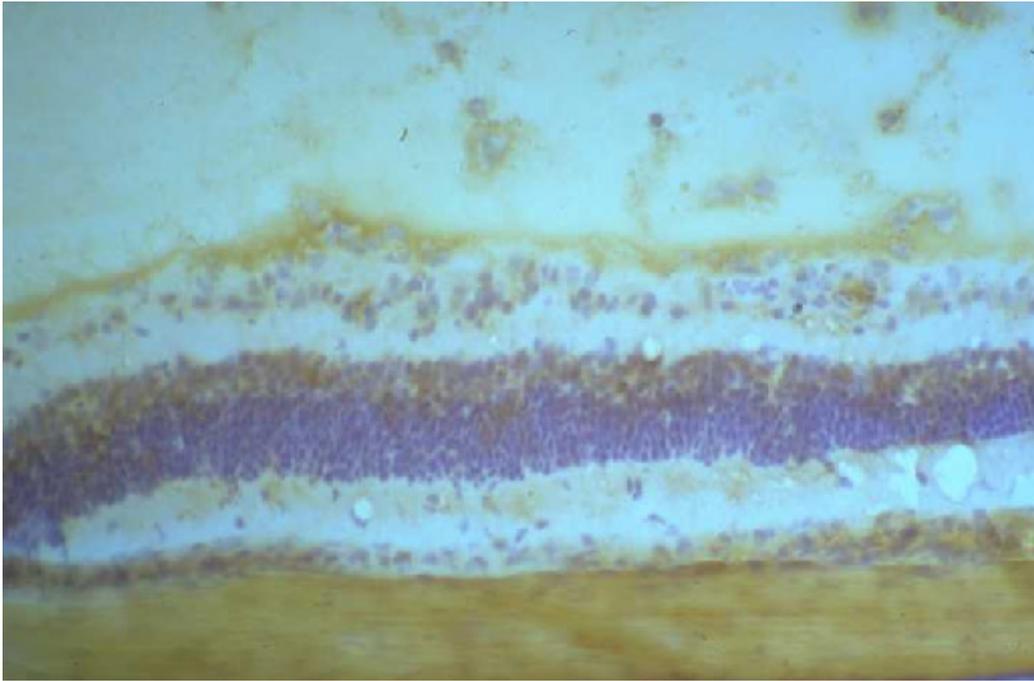


Bild 11: Darstellung von TNF bei einem adult BDV-infiziertem Tier 4 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

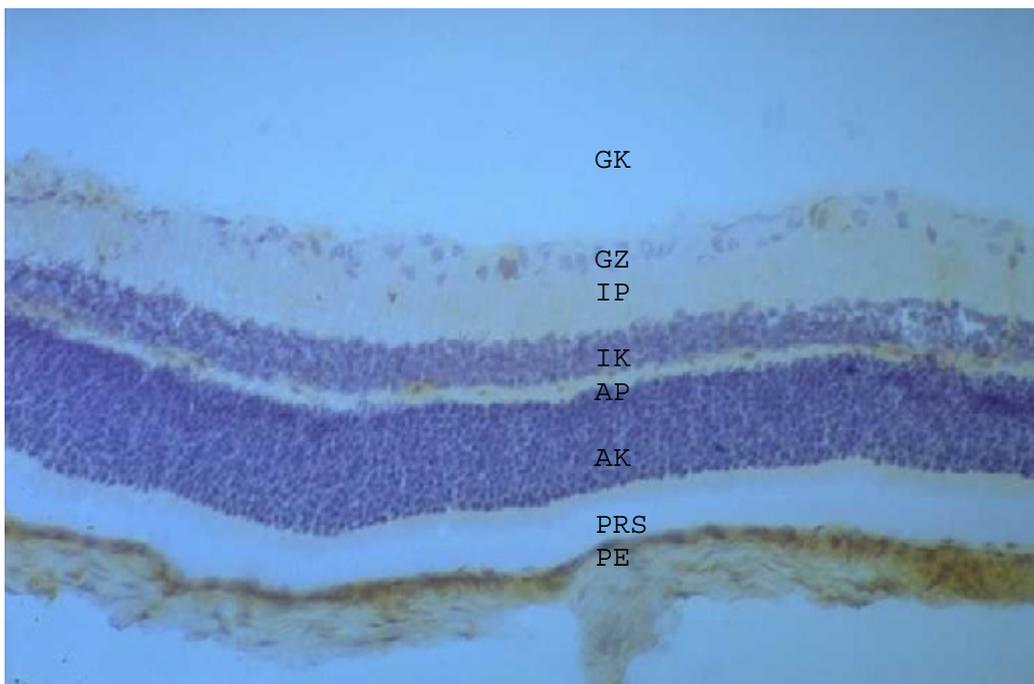


Bild 12: Darstellung von MHC Klasse I Antigen durch den OX-18-Antikörper bei einem neugeboren BDV-infiziertem Tier 28 d.p.i. (Vergrößerung: 190-fach); GK: Glaskörper; GZ: Ganglienzellschicht; IP: Innere plexiforme Schicht; IK: Innere Körnerschicht; AP: Äußere plexiforme Schicht; AK: Äußere Körnerschicht; PRS: Photorezeptorenschicht; PE: Pigmentepithel

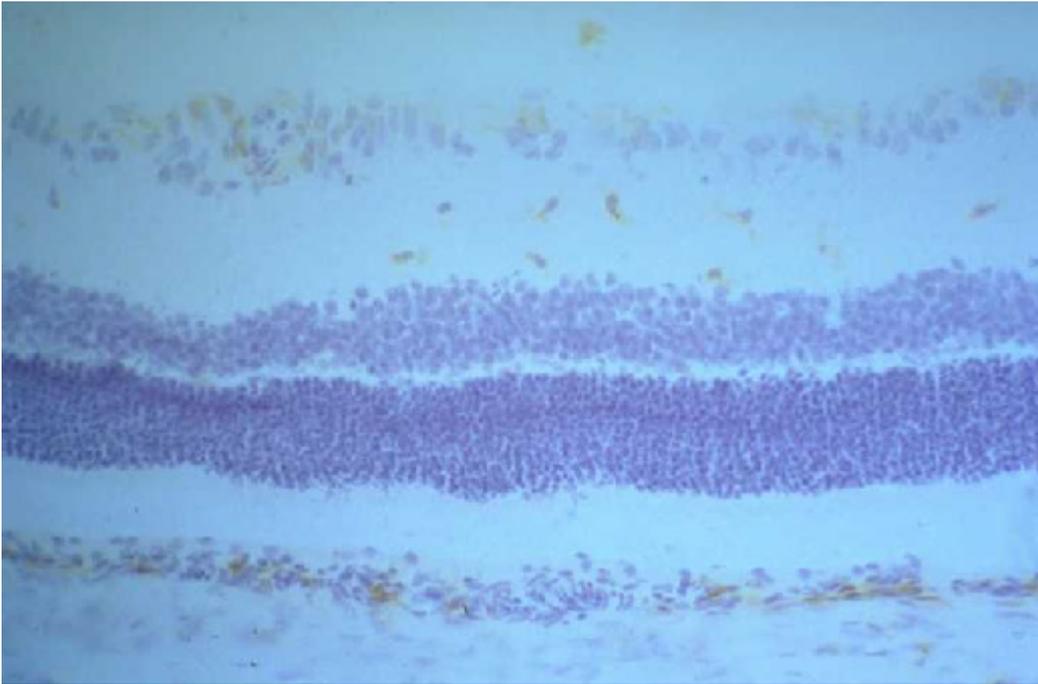


Bild 13: Darstellung von Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-systems durch den ED3-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem, mit CSA immunsupprimiertem Tier 21 d.p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

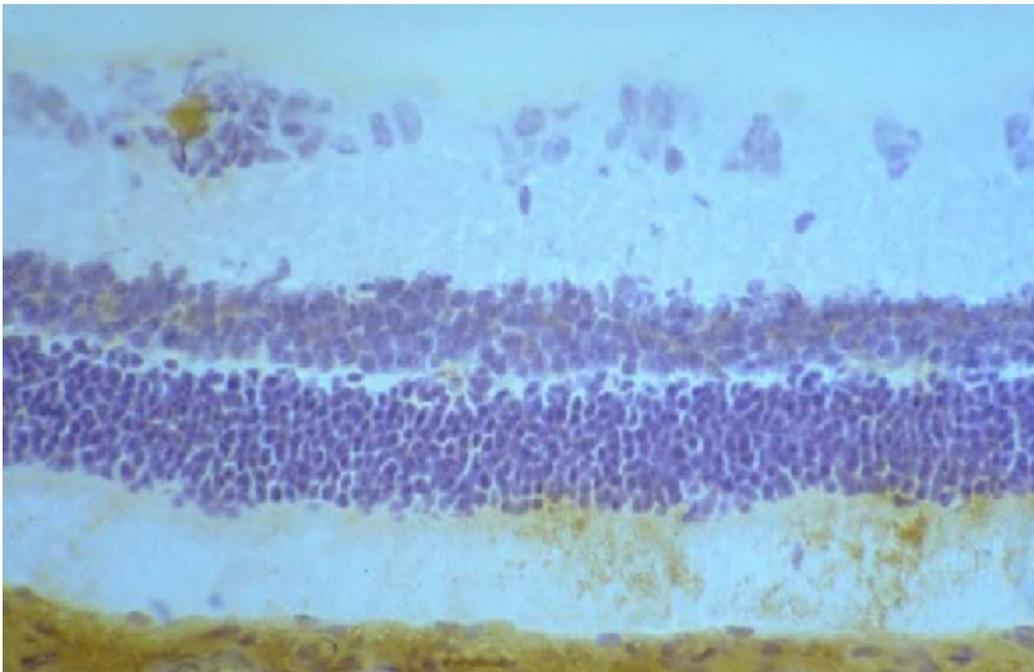


Bild 14: Darstellung von TNF bei einem neugeboren BDV-infiziertem Tier 12 Monate p.i. (Vergrößerung: 296-fach)

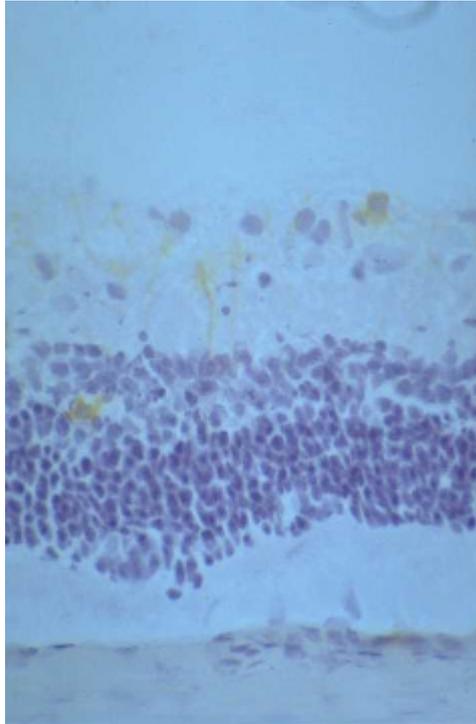


Bild 15: Darstellung von Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-systems durch den ED3-Antikörper bei einem neugeborenen BDV-infiziertem Tier 14 Monate p.i. (Vergrößerung: 264-fach)

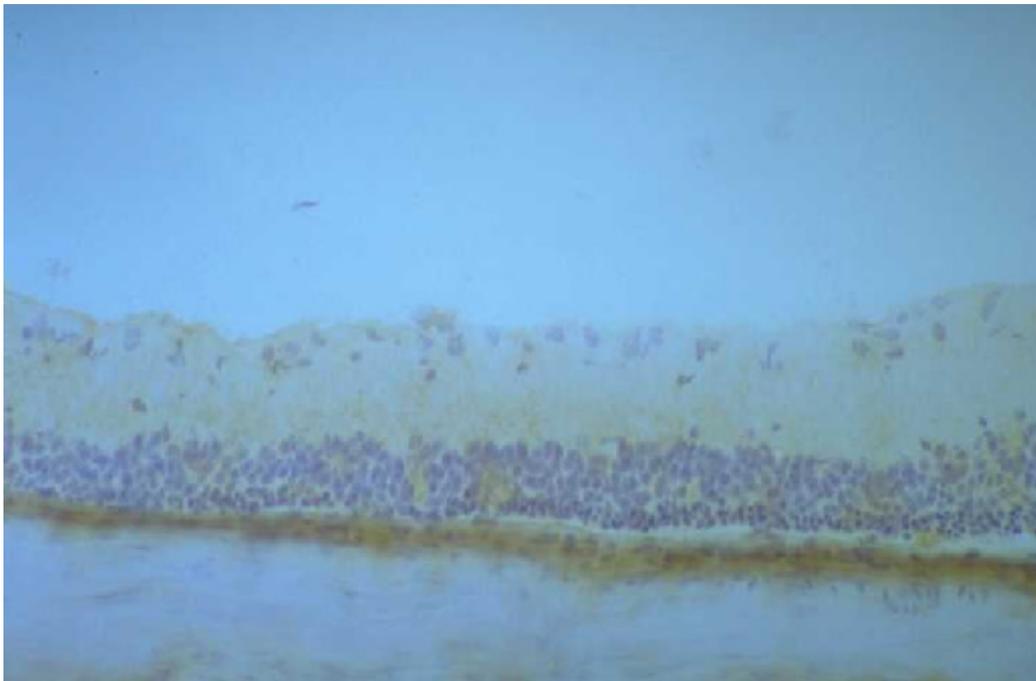


Bild 16: Darstellung von MHC Klasse I Antigen durch den OX-18-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem mit CSA immunsupprimiertem Tier 17 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

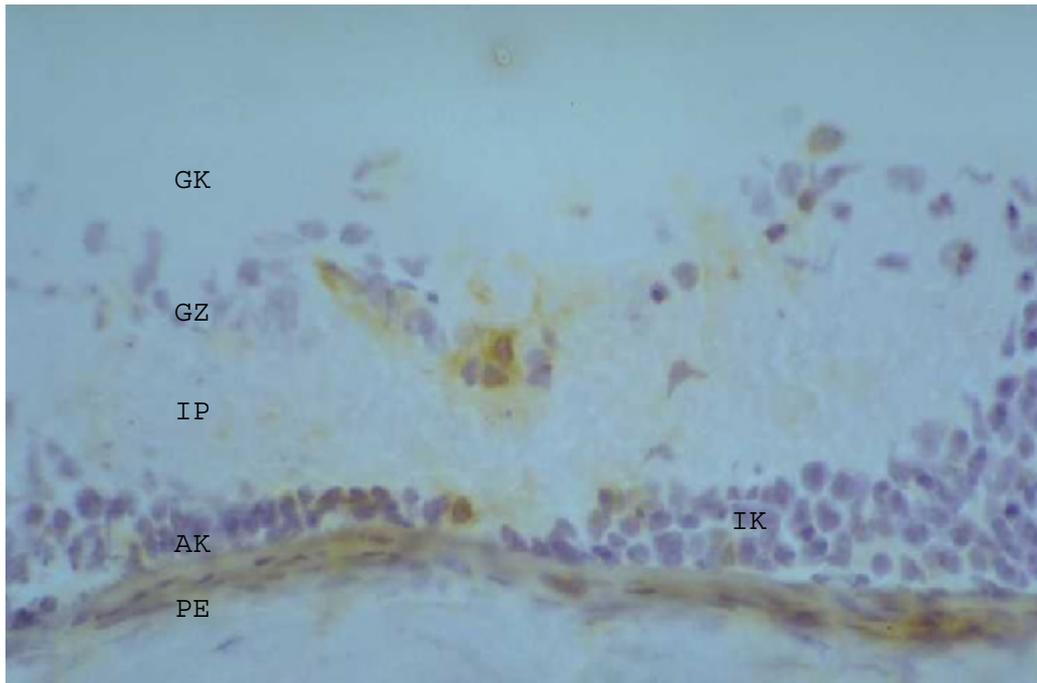


Bild 17: Darstellung von MHC Klasse II Antigenen durch den OX-6-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem mit CSA immunsupprimiertem Tier 17 Monate p.i. (Vergrößerung: 370-fach); GK: Glaskörper; GZ: Ganglienzellschicht; IP: Innere plexiforme Schicht; IK: Innere Körnerschicht; AK: Äußere Körnerschicht; PE: Pigmentepithel

