

Aus dem
Institut für Anatomie und Zellbiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

Die Rolle des Neuropeptids Adrenomedullin im Rabiesvirus-infizierten Maushirn

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Judith Kaden
geb. in Nastätten

Marburg, 2023

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
26.09.2023.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Ralf Kinscherf

Korreferentin: Prof. Dr. Andrea Maisner

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	- 6 -
2	Abbildungsverzeichnis	- 8 -
3	Tabellenverzeichnis	- 9 -
4	Einleitung	- 10 -
4.1	Tollwut	- 10 -
4.1.1	Epidemiologie und Historisches	- 10 -
4.1.2	Krankheitsverlauf	- 10 -
4.1.3	Therapie und Prophylaxe	- 11 -
4.2	Das Rabiesvirus	- 12 -
4.2.1	Taxonomie und Aufbau	- 12 -
4.2.2	Infektionszyklus	- 12 -
4.3	Immunevasive Strategien des Rabiesvirus	- 13 -
4.3.1	Beeinträchtigung der Immunabwehr	- 13 -
4.3.2	Modulation der Blut-Hirn-Schranke	- 14 -
4.4	Die Rolle von Neuropeptiden bei zerebralen Virusinfektionen	- 18 -
4.5	Adrenomedullin	- 19 -
4.5.1	Struktur, Synthese und Sekretion von Adrenomedullin	- 19 -
4.5.2	Wirkungsweise von Adrenomedullin	- 20 -
4.5.3	Effekte von Adrenomedullin	- 21 -
5	Fragestellung	- 25 -
6	Methoden und Material	- 26 -
6.1	Viren, Versuchstiere und <i>in vivo</i> -Experimente	- 26 -
6.1.1	Virusstämme	- 26 -
6.1.2	Versuchstiere, Infektion und Versuchstiereingruppierung	- 26 -
6.1.3	Gewebebegewinnung und -fixierung	- 28 -
6.2	Molekularbiologische Methoden	- 29 -
6.2.1	RNA-Isolierung aus Maushirnen	- 29 -
6.2.2	Konzentrationsbestimmung der RNA am Nanodrop	- 29 -
6.2.3	Qualitätsüberprüfung der RNA am Bioanalyzer	- 30 -
6.2.4	Absolute Quantifizierung von Virusgenomäquivalenten	- 30 -
6.2.4.1	Primer-Design für die Amplifikation viraler Genome	- 30 -
6.2.4.2	Reverse Transkription	- 31 -
6.2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion	- 31 -
6.2.4.4	PCR-Aufreinigung	- 32 -
6.2.4.5	Gelelektrophorese	- 32 -
6.2.4.6	Methodik der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	- 33 -
6.2.4.7	Erstellung einer Virusgenom-Standardkurve	- 33 -
6.2.4.8	Quantifizierung der Proben mittels Standardkurve	- 34 -
6.2.4.9	Auswertung der absoluten Quantifizierung der Virusgenome	- 35 -

6.2.5	Relative Quantifizierung von Zielgenen	- 36 -
6.2.5.1	Housekeeping-Gene-Assay	- 36 -
6.2.5.2	Primer-Effizienzbestimmung	- 36 -
6.2.5.3	Quantifizierung der Zieltranskripte mittels qPCR	- 38 -
6.2.5.4	Auswertung der relativen Quantifizierung der Zieltranskripte	- 38 -
6.2.5.5	Korrelationsanalyse der relativ quantifizierten Zieltranskripte (<i>Adm</i> , <i>Ramp2</i> und <i>Ramp3</i>) mit <i>Cldn5</i> bzw. Virusgenomäquivalenten	- 39 -
6.3	Histologische und immunhistochemische Methoden	- 39 -
6.3.1	Silanisierung der Objektträger	- 39 -
6.3.2	Gewebeschnitte	- 39 -
6.3.3	Auswahl relevanter Bereiche im Maushirn	- 40 -
6.3.4	Übersichtsfärbung zur Fotolokalisierung	- 42 -
6.3.5	Immunhistochemische DAB/Nickel-Färbung	- 42 -
6.3.6	Immunfluoreszenzfärbung gegen zwei Antigene	- 46 -
6.3.7	Tyramid-Verstärkung	- 47 -
6.3.8	Proteinase K-Verdau	- 48 -
6.3.9	Auswertung der IHC und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen	- 48 -
6.4	Materialien	- 50 -
7	Ergebnisse	- 55 -
7.1	Expression von <i>Adm</i> und seinen Rezeptorkomponenten im Maushirn nach i. m. DOG4-Inokulation	- 55 -
7.2	Regionale Differenzierung der Viruslast im Maushirn im Verlauf der DOG4-Infektion	- 57 -
7.3	Korrelation der Expression von <i>Adm</i> , <i>Ramp2</i> und <i>Ramp3</i> mit der Viruslast im Maushirn nach i. m. DOG4-Inokulation	- 58 -
7.4	Das Adrenomedullin-System im Kleinhirn der RABV-infizierten Maus	- 62 -
7.4.1	Zelluläre Quellen von Adrenomedullin im Kleinhirn	- 62 -
7.4.2	Einfluss der RABV-Infektion auf die ADM-Proteinexpression im Kleinhirn	- 65 -
7.4.3	Einfluss der RABV-Infektion auf die RAMP2-Expression im Kleinhirn	- 68 -
7.5	Regulation der Blut-Hirn-Schranke im Kleinhirn im Rahmen der RABV-Infektion	- 72 -
7.5.1	Transzellulärer Transport: Endothelzell-Aktivierung	- 72 -
7.5.2	Parazellulärer Transport: Claudin 5	- 78 -
7.5.3	Immunzellpassage über die Blut-Hirn-Schranke	- 83 -
7.5.4	Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke: Intra- und extravasales Albumin	- 87 -
8	Diskussion	- 93 -
8.1	Regulation des Neuropeptids Adrenomedullin im RABV-infizierten Hirn	- 93 -
8.2	Regulation des transzellulären Passagewegs der Blut-Hirn-Schranke über Endothelzellaktivierung durch das ADM/RAMP2-System im RABV-infizierten Kleinhirn	- 95 -
8.3	Regulation der parazellulären Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke über Claudin 5 durch das ADM/RAMP2-System im RABV-infizierten Kleinhirn	- 97 -