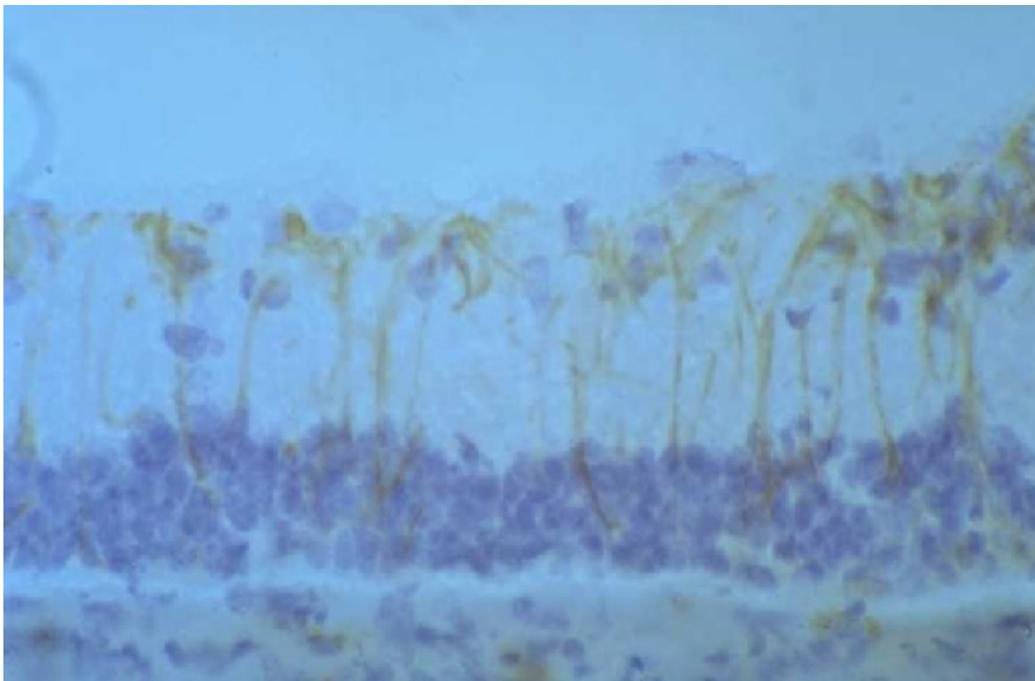


Bild 18: Darstellung von Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-systems durch den ED3-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem mit CSA immunsupprimiertem Tier 17 Monate p.i. (Vergrößerung: 370-fach)

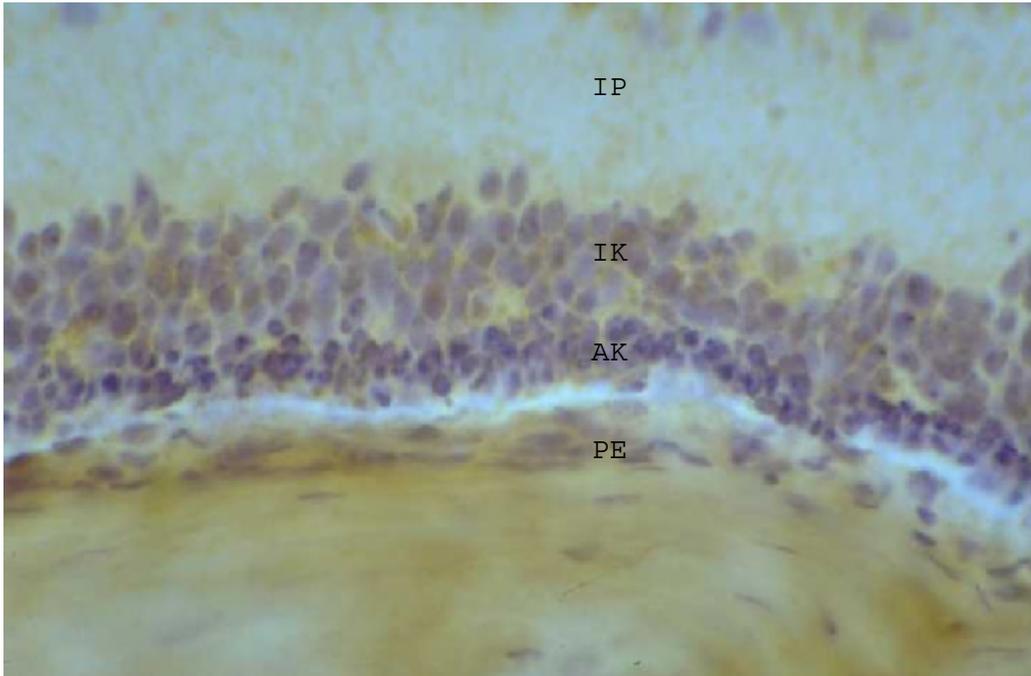


Bild 19: Darstellung von TNF bei einem adult BDV-infiziertem mit CSA immunsupprimiertem Tier 17 Monate p.i. (Vergrößerung: 473-fach); IP: Innere plexiforme Schicht; IK: Innere Körnerschicht; AK: Äußere Körnerschicht; PE: Pigmentepithel

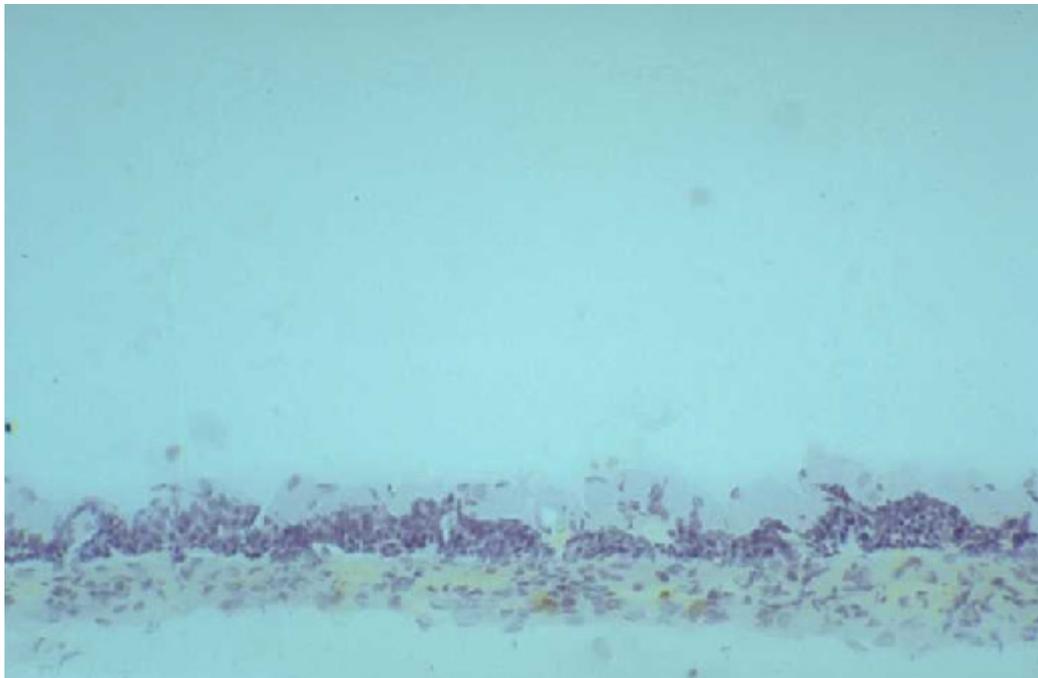


Bild 20: Immunhistochemische Färbung mit dem OX-8-Antikörper bei einem neugeboren BDV-infiziertem Tier 18 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

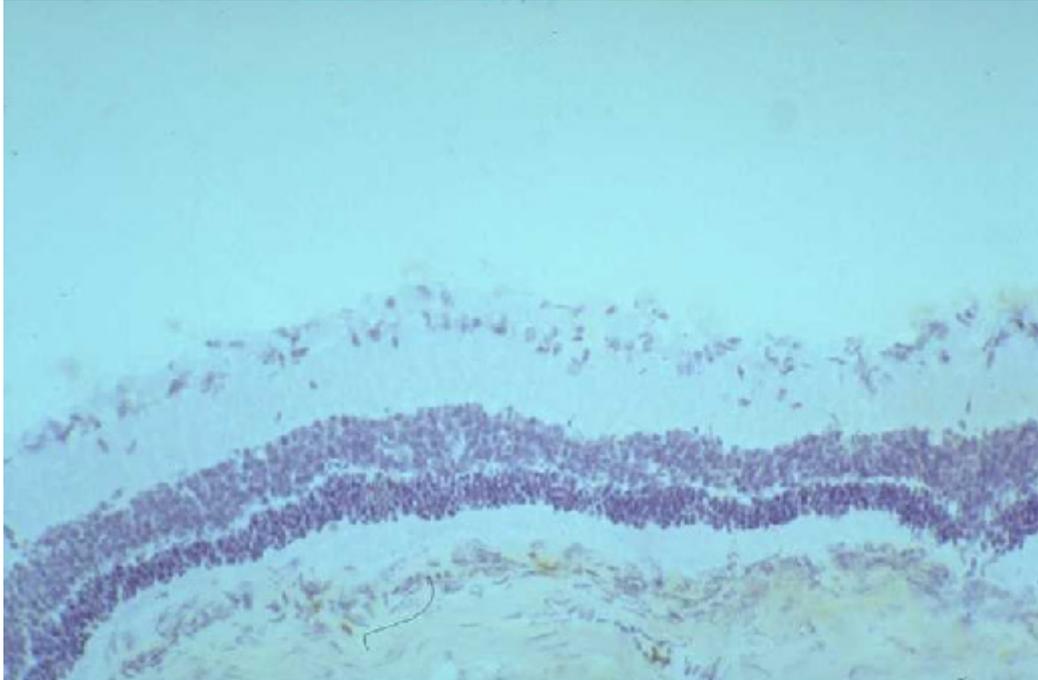


Bild 21: Immunhistochemische Färbung mit dem OX-8-Antikörper bei einem neugeboren BDV-infiziertem Tier 18 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

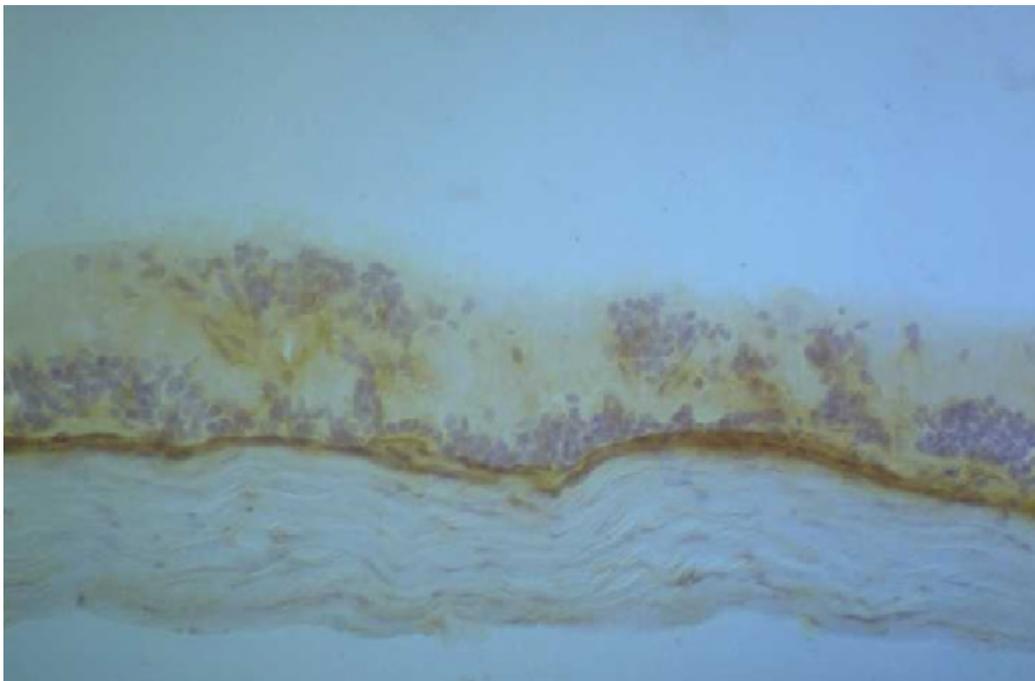


Bild 22: Darstellung von MHC Klasse I Antigenen durch den OX-18-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem mit Mehrfachgabe CY immunsupprimiertem Tier 6 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach)

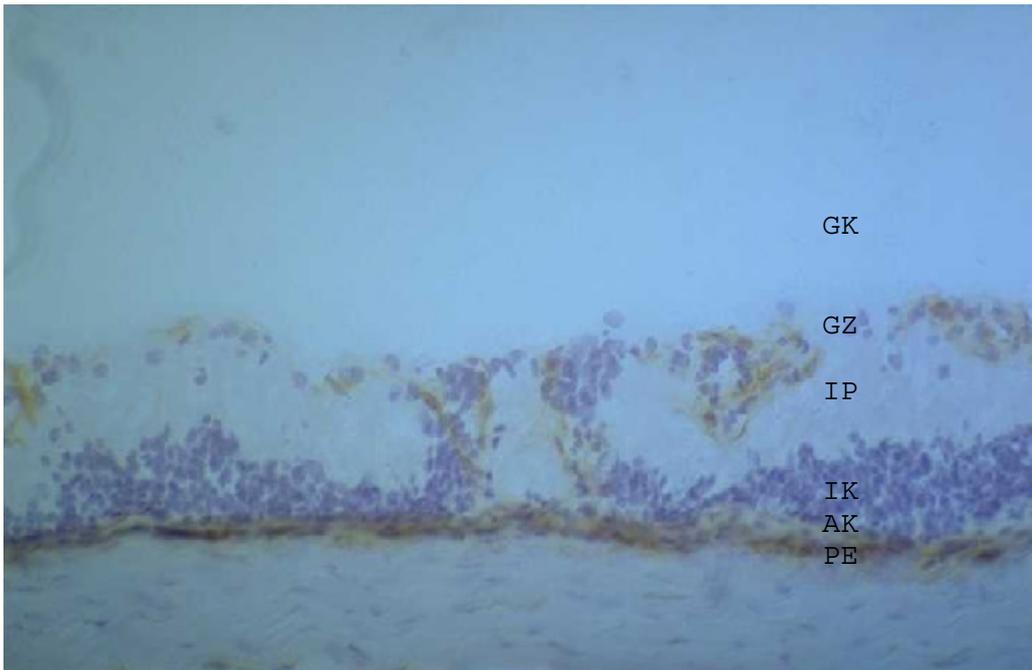


Bild 23: Darstellung von Zellen des Makrophagen-/Mikroglia-systems durch den ED3-Antikörper bei einem adult BDV-infiziertem mit Mehrfachgabe CY immunsupprimiertem Tier 6 Monate p.i. (Vergrößerung: 190-fach); GK: Glaskörper; GZ: Ganglienzellschicht; IP: Innere plexiforme Schicht; IK: Innere Körnerschicht; AK: Äußere Körnerschicht; PE: Pigmentepithel

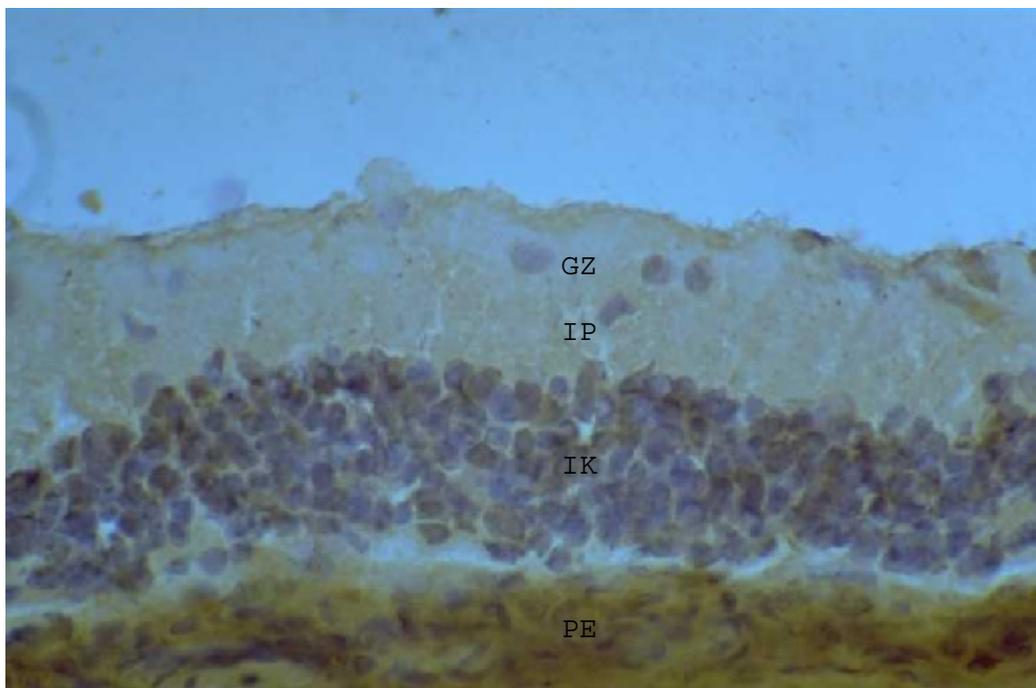


Bild 24: Darstellung von TNF bei einem adult BDV-infiziertem mit Mehrfachgabe CY immunsupprimiertem Tier 6 Monate p.i. (Vergrößerung: 370-fach); GZ: Ganglienzellschicht; IP: Innere plexiforme Schicht; IK: Innere Körnerschicht; PE: Pigmentepithel

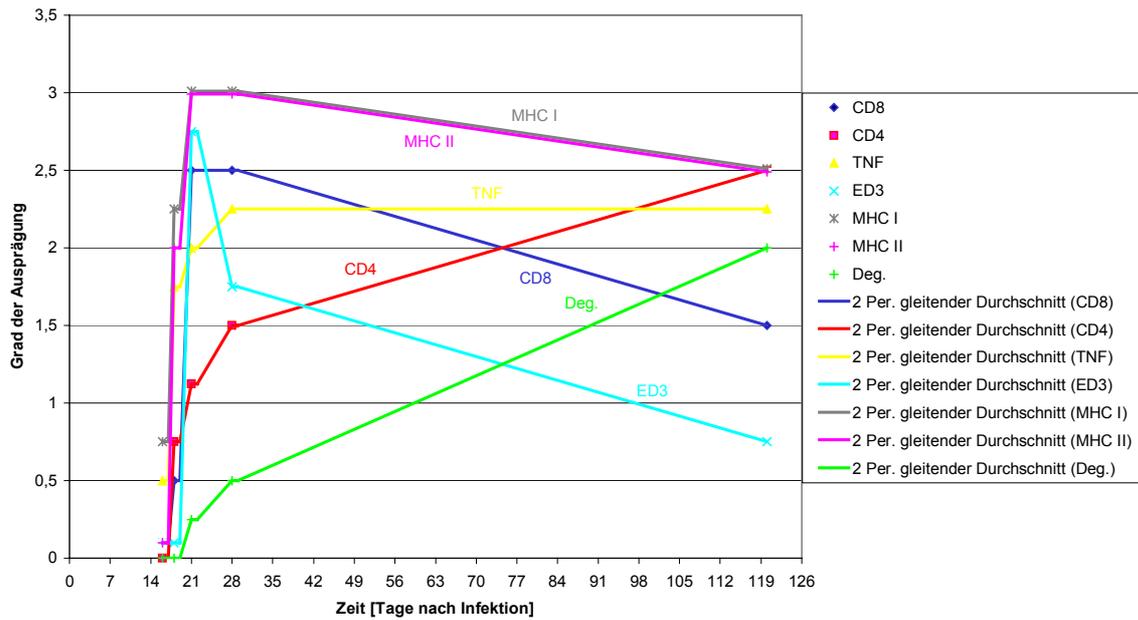


Abb. 1: Darstellung des semiquantitativen Indexes der immunhistologischen Färbungen adult BDV-infizierter Tiere in Abhängigkeit der Tage nach Infektion (nähere Erläuterung siehe Text)

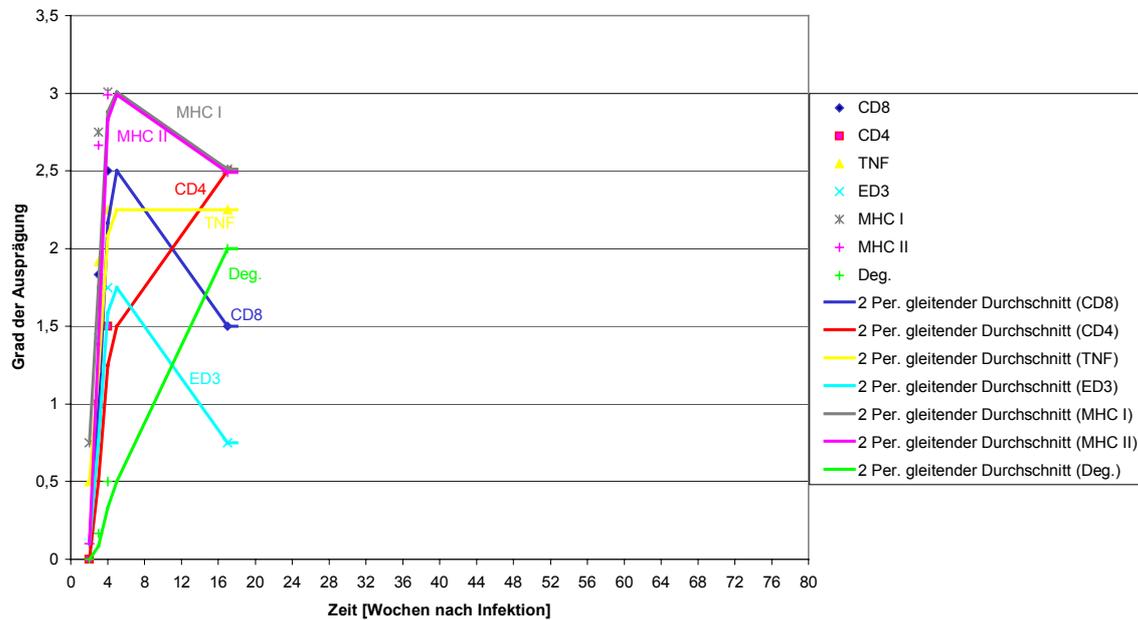


Abb. 2: Darstellung des semiquantitativen Indexes der immunhistologischen Färbungen adult BDV-infizierter Tiere in Abhängigkeit der Wochen nach Infektion (nähere Erläuterung siehe Text)

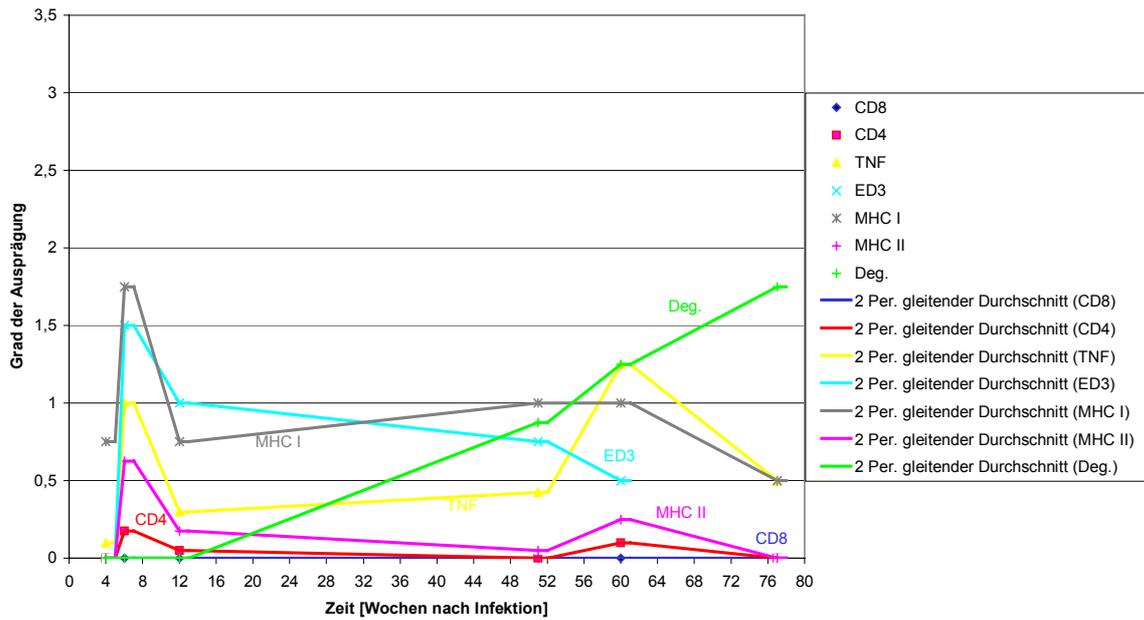


Abb. 3: Darstellung des semiquantitativen Indexes der immunhistologischen Färbungen neugeborenen BDV-infizierter Tiere in Abhängigkeit zur Zeit nach Infektion (nähere Erläuterung siehe Text)

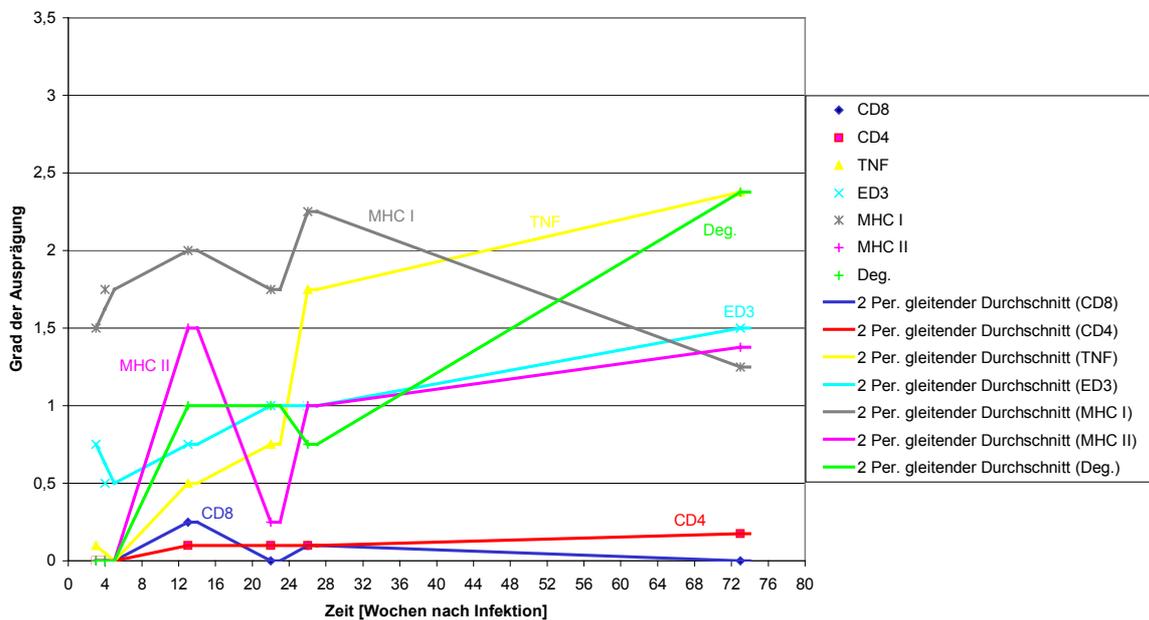


Abb. 4: Darstellung des semiquantitativen Indexes der immunhistologischen Färbungen adult BDV infizierter, durch CSA immunsupprimierter Tiere in Abhängigkeit zur Zeit nach Infektion (nähere Erläuterung siehe Text)

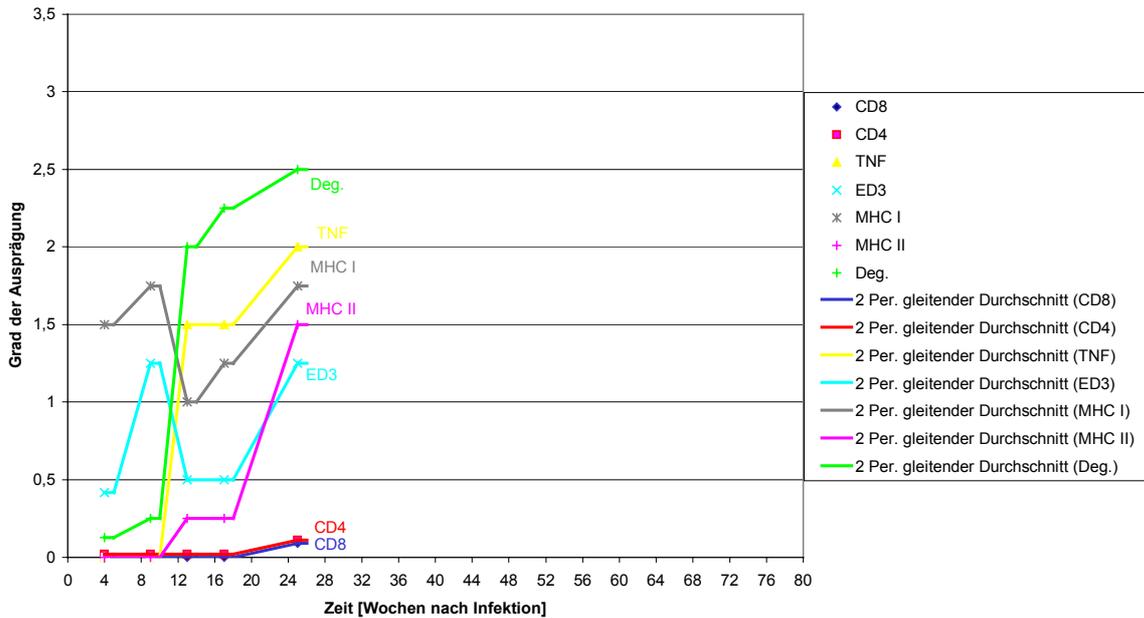


Abb. 5: Darstellung des semiquantitativen Indexes der immunhistologischen Färbungen adult BDV infizierter, durch Mehrfachgabe CY immunsupprimierter Tiere in Abhängigkeit zur Zeit nach Infektion (nähere Erläuterung siehe Text)

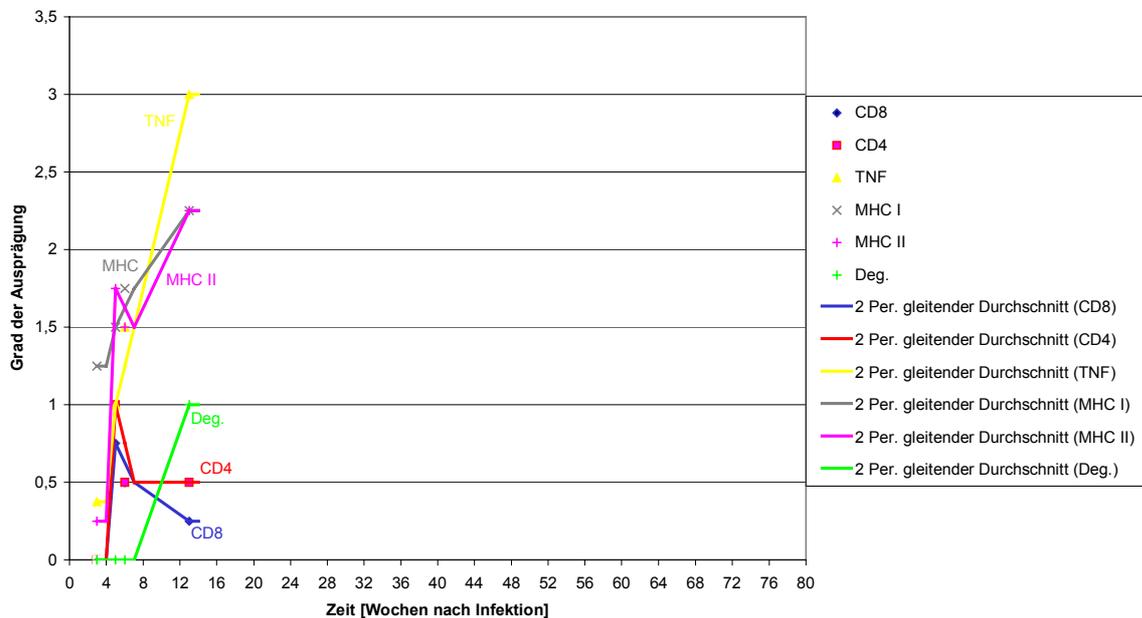


Abb. 6: Darstellung des semiquantitativen Indexes der immunhistologischen Färbungen adult BDV infizierter, durch Einmalgabe CY immunsupprimierter Tiere in Abhängigkeit zur Zeit nach Infektion (nähere Erläuterung siehe Text)

8 Zusammenfassung

Das Borna Virus (Borna Disease Virus, BDV) ist ein neu klassifiziertes neurotropes RNA-Einzelstrangvirus, das bei Säugetieren - und wahrscheinlich auch beim Menschen - persistierende Infektionen des Zentralnervensystems (ZNS) einschließlich der Retina verursacht. Die Infektion kann unterschiedliche neurologische Krankheiten auslösen, die durch Lern-, Gedächtnis- und Bewegungsstörungen, Verhaltensänderungen, psychiatrische Krankheiten, Lähmungen, Demenz und Blindheit gekennzeichnet sein können. Uneinheitlichkeit und Komplexität der Borna-Krankheit (BD) scheinen überwiegend von der Immunantwort des Wirts abzuhängen, da das BDV selbst sich durch bemerkenswerte genomische Stabilität auszeichnet. Die am längsten bekannten natürlichen Wirte des BDV sind Pferd und Schaf, bei denen es schwere Polioenzephalomyelitiden verursacht. Das am weitesten verbreitete experimentelle Modell ist die BD der Ratte, bei der es zu einem biphasischen Krankheitsverlauf kommt: Innerhalb von zwei Wochen nach intracerebraler oder intranasaler Infektion entwickelt sich eine akute lymphozytäre Polioenzephalitis, bei der CD8⁺ T-Zellen vor allem durch die Zerstörung BDV-infizierter Neurone und Gliazellen eine entscheidende Rolle spielen. Über den Tractus opticus breitet sich das BDV in die Retina aus, wo es zu schweren entzündlichen Reaktionen und erheblichen Verlusten von retinalem Gewebe kommt. Etwa sechs Wochen nach Infektion geht die akute Phase der BD in einen chronisch-degenerativen Verlauf über, wobei entzündliche Reaktionen stark abgeschwächt sind oder ganz fehlen. Drei bis sechs Monate nach Infektion besteht eine ausgeprägte Gehirn- und Retinaatrophie. Bei immunkompromittierten Ratten führt die Infektion dagegen nicht zur akuten klinischen Erkrankung. Es finden sich kaum entzündliche Reaktionen, dennoch zeigen auch diese Tiere nach Verlauf von sechs bis neun Monaten erhebliche Substanzverluste des ZNS. Die Pathogenese dieser nicht-entzündlichen neurodegenerativen Veränderungen ist bisher nicht geklärt.