8.4	Immunzelldiapedese über die Blut-Hirn-Schranke im RABV-infizierten Kleinhirn ...	- 100 -
8.5	Übertritt von löslichen Stoffen über die Blut-Hirn-Schranke.....	- 102 -
8.6	Die besondere Rolle des Kleinhirns im RABV-infizierten Hirn	- 103 -
8.7	Ausblick	- 105 -
9	Zusammenfassung.....	- 108 -
10	Summary	- 110 -
11	Literaturverzeichnis	- 112 -
12	Anhang	- 120 -
12.1	Macros	- 120 -
12.1.1	Anzahl immunreaktiver ADM-Signale	- 120 -
12.1.2	Immunreaktive Fläche von ADM	- 120 -
12.1.3	Immunreaktive Fläche von RAMP2.....	- 121 -
12.1.4	Anzahl immunreaktiver RAMP2-Signale	- 122 -
12.1.5	Intravasales Albumin in der Kleinhirnrinde.....	- 123 -
12.1.6	Intravasales Albumin in Kleinhirnrinde und -kernen.....	- 124 -
12.1.7	ICAM1-Fläche in der Kleinhirnrinde: Schema 1	- 124 -
12.1.8	ICAM1-Fläche in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 1	- 125 -
12.1.9	ICAM1-Fläche in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 2.....	- 125 -
12.1.10	RNP in der Kleinhirnrinde: Schema 1	- 125 -
12.1.11	RNP in der Kleinhirnrinde: Schema 2	- 126 -
12.1.12	RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 1	- 126 -
12.1.13	RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 2	- 127 -
12.1.14	RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 3	- 127 -
12.1.15	RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 4	- 127 -
12.2	Workflow der Signal-Quantifizierung von RABV RNP und ICAM1.....	- 128 -
12.3	Workflow der Signal-Quantifizierung von intra- und extravasalem Albumin	- 128 -
12.4	Workflow Claudin 5-Auswertung	- 129 -
12.5	Curriculum vitae.....	- 130 -
12.6	Liste akademischer LehrerInnen	- 131 -
12.7	Danksagung.....	- 131 -
12.8	Eidesstattliche Erklärung	- 132 -

1 Abkürzungsverzeichnis

Actb	Actin-beta
Adm, ADM	Adrenomedullin
AJ	Adherens Junctions
AK	Antikörper
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
Cb	Cerebellum (lat.): Kleinhirn
CbCtx	Cortex cerebelli (lat.): Kleinhirnrinde
CbNcll	Nuclei cerebelli (lat.): Kleinhirnkerne
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid (engl.): komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cgrp, CGRP	Calcitonin gene-related peptide (engl.):
Cldn5, CLDN5	Claudin 5
COVID-19	Corona virus disease 2019 (engl.): Coronavirus-Krankheit-2019
Crlr, CRLR	Calcitonin receptor-like receptor
Ct	Threshold cycle (engl.): Schwellenwertzyklus
Ctx	Cortex (lat.): Hirnrinde
Cxcl10, CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritic cells (engl.): Dendritische Zellen
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DF	Doppelimmunfluoreszenz
DNA	Desoxyribonucleic acid (engl.): Desoxyribonukleinsäure
De/Te (ohne Ctx)	Diencephalon/Telecephalon ohne Cortex
do	Donkey (engl.): Esel
d. p. i.	Dies post infectionem (lat.): Tag(e) nach Inokulation
EC	Endothelial cells (engl.): Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FFU	Focus-forming unit(s) (engl.): Anzahl an Erregern, die zuverlässig eine Infektion von Zellen auslöst
F3	Challenge Virus Standard F3, CVS-F3
Gapdh	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gfap, GFAP	Gliial fibrillary acidic protein (engl.): saures Gliafaserprotein
gp	Guinea pig (engl.): Meerschweinchen
gt	Goat (engl.): Ziege
hu	Human (engl.): Mensch
Icam1, ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (engl.): Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
lfn, IFN	Interferon
IHC	Immunhistochemie/ immunhistochemisch
IL	Interleukin
i. m.	intramuskulär
i. n.	intranasal
Int	Intermediäres Kerngebiet
IR	Immunreaktivität
kb	Kilobasen(paare)
Lat	Laterales Kerngebiet
Med	Mediales Kerngebiet
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mo	Monkey (engl.): Affe
mRNA	Messenger ribonucleic acid (engl.): Boten-Ribonukleinsäure
ms	Maus
NPY	Neuropeptid Y
NRQ	Normalized relative quantities (engl.): normalisierte relative Mengen
PBS	Phosphate-buffered saline (engl.): Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction (engl.): Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