Um weitere Informationen über die Pathogenese entzündlicher und nicht-entzündlicher neurodegenerativer Veränderungen bei der BD zu erhalten, wurde die Retina BDV-infizierter Ratten mit unterschiedlichem Immunstatus und unterschiedlichen Krankheitsverläufen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion untersucht. Dabei wurden Entzündungszellen, Immunmoleküle und die zelluläre Expression von MHC-Klasse I und II-Antigen immunhistologisch charakterisiert.

Die Retinitis der immunkompetenten Ratten war durch perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate hauptsächlich in der Ganglienzellschicht gekennzeichnet. Die entzündlichen Reaktionen wurden durch CD4+ und CD8+ T-Zellen dominiert, darüberhinaus waren Zellen des Mikroglia-/Makrophagensystems beteiligt, jedoch kaum Plasmazellen. Die entscheidende Rolle von MHC-Klasse I restringierten zytotoxischen CD8+ T-Zellen konnte durch Behandlung BDV-infizierter Tiere mit verschiedenen Anti T-Zell-Antikörpern bestätigt werden. Die Expression von MHC-Antigen war nicht auf Entzündungszellen beschränkt, besonders MHC-Klasse I Antigen fand sich auch auf Retinazellen. Tumornekrosefaktor wurde im Bereich der entzündlichen Infiltrate, darüberhinaus jedoch auch an ortständigen Zellen nachgewiesen. Ähnlich dem Gehirn führten die immunpathologischen Prozesse zu einer nahezu völligen Destruktion der Retina.

Im Gegensatz dazu waren bei neugeborenen infizierten oder durch Behandlung mit Cyclosporin A oder Cyclophosphamid immunsupprimierten Ratten fast keine zellulären entzündlichen Reaktionen in der Retina nachweisbar. Nach über einjährigem Beobachtungszeitraum war jedoch auch hier eine weitgehende Degeneration der Retina festzustellen. Während des gesamten Untersuchungszeitraums waren in der Retina der immunkompromittierten Tiere vermehrt Zellen des Mikroglia-/Makrophagensystems, die Expression von MHC-Klasse I Antigen auf BDV-infizierten ortständigen Zellen, insbesondere Neuronen, und die Expression von Tumornekrosefaktor nachweisbar. Die Aktivierung des Mikroglia/Makrophagen-Systems ist hierbei sowohl als Effektor, aber auch als Folge degenerativer Veränderungen denkbar.

Es ist zu vermuten, daß bei der BDV-induzierten Retinopathie der Ratte neben "klassischen" immunpathologischen Mechanismen wie der Reaktion zytotoxischer T Zellen oder der Wirkung von TNF andere neurotoxische Mediatoren existieren, die zur Zerstörung der Retina beitragen. Bei immuninkompetenten Tieren erzeugt das BDV zumindest indirekt neurodegenerative Prozesse in Abwesenheit klassischer Entzündungsprozesse.

9 Summary

The Borna disease virus (BDV) is a newly classified negative strand RNA virus that causes persistent infection of the central nervous system (CNS) including the optic system in warmblooded animals and in man. BDV can induce a variety of neurological diseases ranging from subtle disturbances of learning and memory, to dramatic abnormalities of movement and behavior, including psychiatric disease, as well as blindness. The different manifestations of BD obviously depend on the presence or absence of the host's immune response. In the most common experimental model, adult-infected rats with intact cellular and humoral immune responses, both T and B cell reactions in the brain are observed after infection and the generation of a T cell response has been demonstrated to be critical in the development of the dramatic form of disease. MHC class I restricted cytotoxic CD8+ T cells exert an important role in pathogenesis through destruction of virus-infected CNS cells, including neurons. In contrast, infection of immunoincompetent animals as either newborns, or adult animals subjected to immunosuppressive therapies, does not result in clinical disease.

The retina is part of the central nervous system and has often been reported to be infected after experimental intracerebral infection with BDV, developing a severe inflammatory reaction including significant loss of retinal tissue.

In order to determine the impact of the immune response for neuropathogenesis in experimentally BDV-infected rats, the retina of adult-infected immunocompetent rats as well as of immunocompromised rats either infected as newborns or subjected to immunosuppressive drugs, i.e. cyclosporin A and cyclophosphamide, was investigated by characterizing inflammatory cell infiltrates, immune molecules and cellular expression of MHC class I and class II antigens.

The retinitis characterized by perivascular lymphocytic infiltrates especially in the ganglion cell layer is dominated by CD4+ and CD8+ T cells, comparable to the BDV-encephalitis. Correlating to that findings an expression of MHC class I and II antigen by inflammatory cells could be demonstrated especially perivascularly. In addition the MHC class I antigen became evident on resident cells, essentially on neurons, resulting in a MHC class I expression distributed through-out all retinal layers. There was no evidence for local plasma cells to be involved in the neurodegenerative process. Cells of the mononuclear phagocytic system (macrophages/microglia) were regarded to be reactive. Expression of TNF was demonstrated correlating with

inflammatory cells especially in the perivascular infiltrates, but to a smaller extent also on resident cells. The inflammatory reactions result in accordance to the brain pathology in a nearly total destruction of the neuronal cell layers. Different treatments with several antibodies for T-cell-depletion confirm the major role of MHC class I restricted cytotoxic CD8+ T cells in BDV-infected immunocompetent rats.

In contrast, newborn-infected or immunocompromised rats, i.e. treated with cyclosporin A or cyclophosphamide, do not react by cellular inflammatory infiltrations but retinal cell loss up to extending degeneration of the retinal layers occurred in the presence of immune molecules as exemplified by TNF-antibody. Cells of the mononuclear phagocytic system (macrophages/microglia) could be demonstrated and seem to be responsible for a MHC class I expression, which is to a lower extent also detectable on resident cells, especially neurons. MHC class II antigen plays a minor role and seems to be expressed by cells of the phagocytic system. After experimental BDV-infection of immunocompromised rats complex processes become evident, in which TNF plays an important role, may be an immunomodulatory, may be a cytotoxic one. The cells of the macrophage-/microglia system could be reason or result of the degenerative processes. Taken the BDV-induced retinopathy to be representative for neurodegeneration in BD, it can be suggested that organ atrophy in BD is mainly mediated by immune mechanisms, even in the absence of inflammation. The possibility, that BDV itself is involved in the neurodegenerative processes, cannot be excluded.

10 Literatur

- AHMED, R., BUTLER, L.D. & BHATTI, L. (1988) T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody response. *J. Virol.* 62, 2102.
- AKAISHI, K., ISHIGURO, S., DURLU, Y.K. & TAMAI, M. (1998) Quantitative analysis of major histocompatibility complex class II-positive cells in posterior segment of Royal College of Surgeons rat eyes. *Jpn. J. Ophthalmol.* 42, 357.
- ALTERS, S.E., SAKAI, K., STEINMAN, L. & OI, V.T. (1990) Mechanisms of anti CD4-mediated depletion and immunotherapy. A study using a set of chimeric anti-CD4 antibodies. *J. Immunol.* 144, 4587.
- ALTMAN, J. & BAYER, S.A. (1997) An overview of the postnatal development of the rat cerebellum, *Development of the Cerebellar System in Relation to its Evolution, Structure, and Functions*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 324-333.
- ALTMANN, D., KRONENBERGER, H., SCHÜPPEL, K.F., LIPPMANN, R. & ALTMANN, I. (1976). Bornasche Krankheit bei Neuwelttylopiden und Equiden. *Verh. Ber. Erkr. Zootieren* 13, 127.
- AMSTERDAM, J.E., WINOKUR, A., DYSON, W., HERZOG, S., GONZALEZ, F., ROTT, R. & KOPROWSKI, H. (1985) Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 42, 1093.
- ANDERSON, G., JENKINSON, E.J., MOORE, N.C. & OWEN, J.J. (1993) MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cells are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* 362, 70.
- ANZIL, A.P., BLINZINGER, K. & MAYR, A. (1973) Persistent Borna virus infection in adult hamsters. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 40, 52.
- ASHASH, E., MALKINSON, M., MEIR, R., PERL, S. & WEISMANN, Y. (1996) Causes of losses including a Borna disease paralytic syndrome affecting young

ostriches of one breeding organization over a five-year period (1989-1993). Avian-Dis. 40, 240.

AUTENRIED, P. & HALLORAN, P.F. (1985) Cyclosporine blocks the induction of class I and class II MHC products in mouse kidney by graft-vs-host disease. J. Immunol. 135, 3922.

AUTHENRIETH, 1813 zit. nach ZWICK, 1939

BAENZIGER, J., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R.M. & COLE, G.A. (1986) Induction or prevention of immunopathological disease by cloned cytotoxic T cell lines specific for lymphocytic choriomeningitis virus. Eur. J. Immunol. 16, 387.

BALASINGAM, V., TEJADA-BERGES, T., WRIGHT, E., BOUCKOVA, R. & YONG, V.W. (1994) Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. J. Neurosci. 14, 846.

BALE, J.F. JR., O'NEIL, M.E. & FOLBERG, R. (1991) Murine cytomegalovirus ocular infection in immunocompetent and cyclophosphamide-treated mice. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32, 1749.

BARCLAY, A.N. (1981) The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. Immunology 42, 593.

BARNA, B.P., ESTES, M.L., JACOBS, B.S., HUDSON, S. & RANSOHOFF, R.M. (1990) Human astrocytes proliferate in response to tumor necrosis factor α . J. Neuroimmunol. 30, 239.

BARON, J.L., MADRI, J.A., RUDDLE, N.H., HASHIM, G. & JANEWAY, C.A., JR. (1993) Surface expression of $\alpha 4$ integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. J. Exp. Med. 177, 57.

BAUTISTA, J.R., SCHWARTZ, G.J., DE LA TORRE, J.C., MORAN, T.H. & CARBONE, K.M. (1994) Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. Brain. Res. Bull. 34, 31.

BAUTISTA, J.R., RUBIN, S.A., MORAN, T.H., SCHWARTZ, G.J. & CARBONE, K.M. (1995) Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 90, 45.

BECHTER, K., HERZOG, S., FLEISCHER, B., SCHÜTTLER, R. & ROTT, R. (1988) Infektion mit dem Virus der Bornaschen Krankheit als Ursache von psychiatrisch relevanten Erkrankungen des Menschen? In: Beckmann, H., und Laux, G. (Hrsg.): „Biologische Psychiatrie, Synopsis 1986/87“, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo; 196.

BECHTER, K., SCHÜTTLER, R. & HERZOG, S. (1992) Case of neurological and behavioral abnormalities: due to Borna disease virus encephalitis? *Psychiatry. Res.* 42, 193.

BECHTER, K., BAUER, M., ESTLER, H.C., HERZOG, S., SCHÜTTLER, R. & ROTT, R. (1994) Erweiterte kernspintomographische Untersuchungen bei Borna-disease-Virus – seropositiven psychiatrischen Patienten und Kontrollen. *Nervenarzt.* 65, 169.

BENCSIK, A., MALCUS, C., AKAOKA, H., GIRAUDON, P., BELIN, M.F. & BERNARD, A. (1996) Selective induction of cytokines in mouse brain infected with canine distemper virus: structural, cellular and temporal expression. *J. Neuroimmunol.* 65, 1.

BENVENISTE, E.N. (1997) Cytokine expression in the nervous system. *In: Immunology of the Nervous System.* Keane, R.W., Hickey, W.F. (eds). Oxford University Press: New York, pp. 419.

BERG, A.L., REID-SMITH, R., LARSSON, M. & BONNETT, B. (1998a) Case control study of feline Borna disease in Sweden. *Vet. Rec.* 142, 715.

BERG, M., EHRENBORG, C., BLOMBERG, J., PIPKORN, R. & BERG, A.L. (1998b) Two domains of the Borna disease virus p40 protein are required for interaction with the p23 protein. *J. Gen. Virol.* 79, 2957.

BERG, A.L., DORRIES, R. & BERG, M. (1999) Borna disease virus infection in racing horses with behavioral and movement disorders. *Arch. Virol.* 144, 547.

BILZER, T. & STITZ, L. (1993) Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells. *Arch. Virol. (Suppl.)* 7, 153.

BILZER, T. & STITZ, L. (1994) Immune-mediated brain atrophy: CD8+ cells contribute to tissue destruction during Borna disease. *J. Immunol.* 153.

BILZER, T., PLANZ, O., LIPKIN, W.I. & STITZ, L. (1995) Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol* 5, 223.

BILZER, T. & STITZ, L. (1996) Immunopathogenesis of Virus Diseases Affecting the Central Nervous System. *Critical Reviews in Immunology* 16, 145.

BINZ, T., LEBELT, J., NIEMANN, H. & HAGENAU, K. (1994) Sequence analyses of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. *Virus-Res.* 34, 281.

BODE, L., RIEGEL, S., LANGE, W. & LUDWIG, H. (1992) Human infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients with chronic diseases and healthy individuals. *J. Med. Virol.* 36, 309.

BODE, L., FERSZT, R. & CZECH, G. (1993) Borna disease virus infection and affective disorders in man. *Arch. Virol. Suppl.* 7, 159.

BODE, L., DURRWALD, R. & LUDWIG, H. (1994) Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet. Rec.* 135, 283.

BODE, L., ZIMMERMANN, W., FERSZT, R., STEINBACH, F. & LUDWIG, H. (1995) Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. [see comments] *Comment in: Nat. Med.* 1, 209. *Nat. Med.* 1, 232.

BODE, L. & LUDWIG, H. (1997) Clinical similarities and close genetic relationship of human and animal Borna disease virus. *Arch. Virol. Suppl.* 13, 167.

BOREL, J.F. (1988) Immunosuppression: building on Sandimmune (Cyclosporine). *Transplant. Proc.* 20, 149.

BOREL; J.F. (1989) The cyclosporins. *Transplant Proc.* 21, 810

BREDER, C.D., HAZUKA; C., GHAYUR, T., KLUG, C., HUGININ, M., YASUDA, K., TENG, M. & SAPER, C.B. (1994) Regional induction of tumor necrosis factor α expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 11393.

BRIDEAU, R.J., CARTER, P.B., MCMASTER, W.R., MASON, D.W. & WILLIAMS, A.F. (1980) Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 10, 609.

BRIESE, T., DE LA TORRE, J.C., LEWIS, A., LUDWIG, H. & LIPKIN, W.I. (1992) Borna disease virus, a negative strand-RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11486.

BRIESE, T., SCHNEEMANN, A., LEWIS, A.J., PARK, Y.-S., KIM, S., LUDWIG, H. & LIPKIN, W.I. (1994) Genomic organization of Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4362.

BRIESE, T., HORNIG, M. & LIPKIN, W.I. (1999) Bornavirus immunopathogenesis in rodents: models for human neurological diseases. *J. Neurovirol.* 5, 604.

BRITTON, S. & PALACIOS, R. (1982) Cyclosporine A – usefulness, risks and mechanisms of action. *Immunol. Rev.* 65, 4.

BUNJES, D., HARDT, C., RÖLLINGHOFF, M. & WAGNER, H. (1981) Cyclosporine A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and interleukin 2. *Eur. J. Immunol.* 11, 657.

CAMPBELL, I.L., EDELSTON, M., KEMPER, P., OLDSTONE, M.B.A. & HOBBS, M.V. (1994) Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute phase response gene expression in Scrapie. *J. Virol.* 68, 2383.

CAPLAZI, P., WALDVOGEL, A., STITZ, L., BRAUN, U. & EHRENSPERGER, F. (1994) Borna disease in naturally infected cattle. *J. Comp. Pathol.* 111, 65.

CAPLAZI, P. & EHRENSPERGER, F. (1998) Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 203.

CARBONE, K.M., DUCHALA, C.S., GRIFFIN, J.W., KINCAID, A.L. & NARAYAN, O. (1987) Pathogenesis of Borna disease in rats: Evidence that intraaxonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J. Virol.* 61, 3431.

CARBONE, K.M., TRAPP, B.D., GRIFFIN, J.W., DUCHALA, C.S. & NARAYAN, O. (1989) Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 48, 631.

CARBONE, K.M., PARK, S.W., RUBIN, S.A., WALTRIP, R.W. & VOGELSANG, G.B. (1991a) Borna disease: Association with a maturation defect in the cellular immune response. *J. Virol.* 65, 6154.

CARBONE, K.M., MOENCH, T.R. & LIPKIN, W.I. (1991b) Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 50, 205.

CARBONE, K.M., TRAPP, B.D., GRIFFIN, J.W., DUCHALA, C.S. & NARAYAN, O. (1993) Characterization of a glial cell line persistently infected with Borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J. Virol.* 67, 1453.

CASH, E., MINTY, A., FERRARA, P., CAPUT, D., FRADELIZI, D. & ROTT, O. (1994) Macrophage-inactivating IL-13 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in rats. *J. Immunol.* 153, 4258.

CEPKO, C.L. (1995) A model for retinal fate determination. *In*: D.M. Albert & F.A. Jacobiec (Eds.), *Principles and Practice of Ophthalmology: Basic sciences*. W.B. Saunders, Boston, MA, pp. 533-542.

CERVOS-NAVARRO, J., ROGGENDORF, W., LUDWIG, H. & STITZ, L. (1981) Die Bornakrankheit beim Affen unter besonderer Berücksichtigung der enzephalitischen Reaktion. *Verh. dtsch. Ges. Path.* 65, 208.

CHAN, C.C., MATTESON, D.M., LI, Q., WHITCUP, S.M. & NUSSENBLATT, R.B. (1997) Apoptosis in patients with posterior uveitis. *Arch. Ophthalmol.* 115, 1559.

CHAUDHARY, P., AHMED, F., QUEBADA, P. & SHARMA, S. (1999) Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 67, 36.

CHEN, S., OAKES, J.E. & LAUSCH, R.N. (1993) Synergistic anti-HSV effect of tumor necrosis factor- α and interferon- γ in human corneal fibroblasts is associated with interferon- β induction. *Antiviral Res.* 22, 15.

CHEN, CH., CHIU, Y.L., WEI, F.C., KOONG, F.J., LIU, H.C., SHAW, C.K., HWU, H.G. & HSIAO, K.J. (1999) High seroprevalence of Borna virus infection in schizophrenic patients, family members and mental health workers in Taiwan. *Mol. Psychiatry.* 4, 33.

COLE, G.A., NICKELL, S.P., MOKHTRIAN, F. & SCHEIBEL, L.W. (1983) *Transpl. Proc.* 15 [Suppl. 1]: 2271.

COLTON, C.A. & GILBERT, D.L. (1987) Production of superoxide anions by CNS macrophage, the microglia. *FEBS-Lett.* 223, 284.

COMPANS, R.W., MELSEN, L.R. & DE LA TORRE, J.C. (1994) Virus-like particles in MDCK cells persistently infected with Borna disease virus. *Virus-Res.* 33, 261.

COWAN, E.P., ALEXANDER, R.K., DANIEL, S., KASHANCHI, F. & BRADY, J.N. (1997) Induction of tumor necrosis factor α in human neuronal cells by extracellular human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *J. Virol.* 71, 6982.

CUBITT, B. & DE LA TORRE, J.C. (1994) Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J. Virol.* 68, 1371.

CUBITT, B., OLDSTONE, C. & DE LA TORRE, J.C. (1994a) Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J. Virol.* 68, 1382.

CUBITT, B., OLDSTONE, C., VALCARCEL, J. & DE LA TORRE, J.C. (1994b) RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res.* 34, 69.

CUNNINGHAM, E.T. & DESOUZA, E.B. (1993) Interleukin-1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol. Today* 14, 171.

DANNER, K. (1982). *Borna-Virus und Borna-Infektion*. Ferdinand-Enke-Verlag Stuttgart.

DANNER, K. & MAYR, A. (1979) In vitro studies on Borna virus. II Properties of the virus. *Arch. Virol.* 61, 261.

DE LA TORRE, J.C., CARBONE, K.M. & LIPKIN, W.I. (1990) Molecular characterisation of Borna disease agent. *J. Virol.* 179, 853.

DE LA TORRE, J.C. (1994) Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* 68, 7669.

DE LA TORRE, J.C., BODE, L., DURRWALD, R., Cubitt, B. & LUDWIG, H. (1996a) Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus Res.* 44, 33.

DE LA TORRE, J.C., GONZALEZ-DUNIA, D., CUBITT, B., MALLORY, M., MUELLER-LANTZSCH, N., GRASSER, F.A., HANSEN, L.A. & MASLIAH, E. (1996b) Detection of Borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. *Virology* 223, 272.

DEL CERRO, M., GROVER, D.A., MONJAN, A.A., PFAU, C.J. & DEMATTE, J.E. (1982) Chronic retinitis in rats infected as neonates with lymphocytic choriomeningitis virus: A clinical, histopathological and electroretinographic study. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 23, 697.

DESCHL, U., STITZ, L., HERZOG, S., FRESE, K. & ROTT, R. (1990) Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta. Neuropathol.* 81, 41.

DIETERICH, C.E. (1967). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die synaptischen Formationen der Photorezeptoren einiger Mammalier. *Verh. D. Anat. Gesellsch.* 62, 595.

DIETRICH, D.E., SCHEDLOWSKI, M., BODE, L., LUDWIG, H. & EMRICH, H.M. (1998) A viro-psycho-immunological disease-model of a subtype affective disorder. *Pharmacopsychiatry* 31, 77.

DIETZSCHOLD, B. (1995) The role of nitric in the pathogenesis of virus-induced encephalopathies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 196, 51.

DIJKSTRA, C.D., DÖPP, E.A., JOLING, P. & KRAAL, G. (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54, 589.

DINTER, E. (1879). Meningitis cerebro-spinalis bei Pferden. *Ber. Vet. Wes. Sachsen.* 24, 121.

DITTRICH, F., BODE, L., LUDWIG, H., KAO, M. & SCHNEIDER, K. (1989) Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biol. Psychiatry.* 818.

DOHERTY, P.C., ALLAN, J.E., LYNCH, F. & CEREDIG, R. (1990) Dissection of an inflammatory process induced by CD8⁺ T cells. *Immunol. Today* 11, 55.

DRESCHER, K.M. & WHITTUM-HUDSON, J.A. (1996a) Modulation of immune-associated surface markers and cytokine production by murine retinal glial cells. *J. Neuroimmunol.* 64, 71.

DRESCHER, K.M. & WHITTUM-HUDSON, J.A. (1996b) Herpes simplex virus type 1 alters transcript levels of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in retinal glial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2302.

DUNN, A.J. (1990) Interleukin-1 as a stimulator of hormone secretion. *Progr. NeuroEndocrin-Immunol.* 3, 26.

EDINGTON, T.S., MACKMAN, N., BRAND, K. & RUF, W. (1991) The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb. Haemostasis,* 66, 67.

EIKMEIER, H. (1965). Bornasche Krankheit des Pferdes und Schafes. *Handlexikon der Tierärztlichen Praxis.* Medical Book Company, Kopenhagen 1965

EISENMAN, L.M., BROTHERS, R., TRAN, M.H., KEAN, R.B., DICKSON, G.M. & DIETZSCHOLD, B. (1999) Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *J. Neurovirol.* 5, 181.

ELLFORD, W.J. & GALLOWAY, I.A. (1933) Filtration of the virus of Borna disease through graded collodion membranes. *Brit. J. Exp. Path.* 14, 196.

ELNER, V.M., STRIETER, R.M., ELNER, S.G. ET AL. (1990) Neutrophil chemotactic factor (IL-8) gene expression by cytokine-treated retinal pigment epithelial cells. *Am. J. Pathol.* 136, 745.

FAAS, S.J., ROTHSTEIN, J.L., KREIDER, B.L., ROVERA, G., KNOWLES, B.B. (1993) Phenotypically diverse mouse thymic stromal cell lines which induce proliferation and differentiation of hematopoietic cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 1201.

FAWCETT, D.W. (1986) *A textbook of histology*. 11. Auflage, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto.

FISCHER, M., MACNEIL, I., SUDA, T., KAPP, J.E., SHORTMAN, K. & ZLOTNIK, A. (1991) Cytokine production by mature and immature thymocytes. *J. Immunol.* 146, 3452.

FLEISCHER, B. (1984) Acquisition of specific cytotoxic activity by human T4 T lymphocytes in culture. *Nature.* 308, 365.

FONTANA, A., FIERZ, W. & WEKERLE, H. (1984) Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cell lines. *Nature*, 273.

FONTANA, A., FREI, K., BODMER, S., HOFER, E., SCHREIER, M.H., PALLADINO, M.A.JR. & ZINKERNAGEL, R.M. (1989) Transforming growth factor α inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus infected mice. *J. Immunol.* 143, 3230.

FU, Z.F., AMSTERDAM, J.D., KAO, M., SHANKAR, V., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1993a) Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with affective disorders by western immunoblot technique. *J. Affect. Disord.* 27, 61.

FU, Z.F., WEIHE, E., ZHENG, Y.M., SCHÄFER, M.K., SHENG, H., CORISDEO, S., RAUSCHER, F.J., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1993b) Differential affects of rabies and borna disease viruses on immediate-early- and late-response gene expression in brain tissues. *J. Virol.* 67, 6674.

FUKOMOTO, T., MCMASTERS, W.R. & WILLIAMS, A.F. (1982) Mouse monoclonal antibodies against rat major histocompatibility antigens. Two Ia antigens and expression of Ia and class I antigens in rat thymus. *Eur. J. Immunol.* 12, 237.

GADIANT, R.A., CRON, K.C. & OTTEN, U. (1990) Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 117, 335.

GARCIA-BUSTOS, J., HEITMAN, J. & HALL, M.N. (1991) Nuclear protein localization. *Bioch. Biophys. Acta* 1071, 83.

GAUCHAT, J.F., KHANDJIAN, E.W. & WEIL, R. (1986) Cyclosporin A prevents induction of the interleukin 2 receptor gene in cultured murine thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6430.

GEHRMANN, J., BONNEKOH, P., MIYAZAWA, T., HOSSMANN, K.A. & KREUTZBERG, G.W. (1992) Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* 12, 257.

GEIß, V. (1988) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathogenese der experimenellen Bornavirus-Retinitis der Lewis-Ratte. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

GELLERT, M. (1995) „Das Pferd ist anfänglich traurig“ – ein geschichtlicher Abriß der Bornaschen Krankheit. *Tierärztl.-Prax.* 23, 207.

GERSCHENSON, L.E. & ROTELLO, R.J. (1992) Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.* 6, 2450.

GILLESPIE, J.G., CAVANAGH, H.M.A., BEHAN, W.M.H., MORRISON, L.J.A., MCGARRY, F. & BEHAN, P.O. (1993) Increased transcription of interleukin-6 in the brain of mice with chronic enterovirus infection. *J. Gen. Virol.* 74, 741.

GIULIAN, D. & LACHMAN, L. (1985) Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science* 228, 497.

GONZALEZ-DUNIA, D., EDDLESTON, M., MACKMAN, N., CARBONE, K. & DE LA TORRE, J.C. (1996) Expression of tissue factor is increased in astrocytes within the central nervous system during persistent infection with Borna disease virus. *J. Virol.* 70, 5812.

GONZALEZ-DUNIA, D., WATANABE, M., SYAN, S., MALLORY, M., MASLIAH, E. & DE LA TORRE, J.C. (2000) Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J. Virol.* 74, 3441.

GOSZTONYI, G. & LUDWIG, H. (1984) Borna Disease of Horses. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 64, 221.

GOSZTONYI, G. & LUDWIG, H. (1995) Borna disease- neuropathology and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190, 39.

GOSZTONYI, G., DIETZSCHOLD, B., KAO, M., RUPPRECHT, C.E. & LUDWIG, H. (1993) Rabies and Borna disease. A comparative study of two neurovirulent agents. *Lab. Invest.* 68, 285.

GRAEBER, M.B., STEIT, W.J., KIEFER, R., SCHOEN, S.W. & KREUTZBERG, G.W. (1990) New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *J. Neuroimmunol.* 27, 121.

GRAUS, F., SESGURADO, O.G. & TOLOSA, E. (1988) Selective concentration of anti-Purkinje cell antibody in the CSF of two patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Acta Neurol. Scand.* 78, 210.

GRIFFIN, D.E. (1998) A review of alphavirus replication in neurons. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22, 721.

HAFEZI, F., STEINBACH, J.P., MARTI, A., MUNZ, K., WANG, Z.Q., WAGNER, E.F., AGUZZI, A. & REME, C.E. (1997) The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat. Med.* 3, 346.

HAGA, S., YOSHIMURA, M., MOTOI, Y., ARIMA, K., AIZAWA, T., IKUTA, K., TASHIRO, M. & IKEDA, K. (1997) Detection of Borna disease virus genome in normal human brain tissue. *Brain Res.* 770, 307.

HAGIWARA, K., KAWAMOTO, S., TAKAHASHI, H., NAKAMURA, Y., NAKAYA, T., HIRAMUNE, T., ISHIHARA, C. & IKUTA, K. (1997a) High prevalence of Borna disease virus infection in healthy sheep in Japan. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4, 339.

HAGIWARA, K., MOMIYAMA, N., TANIYAMA, H., NAKAYA, T., TSUNODA, N., ISHIHARA, C. & IKUTA, K. (1997b) Demonstration of Borna disease virus (BDV) in specific regions of the brains from horses positive for serum antibodies to BDV but negative for BDV RNA in the blood and internal organs. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* 186, 19.

HARRIS, C.A., DERBIN, K.S., HUNTE-MCDONOUGH, B., KRAUSS, M.R., CHEN, K.T., SMITH, D.M. & EPSTEIN, L.B. (1991) Manganese superoxide dismutase is induced by IFN- γ in multiple cell types. Synergistic induction by IFN- γ and tumor necrosis factor or IL-1. *J. Immunol.* 147, 149.

HATALSKI, C.G., KLICHE, S., STITZ, L. & LIPKIN, W.I. (1995) Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J. Virol.* 69, 741.

HATALSKI, C.G., HICKEY, W.F. & LIPKIN, W.I. (1998) Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J. Neuroimmunol.* 90, 137.

HEINIG, A. (1969) Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: Röhrer, H.: Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Jena, Fischer Verlag Band 4, 83.

HERZOG, S. & ROTT, R. (1980) Replication of Borna disease virus in cell culture. *Med. Microbiol. Immunol.* 168, 153.

HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K. & ROTT, R. (1984) Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Microbiol. Immunol.* 173, 171.

HERZOG, S., WONIGKEIT, K., FRESE, K., HEDRICH, H.J. & ROTT, R. (1985) Effects of Borna disease virus infection on Athymic rats. *J. Gen. Virol.* 66, 503.

HERZOG, S., PFEUFFER, I., HABERZETTL, K., FELDMANN, H., FRESE, K., BECHTER, K. & RICHT, J.A. (1997) Molecular characterization of Borna disease virus from naturally infected animals and possible links to human disorders. *Arch. Virol. Suppl.* 13, 183.

HICKEY, W.F. & KIMURA, H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science.* 239, 290.

HICKEY, W.F. (1991) Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol.* 1, 97.

HICKEY, W.F., HSU, B.L. & KIMURA, H. (1991) T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28, 254.

HIRANO, A., KAO, H. & LUDWIG, H. (1983) Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease infected rats. *J. Gen. Virol.* 64, 1521.

HOFFMANN, M.W., ALLISON, J. & MILLER, J.F.A.P. (1992) Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Immunology* 89, 2526.

HOOPER, D.C., OHNISHI, S.T., KEAN, R., NUMAGAMI, Y., DIETZSCHOLD, B. & KOPROWSKI, H. (1995) Local nitric oxide production in viral and autoimmune diseases of the central nervous system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 5312.

HORNIG, M., WEISSENBOCK, H., HORSCROFT, N. & LIPKIN, W.I. (1999) An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12102.

HSU, T.A., CARBONE, K.M., RUBIN, S.A., VONDERFECHT, S.L., EIDEN, J.J. (1994) Borna disease virus p24 and p38/40 synthesized in a baculovirus expression system: virus protein interactions in insect and mammalian cells. *J. Virol.* 204, 2; 854.

HUXLIN, K.R., SEFTON, A.J. & FURBY, J.H. (1992) The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *J. Neurocytol.* 21, 530.

IDE, C.F., SCRIPTER, J.L., COLTMAN, B.W., DOTSON, R.S., SNYDER, D.C. & JELASO, A. (1996) Cellular and molecular correlates to plasticity during recovery from injury in the developing mammalian brain. *Prog. Brain Res.* 108, 365.

IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E. & CHAUDURI, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265.

ISENMANN, S., WAHL, C., KRAJEWSKI, S., REED, J.C. & BAHR, M. (1997) Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1763.

IWAHASHI, K., WATANABE, M., NAKAMURA, K., SUWAKI, H., NAKAYA, T., NAKAMURA, Y., TAKAHASHI, H. & IKUTA, K. (1998) Positive and negative syndromes, and Borna disease virus infection in schizophrenia. *Neuropsychobiology* 37, 59.

JAECKLE, K.A., GRAUS, F., HOUGHTON, A.H., CARDON-CARDO, C., NIELSEN, S.L. & POSNER, J.B. (1985) Autoimmune response of patients with paraneoplastic

cerebellar degeneration to a Purkinje cell cytoplasmic protein antigen. *Ann. Neurol.* 18, 592.

JANICKE, R.U., LEE, F.H. & PORTER, A.G. (1994) Nuclear c-Myc plays an important role in the cytotoxicity of tumor necrosis factor alpha in tumor cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5661.

JANICKE, R.U., LIN, X.Y., LEE, F.H. & PORTER, A.G. (1996) Cyclin D3 sensitizes tumor cells to tumor necrosis factor-induced, c-Myc-dependent apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5245.

JEFFERIES, W.A., GREEN, J.R. & WILLIAMS, A.F. (1985) Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J. Exp. Med.* 162, 117.

JOEST, E. & DEGEN, H. (1911) Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornaschen Krankheit) des Pferdes. *Zeitschr. Inf. Krankh. Haustiere* 9, 1.

JOHNSON, E.M. & DECKWERTH, T.L. (1993) Molecular mechanism of developmental neuronal death. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 31.

JOO, C.K., CHOI, J.S., KO, H.W. ET AL. (1999) Necrosis and apoptosis after retinal ischemia: involvement of NMDA-mediated excitotoxicity and p53. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 713.

KACZA, J., VAHLENKAMP, T.W., ENBERGS, H., RICHT, J.A., GERMER, A., KUHRT, H., REICHENBACH, A., MÜLLER, H., HERDEN, C., STAHL, T. & SEEGER, J. (2000) Neuron-glia interactions in the rat retina infected by Borna disease virus. *Arch. Virol.* 145, 127.

KACZA, J., MOHR, C., PANNICKE, T., KUHRT, H., DIETZEL, J., FLUSS, M., RICHT, J.A., VAHLENKAMP, T.W., STAHL, T., REICHENBACH, A. & SEEGER, J.

(2001) Changes of the organotypic retinal organization in Borna virus-infected Lewis rats. *J Neurocytol.* 30(9-10), 801.

KAO, M., GOSZTONYI, G. & LUDWIG, H. (1983) Obesity syndrome in Borna disease virus infected rats. *Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hygiene A* 225, 173.

KAO, M., LUDWIG, H. & GOSZTONYI, G. (1984) Adaption of Borna disease virus to the mouse. *J. Gen. Virol.* 65, 1845.

KAO, M. (1985). Pathogenese der Borna Krankheit bei der Ratte: Modell zum Studium der persistenten, toleranten und subkutanen Infektion des Zentralnervensystems und für die Fettsucht (Obesity Syndrome). *Vet. Med. Diss.*, Berlin.

KAO, M., HAMIR, A.N., RUPPRECHT, C.E., FU, Z.F., SHANKAR, V., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1993) Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *Vet. Rec.* 132, 241.

KATAI, N. & YOSHIMURA, N. (1999) Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 2697.

KEHRL, J.H., WAKEFIELD, L.A., ROBERTS, A.B., JAKOWLEW, S., ALVAREZ-MON, M., DERNYCK, R., SPORN, M.B. & FAUCI, A.S. (1986a) Production of transforming growth factor- β by human T-lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* 163, 1037.

KEHRL, J.H., ROBERTS, A.B., WAKEFIELD, L.A., JAKOWLEW, S., SPORN, M.B. & FAUCI, A.S. (1986b) Transforming growth factor- β is an important immunomodulatory protein for human B-lymphocytes. *J. Immunol.* 137, 3855.

KHALIFA, M.A., RODRIGUES, M.M., RAJAGOPALAN, S. & SWOVELAND, P. (1991) Eye pathology associated with measles encephalitis in hamsters. *Arch. Virol.* 119, 165.

KISHI, M., NAKAYA, T., NAKAMURA, Y., ZHONG, Q., IKEDA, K., SENJO, M., KAKINUMA, M., KATO, S. & IKUTA, K. (1995a) Demonstration of human Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS. Lett.* 364, 293.

KISHI, M., NAKAYA, T., NAKAMURA, Y., KAKINUMA, M., TAKAHASHI, T.A. SEKIGUCHI, S., UCHIKAWA, M., TADOKORO, K., IKEDA, K. & IKUTA, K. (1995b) Prevalence of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cell from blood donors. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* 184, 135.

KITANI, T., KURATSUNE, H., FUKE, I., NAKAMURA, Y., NAKAYA, T., ASAHI, S., TOBIUME, M., YAMAGUTI, K., MACHII, T., INAGI, R., YAMANISHI, K. & IKUTA, K. (1996) Possible correlation between Borna disease virus infection and Japanese patients with chronic fatigue syndrome. *Microbiol. Immunol.* 40, 459.

KLICHE, S., BRIESE, T., HENSCHEN, A.H., STITZ, L. & LIPKIN, W. I. (1994) Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J. Virol.* 68, 6918.

KLICHE, S., STITZ, L., MANGALAM, H., SHI, L., BINZ, T., NIEMANN, H., BRIESE, T. & LIPKIN, W.I. (1996) Characterisation of the Borna disease virus phosphoprotein, p23. *J. Virol.* 70, 11; 8133.

KNOBLACH, S.M., FAN, L. & FADEN, A.I. (1999) Early neuronal expression of tumor necrosis factor- α after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *J. Neuroimmunol.* 95, 115.

KOBAYASHI, T., SHOYA, Y., KODA, T., TAKASHIMA, I., LAI, P.K., IKUTA, K., KAKINUMA, M. & KISHI, M. (1998) Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology.* 243, 188.

KOHNO, T., GOTO, T., TAKASAKI, T., MORITA, C., NAKAYA, T., IKUTA, K., KURANE, I., SANO, K. & NAKAI, M. (1999) Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J. Virol.* 73, 760.

KOMPTER, C. (1987) Untersuchungen zur Pathogenese der experimentellen Infektion mit dem Virus der Bornaschen Krankheit bei der adulten Lewis-Ratte. Vet. Med. Diss., Gießen.

KONDO, Y., OGAWA, N., ASANUMA, M., NISHIBAYASHI, S., IWATA, E. & MORI, A. (1995) Cyclosporin A prevents ischemia-induced reduction of muscarinic acetylcholine receptors with suppression of microglial activation in gerbil hippocampus. *Neurosci. Res.* 22, 123.

KONDO, Y., ASANUMA, M., IWATA, E., KONDO, F., MIYAZAKI, I. & OGAWA, N. (1996) Early treatment with cyclosporin A ameliorates the reduction of muscarinic acetylcholine receptors in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurochem. Res.* 24, 9.

KOPROWSKI, H., ZHENG, Y.M., HEBER-KATZ, E., FRASER, N., RORKE, L., FU, Z., HANLON, C. & DIETZSCHOLD, B. (1993) In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5378.

KOURO, T., KUMAR, V. & KINCADE, P.W. (2002) Relationships between early B- and NK-lineage lymphocyte precursors in bone marrow. *Blood* 100(10), 3672.

KREBS, W. (1982) Die Retina des Rindes. Fortschritte der Veterinärmedizin, Heft 34, Paul Parey, Berlin und Hamburg.

KREY, H.F., LUDWIG, H. & BOSCHEK, C.B. (1979a) Multifocal retinopathy in Borna disease virus infected rabbits. *American Journal of Ophthalmology* 87, 157.

KREY, H., LUDWIG, H. & ROTT, R. (1979b) Spread of infectious virus along the optic nerve into the retina in Borna disease virus-infected rabbits. *Arch. Virol.* 62, 161.

KREY, H.F., STITZ, L. & LUDWIG, H. (1982) Virus induced pigment epithelitis in rhesus monkeys. *Ophthalmol.* 185, 205.

KRÖNKE, M., LEONARD, W.J., DEPPER, J.M., ARYA, S.K., WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C., WALDMANN, T.A. & GREENE, W.C. (1984) Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5214.

KULL, F.C. & CUATRECASAS, P. (1981) Possible requirement of internalization in the mechanism of in vitro cytotoxicity in tumor necrosis factor serum. Cancer Res. 41, 4885.

KUROIWA, S., KATAI, N., SHIBUKI, H. ET AL. (1998) Expression of cell cycle related genes in dying cells in retinal ischemic injury. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39, 610.

KUROIWA, S., KATAI, N., YOSHIMURA, N. (1999) A possible role for p16INK4 in neuronal cell death after retinal ischemia-reperfusion injury. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 528.

LAM, T.T., ABLER, A.S., KWONG, J.M. & TSO, M.O. (1999) N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40, 2391.

LANGE, H., HERZOG, S., HERBST, T. & SCHLIESSER, T. (1987) Seroepidemiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit (Ansteckende Gehirn-Rückenmarksentzündung) der Pferde. Tierärztliche Umschau 42, 938.

LEE, S.C., LIU, W., DICKSON, D.W., BROSNAN, C.F. & BERMAN, J.W. (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. J. Immunol. 150, 2659.

LEVIN, L.A., SCHLAMP, C.L., SPIELDOCH, R.L., GESZVAIN, K.M. & NICKELLS, R. W. (1997) Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 38, 2545.

LEWANDOWSKI, G., HOBBS, M.V. & BLOOM, F.E. (1994) Alteration of intracerebral cytokine production in mice infected with herpes simplex virus type 1 and 2. *J. Neuroimmunol.* 55, 23.

LIEBERMAN, A.P., PITHA, P.M., SHIN, H.S. & SHIN, M.L. (1989) Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or neurotropic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6348.

LINDEN, R., CAVALCANTE, L.A. & BARRADAS, P.C. (1986) Mononuclear phagocytes in the retina of developing rats. *Histochemistry* 85, 335.

LING, T. & STONE, J. (1988) The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve. *Dev. Brain Res.* 44, 73.

LIPKIN, W.I., TRAVIS, K.M., CARBONE, K.M. & WILSON, C.M. (1990) Isolation and characterisation of Borna disease agent cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4184.

LIU, Y., KING N., KESSON, A., BLANDEN, R.V. & MULLBACHER, A. (1989) Flavivirus infection up-regulates the expression of class I and class II major histocompatibility antigens on and enhances T cell recognition of astrocytes in vitro. *J. Neuroimmunol.* 21, 157.

LUDWIG, H., BECHT, H. & GROH, L. (1973) Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 158, 275.

LUDWIG, H., KRAFT, W., KAO, M., GOSZTONYI, G., DAHME; E. & KREY, H. (1985). Borna-Virus-Infektion (Borna-Krankheit) bei natürlich und experimentell infizierten Tieren: ihre Bedeutung für Forschung und Praxis. *Tierärztl. Prax.* 13, 421.

LUDWIG, H., BODE, L. & GOSZTONYI, G. (1988) Borna disease. A persistent virus infection of the central nervous system. *Progr. Med. Virol.* 35, 107.

LUNDGREN, A.L., ZIMMERMANN, W., BODE, L., CZECH, G., GOSZTONYI, G., LINDBERG, R. & LUDWIG, H. (1995a) Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 76, 2215.

LUNDGREN, A.L., LINDBERG, R., LUDWIG, H. & GOSZTONYI, G. (1995b) Immunoreactivity of the central nervous system in cats with a Borna disease-like meningoencephalomyelitis (staggering disease). *Acta-Neuropathol-Berl.* 90, 184.

MADIGAN, M.C., SADUN, A.A., RAO, N.S., DUGEL, P.U., TENHULA, W.N. & GILL, P.S. (1996) Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced optic neuropathy in rabbits. *Neurol. Res.* 18, 176.

MALIK, T.H., KOBAYASHI, T., GOSH, M., KISHI, M. & LAI, P.K. (1999) Nuclear localization of the protein from the open reading frame x1 of the Borna disease virus was through interactions with the viral nucleoprotein. *Virology.* 258, 65

MALIPIERO, U., HEUSS, C., SCHLAPBACH, R., TSCHOPP, J., GERBER, U. & FONTANA, A. (1999) Involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor in neuronal cell death induced by cytotoxic T cell-derived secretory granules. *Eur. J. Immunol.* 29, 3053.

MALKINSON, M., WEISMAN, Y., ASHASH, E., BODE, L. & LUDWIG, H. (1993) Borna disease in ostriches. *Vet. Rec.* 133, 304.

MARX, J. (1992) A new link in the brain's defences. *Science* 256, 1278.

MASSA, P.T., SCHIMPL, A., WECKER, E. & TER MEULEN, V. (1987) TNF amplifies measles virus-mediated Ia induction on astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7242.

MATTHEW, M. & LA VAIL, M.M. (1976) Survival of some photoreceptor cells in albino rats following longterm exposure to continuous light. *Invest. Ophtalm. Vis. Sci.* 15, 64.

MAYR, A. & DANNER, K. (1972). In vitro Kultivierung von Borna-Virus über Gehirn-Explantate infizierter Tiere. Zbl. Vet. Med. B 21, 131.

MCCLURE, M.A., THIBAUT, K.J., HATALSKI, C.G. & LIPKIN, W.I. (1992) Sequence similarity between Borna disease virus p40 and a duplicated domain within the paramyxo- and rhabdovirus polymerase proteins. J. Viro. 66, 6572.

MCCOMB, R.D., MILLER, K.A. & LARSON, S.D. (1991) Tissue factor antigens in senile plaques of Alzheimer's disease. Am. J. Pathol. 139, 491.

MCMASTERS, W.R. & WILLIAMS, W.F. (1979) Monoclonal antibodies to Ia antigens from rat thymus: cross reactions with mouse and human and use in purification of rat Ia glycoproteins. Immunol. Rev. 47, 117.

MEILIN, A., SHOHAM, J. & SHARABI, Y. (1992) Analysis of thymic stromal cell subpopulation grown in vitro on extracellular matrix in defined medium. IV. Cytokines secreted by human thymic epithelial cells in culture and their activities on murine thymocytes and bone marrow cells. Immunology 77, 208.

METZLER, A., EHRENSPERGER, F. & WYLER, R. (1978) Natürliche Bornavirus-Infektion beim Kaninchen. Zbl. Vet. Med. B 25, 161.

MOE, K. (1986) The ontogeny of salt preference in rats. Dev. Psychobiol. 19, 185.

MOLENAAR, G.J., BERKENBOSCH, F., VAN DAN, A.M. & LUGARD, C.M.J.E. (1993) Distribution of interleukin-1 β immunoreactivity within the porcine hypothalamus. Brain Res. 608, 169.

MONJAN, A.A., SILVERSTEIN, A.M. & COLE, G.A. (1972) Lymphocytic choriomeningitis virus retinopathy in newborn rats. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 11, 850.

MONJAN, A.A. & HOGAN, R.N. (1979) Virus induced retinal dystrophy in the immunological compromised host. *In: Immunology and immunopathology of the eye*, Masson and Co., New York 370-374.

MONTEIRO, L., ALMEIDA-PINTO, J., ROCHA, N., LOPES, G. & ROCHA, J. (1993) Case report: cyclosporin A-induced neurotoxicity. *Br. J. Radiol.* 66, 271.

MORALES, J.A., HERZOG, S., KOMPTER, C., FRESE, K. & ROTT, R. (1988) Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol.* 177, 51.

MORIMOTO, K., HOOPER, D.C., BORNHORST, A., CORISDEO, S., BETTE, M., FU, Z.F., SCHAFER, M.K., KOPROWSKI, H., WEIHE, E. & DIETZSCHOLD, B. (1996) Intrinsic response to Borna disease virus infection of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13345.

MORRISON, T. & PORTNER, A. (1991) Structure, function and intracellular processing of the glycoproteins of Paramyxoviridae. *In* D.W. Kingsbury (ed.), *The Paramyxoviruses*. Plenum Press, New York, N.Y.

MOSMANN, T.R. & SAD, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more. *Immunol. Today* 17, 138.

NAKAMURA, Y., ASAHII, S., NAKAYA, T., BAHMANI, M.K., SAITOH, S., YASUI, K., MAYAMA, H., HAGIWARA, K., ISHIHARA, C. & IKUTA, K. (1995) Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 34, 188.

NAKAMURA, Y. (1998) Isolation of Borna disease virus from the autopsy brain of a schizophrenia patient. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 73, 287.

NAKAYA, T., NAKAMURA, Y., KISHI, M. & IKUTA, K. (1996) Detection of Borna disease virus RNA by RT-PCR in PBMC. *Tanpakushitsu. Kakusan. Koso.* 41, 700.

NAKAYA, T., KURATSUNE, H., KITANI, T. & IKUTA, K. (1997) Demonstration on Borna disease virus in patients with chronic fatigue syndrome. *Nippon Rinsho*. 55, 3064.

NARAYAN, O., HERZOG, K., FRESE, H., SCHEEFERS, H. & ROTT, R. (1983a) Behavioral disease in rats caused by immunopathological response to persistent borna virus in the brain. *Science* 220, 1401.

NARAYAN, O., HERZOG, K., FRESE, H., SCHEEFERS, H. & ROTT, R. (1983b) Pathogenesis of borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoenkephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J. Infect. Dis.* 148, 305.

NATHAN, C. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051.

NICOLAU, S. & GALLOWAY, I. (1928) Borna disease and enzootic encephalomyelitis of sheep and goats. *Med. Res. Counc. Spec. Report Series No. 121*, London, H.M. Stationery Office 7.

NICOLINI, G., MILOSO, M., ZOIA, C., DI SILVESTRO, A., CAVALETTI, G. & TREDICI, G. (1998) Retinoic acid differentiated SH-SY5Y human neuroblastoma cells: an in vitro model to assess drug neurotoxicity. *Anticancer Res.* 18, 2477.

NITZSCHKE, E. (1963) Untersuchungen über die experimentelle Bornavirus-Infektion bei der Ratte. *Zbl. Vet. Med. B* 10, 470.

NÖSKE (1996) Funktionsmechanismen der zellulären und humoralen Immunantwort bei der experimentellen Bornaschen Krankheit. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

NÖSKE, K., BILZER, T., PLANZ, O. & STITZ, L. (1998) Virus-specific CD4⁺ T cells eliminate borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8⁺ T cells. *J. Virol.* 72, 4387.

OLDSTONE, M.B. (1990) Viruses can cause disease in the absence of morphologic evidence of cell injury: pathology in the absence of cell lysis-implication for pathologists' future study of disease. *Monogr. Pathol.* 32, 123.

OTTA, J. & JENSCH, K.D. (1960). Spontane Infektion mit dem Virus der Bornaschen Krankheit beim Kaninchen. *Mh. Vet. Med.* 15, 127.

PALMER, T.D., TAKAHASHI, J. & GAGE, F.H. (1997) The adult rat hippocampus contains primordial stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 389.

PANNICKE, T., WEICK, M., UCKERMANN, O., WHEELER-SCHILLING, T., FRIES, J.E., REICHEL, M.B., MOHR, C., STAHL, T., FLUESS, M., KACZA, J., SEEGER, J., RICHT, J.A. & REICHENBACH, A. (2001) Electrophysiological alterations and upregulation of ATP receptors in retinal glial Muller cells from rats infected with the Borna disease virus. *Glia* 35(3),213.

PEARCE, B.D., HOBBS, M.V., MCGRAW, T.S. & BUCHMEIER, M.J. (1994) Cytokine induction during T-cell-mediated clearance of mouse hepatitis virus from neurons in vivo. *J. Virol.* 68, 5483.

PLANZ, O. (1993) Bedeutung von CD8+ T-Zellen für die Immunpathogenese der Bornaschen Krankheit. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen.

PLANZ, O., BILZER, T., SOBBE, M. & STITZ, L. (1993) Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J. Exp. Med.* 178, 163.

PLANZ, O., BILZER, T. & STITZ, L. (1995) Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *J. Virol.* 69, 896.

PLANZ, O. & STITZ, L. (1999) Borna disease virus nucleoprotein (p40) is a major target for CD8+-T-cell-mediated immune response. *J. Virol.* 73, 1715.

PLANZ, O., RENTZSCH, C., BATRA, A., WINKLER, T., BUTTNER, M., RZIHA, H.J. & STITZ, L. (1999) Pathogenesis of borna disease virus: granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *J. Virol.* 73, 6251.

PLATA-SALAMAN, C.R., ILYIN, S.E., GAYLE, D., ROMANOVITCH, A. & CARBONE, K.M. (1999) Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of mRNAs for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides. *Brain Research Bull.* 49, 441.

POTTS, R.A., DREHER, B. & BENNETT, M.R. (1982) The loss of ganglion cells in the developing retina of the rat. *Develop. Brain Res.* 3, 481.

PROVIS, J.M., PENFOLD, P.L., EDWARDS, A.J. & VAN DRIEL, D. (1995) Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia* 14, 243.

PROVIS, J.M., DIAZ, C.M. & PENFOLD, P.L. (1996) Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 3, 213.

PYPER, J.M., RICHT, L., BROWN, R., ROTT, R., NARAYAN, O. & CLEMENTS, J.E. (1993) Genomic Organization of the structural proteins of Borna disease virus revealed by a cDNA clone encoding the 38-kD Protein. *Virology* 195, 229.

PYPER, J.M. & GARTNER, A.E. (1997) Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of Borna disease virus. *J. Virol.* 71, 5133.

PYPER, J.M., CLEMENTS, J.E. & ZINK, M.C. (1998) The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J. Virol.* 72, 7697.

RICHT, J. (1988) Bedeutung der zellulären Immunreaktion bei der Pathogenese der Bornaschen Krankheit. *Vet. Med. Diss., Gießen.*

RICHT, J., STITZ, L., WEKERLE, H. & ROTT, R. (1989) Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J. Exp. Med.* 170, 1045.

RICHT, J., STITZ, L., DESCHL, U., FRESE, K. & ROTT, R. (1990) Borna disease virus-induced meningoencephalomyelitis caused by a virus-specific CD4+ T cell mediated immune reaction. *J. Gen. Virol.* 71, 2565.

RICHT, J.A. & STITZ, L. (1992) Borna disease virus infected astrocytes function as antigen-presenting and target cells for virus-specific CD4-bearing lymphocytes. *Arch. Virol.* 124, 95.

RICHT, J.A., PFEUFFER, I., CHRIST, M., FRESE, K., BECHTER, K. & HERZOG, S. (1997) Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 343.

RIVEST, S., TORRES, G. & RIVIER, C. (1992) Differential effects of central and peripheral injection of interleukin-1 β on brain c-fos expression and neuroendocrine functions. *Brain Res.* 587, 13.

ROBERTS, B. (1989) Nuclear location signal-mediated protein transport. *Biochem. Biophys. Acta* 1008, 263.

RODRIQUEZ, M., TRUH. L.I., O'NEILL, B.P. & LENNON V.A. (1988) Autoimmune paraneoplastic cerebellar degeneration: Ultrastructural localization of antibody-binding sites in Purkinje cells. *Neurology* 38, 1380.

ROSSOL-VOTH, R., ROSSOL, S., SCHUTT, K.H. ET AL. (1991) In vivo protective effect of tumor necrosis factor- α against experimental infection with herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* 72, 143.

ROSTWOROWSKI, M., BALASINGAM, V., CHABOT, S., OWENS, T. & YONG, V.W. (1997) Astrogliosis in the neonatal and adult murine brain post-trauma: Elevation of

inflammatory cytokines and the lack of requirement for endogenous interferon- γ . J. Neurosci. 17, 3664.

ROTHWELL, N., ALLAN, S. & TOULMOND, S. (1997) The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. J. Clin. Invest. 100, 2648.

ROTT, R., HERZOG, S., FLEISCHER, B., WINOKUR, A., AMSTERDAM, J., DYSON, W. & KOPROWSKI, H. (1985) Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. Science 228, 755.

ROTT, R. (1987) Zur Pathogenese der Bornaschen Krankheit In : Multiple Sklerose, Klinik und Grundlagenforschung. (Gemeinnützige Hertie-Stiftung, ed.), 229.

ROTT, R., HERZOG, S., BECHTER, K. & FRESE, K. (1991) Borna disease, a possible hazard for man? Arch. Virol. 118, 143.

ROTT, R. & BECHT, H. (1995) Natural and experimental Borna disease in animals. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 190, 17.

RUBIN, S.A., WALTRIP, R.W.,II, BAUTISTA, J.R. & CARBONE, K.M. (1993) Borna disease virus in mice: Host-specific differences in disease expression. J. Virol. 67, 548.

RUBIN, S.A., SIERRA-HONIGMANN, A.M., LEDERMANN, H.M., WALTRIP, R.W.^{2nd}, EIDEN, J.J. & CARBONE, K.M. (1995) Hematologic consequences of borna disease virus infection of rat bone marrow and thymus stromal cells. Blood 85, 2762.

RUBIN, S.A., PARK, S.W., SOLOSKI, M.J. & CARBONE, K.M. (1997) Flow cytometric analysis of major histocompatibility complex (MHC) class II antigen expression on brain cells from Borna disease virus-infected rats without an intervening in vitro culture step. Exp. Neurol. 146, 286.

RUBIN, S.A., YEDNOCK, T.A. & CARBONE, K.M. (1998) In vivo treatment with anti- α 4 integrin suppresses clinical and pathological evidence of Borna disease virus infection. *J. Neuroimmunol.* 84, 158.

RUBIN, S.A., SYLVES, P., VOGEL, M., PLETNIKOV, M., MORAN, T.H., SCHWARTZ, G.J. & CARBONE, K.M. (1999a) Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res. Bull.* 48, 23.

RUBIN, S.A., BAUTISTA, J.R., MORAN, T.H., SCHWARTZ, G.J. & CARBONE, K.M. (1999b) Viral teratogenesis: brain developmental damage associated with maturation state at time of infection. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 112, 237.

SANCHEZ-MADRID, F., SZKLUT, P. & SPRINGER, T.A. (1983) Stable hamster-mouse hybridomas producing IgG and IgM hamster monoclonal antibodies of defined specificity. *J. Immunol.* 130, 309.

SASAKI, S. & LUDWIG, H. (1993) In Borna disease virus infected rabbit neurons 100 nm particle structures accumulate at areas of Joest-Degen inclusion bodies. *Zentralbl. Veterinärmed.* 40, 4; 291.

SAUDER, C., MULLER, A., CUBITT, B., MAYER, J., STEINMETZ, J., TRABERT, W., ZIEGLER, B., WANKE, K., MUELLER-LANTZSCH, N., DE LA TORRE, J.C. & GRASSER, F.A. (1996) Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J. Virol.* 70, 7713.

SAUDER, C. & DE LA TORRE, J.C. (1999) Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J. Neuroimmunol.* 96, 29.

SAWADA, M., KONDO, N., SUZUMURA, A. & MARUNOUCHI, T. (1989) Production of tumor necrosis factor- α by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res.* 491, 394.

SCHÄDLER, R., DIRINGER, H. & LUDWIG, H. (1985) Isolation and characterization of a 14500 molecular weight protein from brains and tissue cultures persistently infected with Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 66, 2579.

SCHIJNS, V.E.C.J., VAN DER NEUT, R., HAAGMANS, B.L. ET AL. (1991) Tumor necrosis factor- α , interferon- γ and interferon- β exert antiviral activity in nervous tissue cells. *J. Gen. Virol.* 72, 809.

SCHILKEN, D. (1990) Untersuchung zur Toleranz und Resistenz bei der Borna'schen Krankheit. *Rer. Nat. Diss.*, Gießen.

SCHMIDT, J. (1912) Untersuchungen über das klinische Verhalten der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung des Pferdes, nebst Angaben über diesbezügliche therapeutische Versuche. *Berl. Tierärztl. Wschr.* 28, 581-586, 597-603.

SCHNEEMANN, A., SCHNEIDER, P.A., KIM, S. & LIPKIN, W.I. (1994) Identification of signal sequences that control transcription of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* 68, 10; 6514.

SCHNEIDER, P.A., BRIESE, T., ZIMMERMANN, W., LUDWIG, H. & LIPKIN, W.I. (1994a) Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J. Virol.* 68, 63.

SCHNEIDER, P.A., SCHNEEMANN, A. & LIPKIN, W.I. (1994b) RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* 68, 8; 5007.

SCHNEIDER, P.A., HATALSKI, C.G., LEWIS, A.J. & LIPKIN, W.I. (1997a) Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J. Virol.* 71, 331.

SCHNEIDER, P.A., KIM, R. & LIPKIN, W.I. (1997b) Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation. *J. Virol.* 71, 5614.

SCHNEIDER, P.A., SCHWEMMLE, M. & LIPKIN W.I. (1997c) Implication of a cis-acting element in the cytoplasmic accumulation of unspliced Borna disease virus RNAs. *J. Virol.* 71, 8940.

SCHNEIDER-SCHAULIES; J., SCHNEIDER-SCHAULIES, S. & TER MEULEN, V. (1993) Differential induction of cytokines by primary and persistent measles virus infections in human glial cells. *Virology* 195, 219.

SCHÖBITZ, B., DE KLOET, E.R., SUTANTO, W. & HOLSBOER, F. (1993) Cellular localization of interleukin-6 mRNA and interleukin-6 receptor mRNA in rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 5, 1426.

SCHREIBER, L., ESHEL, I., MEILIN, A., SHARABI, Y. & SHOLAM, J. (1991) Analysis of thymic stromal cell subpopulations grown in vitro on extracellular matrix in defined medium. III. Growth conditions of human thymic epithelial cells and immunomodulatory activities in their culture supernatant. *Immunology* 74, 621.

SCHWEMMLE, M., DE, B., SHI, L., BANERJEE, A. & LIPKIN, W.I. (1997) Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 272, 21818.

SCHWEMMLE, M., SALVATORE, M., SHI, L., RICHT, J., LEE, CH. & LIPKIN, W.I. (1998) Interactions of the Borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J. Biol. Chem.* 273, 9007.

SCHWEMMLE, M., JEHLE, C., SHOEMAKER, T. & LIPKIN, W.I. (1999) Characterization of the major nuclear localization signal of the Borna disease virus phosphoprotein. *J. Gen. Virol.* 80, 97.

SCHWERDTFEGER, U. (1994). Zur Bedeutung der Mikroglia und des Monozyten-Makrophagen-Systems bei der experimentellen Borna-Enzephalitis der Ratte. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

SEABROOK, T.J., JOHNSTON, M. & HAY, J.B. (1998) Cerebral spinal fluid lymphocytes are part of the normal recirculating lymphocyte pool. *J. Neuroimmunol.* 91, 100.

SEI, Y., VITKOVIC, L. & YOKOYAMA, M.M. (1995) Cytokines in the central nervous system: regulatory roles in neuronal function, cell death and repair. *Neuroimmunomodulation* 2, 121.

SEIFERLE, E. (1982). Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen In: NICKEL, R., SCHUMMER, A., SEIFERLE, E. (eds.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 4, Paul Parey Verlag, Hamburg.

SEILHEAN, D., KOBAYASHI, K., HE, Y., UCHIHARA, T., ROSENBLUM, O., KATLAMA, C., BRICAIRE, F., DUYCKAERTS, C. & HAUW, J.J. (1997) Tumor necrosis factor- α , microglia and astrocytes in AIDS dementia complex. *Acta Neuropathol. Berl.* 93, 508.

SEITZ, R., WEISSE, H. STÖTZER (1977) Altersbedingte und lichtabhängige Netzhautveränderungen. *Klin. Mbl. Augenheilk.* 171, 432.

SELMAJ, K.W. & RAINE, C.S. (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann. Neurol.* 23, 339.

SELMAJ, K.W., FAROOQ, M., NORTON, W.T., RAINE, C.S. & BROSANAN, C.F. (1990) Proliferation of astrocytes in vitro in response to cytokines: a primary role for tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 144, 129.

SHANKAR, V., KAO, M., HAMIR, A.M., SHENG, H., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1992) Kinetics of virus spread and changes in levels of several

cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *J. Virol.* 66, 992.

SHAW, G. & WEBER, K (1983) The structure and development of the rat retina: an immunofluorescence microscopical study using antibodies specific for intermediate filament proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 30, 219.

SHI, B., RAINA, J., LORENZO, A., BUSCIGLIO, J. & GABUZDA, D (1998) Neuronal apoptosis induced by HIV-1 Tat protein and TNF- α : potentiation of neurotoxicity mediated by oxidative stress and implications for HIV-1 dementia. *J. Neurovirol.* 4, 281.

SHIBUKI, H., KATAI, N., KUROIWA, S., KUROKAWA, T., YODOI, Y. & YOSHIMURA, N. (1998) Protective effect of adult T-cell leukemia-derived factor on retinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1470.

SHOYA, Y., KOBAYASHI, T., KODA, T., IKUTA, K., KAKINUMA, M. & KISHI, M. (1998) Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein. *J. Virol.* 72, 9755.

SIERRA-HONIGMANN, A.M., RUBIN, S.A., ESTAFANOUS, M.G., YOLKEN, R.H. & CARBONE, K.M. (1993) Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J. Neuroimmunol.* 45, 31.

SIMMONS, D., MAKGOBA, M.W. & SEED, B. (1988) ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 331, 624.

SMEYNE, R.J., VENDRELL, M., HAYWARD, M., BAKER, S.J., MIAO, G.G., SCHILLING, K., ROBERTSON, L.M., CURRAN, T. & MORGAN, J.I. (1993) Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature (London)* 363, 166.

SMITH, E.M. (1992) Hormonal activities of cytokines. *Chem. Immunol.* 52, 154.

SOBBE, M. (1996) Zur Pathogenese der Bornaschen Krankheit: Funktion von T-Lymphozyten und Virustropismus. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

SOBBE, M., BILZER, T., GOMMEL, S., NÖSKE, K., PLANZ, O. & STITZ, L. (1997) Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8⁺ T cells and perforin mRNA. *J. Virol.* 71, 2400.

SOUTHERN, P. & OLDSTONE, M.B.A. (1993) Medical consequences of persistent viral infection. *New Engl. J. Med.* 314, 359.

SPRANKEL, H., RICHARZ, K., LUDWIG, H. & ROTT, R. (1978) Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*) induced by Borna disease virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 165, 1.

SPRINGER, T.A. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425.

SPROCKHOFF, H.V. (1954) Untersuchungen über die Komplementbindungsreaktion bei der Bornaschen Krankheit. *Zbl. Vet. Med.* 1, 494.

STAHL, T., MOHR, C., KACZA, J., REIMERS, C., PANNICKE, T., SAUDER, C., REICHENBACH, A. & SEEGER, J. (2003) Characterization of the acute immune response in the retina of Borna disease virus infected Lewis rats. *J Neuroimmunol.* 137(1-2), 67.

STELL, W.K. (1972) The morphological organisation of the vertebrate retina. *In: FURTES, M.G.F. (ed.): Handbook of sensory physiology* 7, 112, Springer Verlag Berlin.

STITZ, L., KREY, H. & LUDWIG, H. (1980) Borna disease in rhesus monkeys as a model for uveo-cerebral symptoms. *J. Med. Virol.* 6, 333.

STITZ, L., SOEDER, D., DESCHL. U., FRESE, K. & ROTT, R. (1989) Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus infected rats by Cyclosporine A. *J. Immunol.* 143, 4250.

STITZ, L. (1991). Immunintervention bei der Borna-Krankheit. *Tierarztl. Prax.* 19, 509.

STITZ, L., SCHILKEN, D. & FRESE, K. (1991a) Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats. *J. Virol.* 65, 457.

STITZ, L., PLANZ, O., BILZER, T., FREI, K. & FONTANA, A. (1991b) Transforming growth factor- β modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus. Pathogenic importance of CD8⁺ cells and suppression of antibody formation. *J. Immunol.* 147, 3581.

STITZ, L. (1992) Induction of antigen-specific tolerance by cyclosporine A. *Eur. J. Immunol.* 22, 1995.

STITZ, L., SOBBE, M. & BILZER, T. (1992) Preventive effects of early anti-CD4 or anti-CD8 treatment on Borna disease in rats. *J. Virol.* 66, 3316.

STITZ, L., BILZER, T., RICHT, J.A. & ROTT, R. (1993) Pathogenesis of Borna disease. *Arch. Virol. Suppl.* 7, 135.

STITZ, L., DIETZSCHOLD, B. & CARBONE, K.M. (1995) Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190, 75.

STITZ, L., NÖSKE, K., PLANZ, O., FURRER, E., LIPKIN, W.I. & BILZER, T. (1998) A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J. Virol.* 72, 8884.

STOYLOFF, R., STRECKER, A., BODE, L., FRANKE, P., LUDWIG, H. & HUCHO, F. (1997) The glycosylated matrix protein of Borna disease virus is a tetrameric membrane-bound viral component essential for infection. *Eur. J. Biochem.* 246, 252.

STOYLOFF, R., BODE, L., BORCHERS, K. & LUDWIG, H. (1998) Neutralization of borna disease virus depends upon terminal carbohydrate residues (α -D-man, β -D-GlcNAc) of glycoproteins gp17 and gp94. *Intervirology* 41, 135.

SUN, D., COLECLOUGH, C., CAO, L., HU, X., SUN, S. & WHITAKER, J.N. (1998) Reciprocal stimulation between TNF- α and nitric oxide may exacerbate CNS inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 89, 122.

TAKAHASHI, H., NAKAYA, T., NAKAMURA, Y., ASAH, S., ONISHI, Y., IKEBUCHI, K., TAKAHASHI, T.A., KATOH, T., SEKIGUCHI, S., TAKAZAWA, M., TANAKA, H. & IKUTA, K. (1997) Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms. *J. Med. Virol.* 52, 330.

TAUBOLL, E., GERDTS, R. & GJERSTAD, L. (1998) Cyclosporin A and brain excitability studied in vitro. *Epilepsia* 39, 687.

TCHELINGERIAN, J.L., QUINONERO, J., BOOSS, J. & JACQUE, C. (1993) Localization of TNF- α and Il-1 α immunoreactivities in striatal neurons after surgical injury to the hippocampus. *Neuron* 10, 213.

TCHELINGERIAN, J.L., VIGNAIS, L. & JACQUE, C. (1994) TNF- α gene expression is induced in neurones after a hippocampal lesion. *NeuroReport* 5, 585.

TEZCAN, H., ZIMMER, W., FENSTERMAKER, R., HERZIG, G.P. & SCHRIBER, J. (1998) Severe cerebellar swelling and thrombotic thrombocytopenic purpura associated with FK506. *Bone Marrow Transplant.* 21, 105.

THIEDEMANN, N., PRESEK, P., ROTT, R. & STITZ, L. (1992) Antigenic relationship and further characterization of two major Borna disease virus-specific proteins. *J. Gen. Virol.* 73, 1057.

THIERER, J., RIEHLE, H., GREBENSTEIN, O., BINZ, T., HERZOG, S., THIEDEMANN, N., STITZ, L., ROTT, R., LOTTSPEICH, F. & NIEMANN, H. (1992) The 24k protein of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 73, 413.

TILGNER, S. (1966). *Die Anatomie des Auges der Ratte und seiner Adnexe.* Habilitationsschrift, Halle.

TORDO, N., DEHAAN, P., GOLDBACH, R. & POCH, O. (1992) Evolution of negative-stranded RNA genomes. *Semin. Virol.* 3, 341.

TOWNSEND, R.M., GILBERT, M.J. & KORNGOLD, R. (1998) Combination therapy with a CD4-CDR3 peptide analog and cyclosporin A to prevent graft-vs-host disease in a MHC-haploidentical bone marrow transplantation model. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86, 115.

VANDEWOUDE, S., RICHT, J.A., ZINK, M.C., ROTT, R., NARAYAN, O. & CLEMENTS, J.E. (1990) A Borna virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioral disease. *Science* 250, 1278.

VANGURI, P. & FARBER, J.M. (1994) IFN and virus-inducible expression of an immediate early gene, *crg-2/IP-10*, and a delayed gene, *I-A alpha* in astrocytes and microglia. *J. Immunol.* 152, 1411

VAUX, D.L. (1993) Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 786.

VILLARROYA, H., MARIE, Y., OALLET, J.C., LE SAUX, F., TCHELINGERIAN, J.L. & BAUMANN, N. (1997) Expression of TNF α in central neurons of Lewis rat spinal cord after EAE induction. *J. Neurosci. Res.* 49, 592.

VILLEGAS, G.M. (1960) Electron microscopic study of the vertebrate retina. *J. Gen. Physiol.* 43, 15.

WAGNER, R.R. (1987) Rhabdovirus biology and infection: an overview, p. 25-28. *In:* W.W. Wagner (ed.), *The Rhabdoviruses*. Plenum Press, New York, N.Y.

WALDMANN, H. (1989) Manipulation of T-cell response with monoclonal antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 407.

WALLS, G.L. (1934) The visual cells of the white rat. *J. Comp. Psychol.* 18, 363.

WALTRIP, R.W. 2nd, BUCHANAN, R.W., CARPENTER, W.T. Jr., KIRKPATRICK, B., SUMMERFELT, A., BREIER, A., RUBIN, S.A. & CARBONE, K.M. (1997) Borna disease virus antibodies and the deficit syndrome of schizophrenia. *Schizophr. Res.* 23, 253.

WEBB, S.R. & SPRENT, J. (1990) Tolerogenicity of thymic epithelium. *Eur. J. Immunol.* 20, 2525.

WEHNER, T., RUPPERT, A., HERDEN, C., FRESE, K., BECHT, H. & RICHT, J.A. (1997) Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J. Gen. Virol.* 78, 2459.

WEISSE, I., STÖTZER, H., SEITZ, R. (1974) Age- and lightdependent changes in the rat eye. *Virchows Arch. A. Path. Anat. U. Histol.* 362, 145.

WEISSENBÖCK, H., NOWOTNY, N., CAPLAZI, P., KOLODZIEJEK, J. & EHRENSPERGER, F. (1998) Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2127.

WEISSENBÖCK, H., HORNIG, M., HICKEY, W.F. & LIPKIN, W.I. (2000) Microglial activation and neuronal apoptosis in bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathology* 10, 260.

WEKERLE, H., LININGTON, C., LASSMANN, H. & MEYERMANN, R. (1986) Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci.* 9, 271.

WESSENLINGH, S.L., LEVINE, B., FOX, R.J., CHOI, S. & GRIFFIN, D.E. (1994) Intracerebral cytokine mRNA expression during fatal and nonfatal alphavirus encephalitis suggests a predominant type 2 T cell response. *J. Immunol.* 152, 1289.

WIETZERBIN, J., GAUDELET, C., CATINOT, L. ET AL. (1990) Synergistic effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on antiviral activity and (2'-5') oligo (A) synthetase induction in myelomonocytic cell line. *J. Leukoc. Biol.* 48, 149.

WINKLER (1883). Über die Ursachen der subakuten Gehirnentzündung. *Arch. Wiss. Prakt. Tierhk.* 9, 419.

WITTE, J. & SCHAAF (1934) Prüfung der Widerstandsfähigkeit des Virus der Bornaschen Krankheit und der Hühnerpocken gegen chemische Desinfektionsmittel, insbesondere gegen Trosilin. *Zschr. Inf. Krankh. Haust.* 45, 265.

WÖRZ (1858) zit. nach HEINIG 1969

WORMSER, U., WEISMAN, Y., ASHASH, E. & NYSKA, A. (1996) In vitro cytotoxicity of sera of paralysed ostriches showing serological positivity for Borna disease virus. *Vet. Rec.* 138, 418.

WUCHERPFENNIG, K.W. (1994) Autoimmunity in the central nervous system: Mechanisms of antigen presentation and recognition. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 72, 293.

YAGITA, Y., KITAGAWA, K., MATSUSHITA, K., TAGUCHI, A., MABUCHI, T., OHTSUKI, T., YANAGIHARA, T. & MATSUMOTO, M (1996) Effect of immunosuppressant FK506 on ischemia-induced degeneration of hippocampal neurons in gerbils. *Life Sci.* 59, 1643.

YAMABE, T., DHIR, G., COWAN, E.P. ET AL. (1994) Cytokine gene expression in measles-infected adult human glial cells. *J. Neuroimmunol.* 49, 171.

YANG, P., DE VOS, A.F. & KIJLSTRA, A (1996) Macrophages in the retina of normal Lewis rats and their dynamics after injection of lipopolysaccharide. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 77.

YONG, V.W. (1996) Cytokines, astrogliosis and neurotropism following CNS trauma. *In: Ransohoff, R.M.; Benveniste, E.N., eds. Cytokines and the CNS. Boca Raton: CRC Press* 309.

YOSHIOKA, M., BRADLEY, W.G., SHAPSHAK, P., NAGANO, I., STEWART, R.V., XIN, K.Q., SRIVASTAVA, A.K. & NAKAMURA, S. (1995) Role of immune activation and cytokine expression in HIV-1-associated neurologic diseases. *Adv. Neuroimmunol.* 5, 335.

ZHANG, J., WU, G.S., ISHIMOTO, S., PARARAJASEGARAM, G. & RAO, N.A. (1997) Expression of major histocompatibility complex molecules in rodent retina. Immunohistochemical study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1848.

ZHENG, Y.M., SCHÄFER, M.K.-H, WEIHE, E., SHENG, H., CORISDEO, S., FU, Z.F., KOPROWSKI, H. & DIETZSCHOLD, B. (1993) Severity of neurological signs and degree of inflammatory lesions in the brain of rats with Borna disease correlate with the induction of nitric oxide synthase. *J. Viro.* 67, 5786.

ZIMMERMANN, W., BRETER, H., RUDOLPH, M. & LUDWIG, H. (1994) Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *J. Virol.* 68, 10; 6755.

ZWICK, W. & SEIFRIED, O. (1925). Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirnrückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). *Berl. Tierärztl. Wschr.* 41, 129.

ZWICK, W., SEIFRIED, O. & WITTE, J. (1927) Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). Zschr. Inf. Krankh. Haust. 30, 42.

ZWICK, W. (1939). Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. *In*: Gildemeister, E., Haagen, E. und Waldmann, O. (Hrsg.): Handbuch der Viruskrankheiten, Gustav Fischer Verlag, Jena, 252.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Notker Horst Peter Schmitz-Schachner
Geb. am 17.01.1969
verheiratet

Vater: Franz Günther Schmitz

Mutter: Margret Schmitz

Geschwister: Dr. Simone Schmitz-Spanke
Dr. Christof Schmitz

Schulen:

1975 - 1979 Grundschule Don-Bosco, Neuss

1979 -1988 Quirinus-Gymnasium, Neuss

1988 Grundwehrdienst; Rückstellung f. d. Studium

Studium:

1988 – 1994 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Oktober 1989 Vorphysikum

März 1991 Physikum

Mai 1994 Staatsexamen Zahnmedizin

Juni 1994 Approbation

Beruflicher Werdegang:

August 1994 – Dezember 1994 Ausbildungsassistentenarzt
Praxis ZA Peter Lüttgen, Neuss-Holzheim

Januar 1995 – Dezember 1996 Ausbildungsassistentenarzt
Praxis Dr. Michael Tegtmeier, Neuss

Januar 1997 – Februar 2001 Angestellter Zahnarzt
Praxis Dr. Gerd Mayerhöfer, Düsseldorf

seit März 2001 Selbständig

Neuss, den 08.04.2004

„Zur Pathogenese der Borna-Krankheit: Retinopathien bei immunkompetenten und immuninkompetenten BDV-infizierten Ratten“ vorgelegt von Notker Schmitz-Schachner

Das Borna Virus (Borna Disease Virus, BDV) ist ein neu klassifiziertes neurotropes RNA-Einzelstrangvirus, das bei Säugetieren - und wahrscheinlich auch beim Menschen - persistierende Infektionen des Zentralnervensystems (ZNS) einschließlich der Retina verursacht. Die Infektion kann unterschiedliche neurologische Krankheiten auslösen, die durch Lern-, Gedächtnis- und Bewegungsstörungen, Verhaltensänderungen, psychiatrische Krankheiten, Lähmungen, Demenz und Blindheit gekennzeichnet sein können. Uneinheitlichkeit und Komplexität der Borna-Krankheit (BD) scheinen überwiegend von der Immunantwort des Wirts abzuhängen, da das BDV selbst sich durch bemerkenswerte genomische Stabilität auszeichnet. Die am längsten bekannten natürlichen Wirte des BDV sind Pferd und Schaf, bei denen es schwere Polioenzephalomyelitiden verursacht. Das am weitesten verbreitete experimentelle Modell ist die BD der Ratte, bei der es zu einem biphasischen Krankheitsverlauf kommt: Innerhalb von zwei Wochen nach intracerebraler oder intranasaler Infektion entwickelt sich eine akute lymphozytäre Polioenzephalitis, bei der CD8+ T-Zellen vor allem durch die Zerstörung BDV-infizierter Neurone und Gliazellen eine entscheidende Rolle spielen. Über den Tractus opticus breitet sich das BDV in die Retina aus, wo es zu schweren entzündlichen Reaktionen und erheblichen Verlusten von retinalem Gewebe kommt. Etwa sechs Wochen nach Infektion geht die akute Phase der BD in einen chronisch-degenerativen Verlauf über, wobei entzündliche Reaktionen stark abgeschwächt sind oder ganz fehlen. Drei bis sechs Monate nach Infektion besteht eine ausgeprägte Gehirn- und Retinaatrophie. Bei immunkompromittierten Ratten führt die Infektion dagegen nicht zur akuten klinischen Erkrankung. Es finden sich kaum entzündliche Reaktionen, dennoch zeigen auch diese Tiere nach Verlauf von sechs bis neun Monaten erhebliche Substanzverluste des ZNS. Die Pathogenese dieser nicht-entzündlichen neurodegenerativen Veränderungen ist bisher nicht geklärt.

Um weitere Informationen über die Pathogenese entzündlicher und nicht-entzündlicher neurodegenerativer Veränderungen bei der BD zu erhalten, wurde die Retina BDV-infizierter Ratten mit unterschiedlichem Immunstatus und unterschiedlichen Krankheitsverläufen zu verschiedenen Zeiten nach Infektion untersucht. Dabei wurden Entzündungszellen, Immunmoleküle und die zelluläre Expression von MHC-Klasse I und II-Antigen immunhistologisch charakterisiert.

Die Retinitis der immunkompetenten Ratten war durch perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate hauptsächlich in der Ganglienzellschicht gekennzeichnet. Die entzündlichen Reaktionen wurden durch CD4+ und CD8+ T-Zellen dominiert, darüberhinaus waren Zellen des Mikroglia-/Makrophagensystems beteiligt, jedoch kaum Plasmazellen. Die entscheidende Rolle von MHC-Klasse I restringierten zytotoxischen CD8+ T-Zellen konnte durch Behandlung BDV-infizierter Tiere mit verschiedenen Anti T-Zell-Antikörpern bestätigt werden. Die Expression von MHC-Antigen war nicht auf Entzündungszellen beschränkt, besonders MHC-Klasse I Antigen fand sich auch auf Retinazellen. Tumornekrosefaktor wurde im Bereich der entzündlichen Infiltrate, darüberhinaus jedoch auch an ortständigen Zellen nachgewiesen. Ähnlich dem Gehirn führten die immunpathologischen Prozesse zu einer nahezu völligen Destruktion der Retina.

Im Gegensatz dazu waren bei neugeborenen infizierten oder durch Behandlung mit Cyclosporin A oder Cyclophosphamid immunsupprimierten Ratten fast keine zellulären entzündlichen Reaktionen in der Retina nachweisbar. Nach über einjährigem Beobachtungszeitraum war jedoch auch hier eine weitgehende Degeneration der Retina festzustellen. Während des gesamten Untersuchungszeitraums waren in der Retina der immunkompromittierten Tiere vermehrt Zellen des Mikroglia-/Makrophagensystems, die Expression von MHC-Klasse I Antigen auf BDV-infizierten ortständigen Zellen, insbesondere Neuronen, und die Expression von Tumornekrosefaktor nachweisbar. Die Aktivierung des Mikroglia/Makrophagen-Systems ist hierbei sowohl als Effektor, aber auch als Folge degenerativer Veränderungen denkbar.

Es ist zu vermuten, daß bei der BDV-induzierten Retinopathie der Ratte neben "klassischen" immunpathologischen Mechanismen wie der Reaktion zytotoxischer T Zellen oder der Wirkung von TNF andere neurotoxische Mediatoren existieren, die zur Zerstörung der Retina beitragen. Bei immuninkompetenten Tieren erzeugt das BDV zumindest indirekt neurodegenerative Prozesse in Abwesenheit klassischer Entzündungsprozesse.