Pgk1	Phosphoglycerat-Kinase 1
qPCR	Real-Time quantitative polymerase chain reaction (engl.): quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
RABV	Rabiesvirus
RABV-N	Rabiesvirus-N-Protein
Ramp, RAMP	Receptor activity-modifying protein (engl.): Rezeptoraktivität-modifizierendes Protein
rb	Rabbit (engl.): Kaninchen
RIN	RNA integrity number (engl.): Ribonukleinsäure-Integritätszahl
RNA	Ribonucleic acid (engl.): Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
ROI	Regions of interest (engl.): Bereiche von Interesse
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation (engl.): Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean (engl.): Standardfehler des Mittelwertes
Tac1, TAC1	Tachykinin 1
TEER	Transendothelial electrical resistance (engl.): Transendothelialer elektrischer Widerstand
TJ	Tight junction(s) (engl.): Schlussleiste(n)
Tnf, TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxy-methyl)aminomethan
Vcam1, VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1 (engl.): vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
VG	Virusgenomäquivalente
VGLUT1	Vesicular glutamate transporter 1
VGLUT2	Vesicular glutamate transporter 2
VNA	Virus-neutralisierende Antikörper
VSMC	Vascular smooth muscle cell(s) (engl.): glatte Gefäßmuskelzelle(n)
ZNS	Zentralnervensystem
ZO	Zonula occludens (lat.): Schlussleiste

2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke.	15 -
Abb. 2: Endotheliale Tight und Adherens Junctions der Blut-Hirn-Schranke.	16 -
Abb. 3: Überblick über die relevanten Maushirn-Ebenen.....	40 -
Abb. 4: Relevante Bereiche im Cortex und Kleinhirn.	41 -
Abb. 5: Relative mRNA-Quantifizierung von <i>Adm</i> und seinen Rezeptormolekülen.....	56 -
Abb. 6: Absolute Quantifizierung von DOG4-Virusgenomäquivalenten.	57 -
Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von RABV in Kerngebieten und der Rinde des Kleinhirns... -	59 -
Abb. 8: Quantifizierung der RABV RNP IR ⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) sowie i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).	61 -
Abb. 9: Immunhistochemischer RABV-Nachweis nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) in den Kernen und der Rinde des Kleinhirns.	62 -
Abb. 10: Zelluläre Quellen der ADM-, CRLR/RAMP2- und CRLR/RAMP3-Expression im Kleinhirn.....	63 -
Abb. 11: Zelluläre Quellen von ADM im Kleinhirn nach i. m. DOG4-Inokulation.	64 -
Abb. 12: Durchschnittliche Anzahl der ADM IR Maxima pro Bild in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).	66 -
Abb. 13: Quantifizierung der durchschnittlichen ADM IR ⁺ Fläche [μm^2] pro Bild in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).....	67 -
Abb. 14: Quantifizierung der RAMP2 IR ⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).	69 -
Abb. 15: Darstellung von RAMP2 mit Immunfluoreszenzfärbung und IHC DAB/Nickel-Färbung nach DOG4-Inokulation.	71 -
Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von ICAM1 nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) sowie in PBS-inokulierten Kontrolltieren in Kleinhirn- kernen und -rinde.....	73 -
Abb. 17: Quantifizierung der ICAM1 IR ⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) sowie PBS-inokulierten Kontrolltieren.....	74 -
Abb. 18: Quantifizierung der ICAM1 IR ⁺ Fläche [%] in Kleinhirnkernen und -rinde in Abhängigkeit von der lokalen ADM-Anwesenheit nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3- Inokulation (8 d. p. i.) sowie PBS-inokulierten Kontrolltieren.....	75 -
Abb. 19: Lokale Veränderungen der ICAM1 IR in direkter Nähe von ADM.....	76 -
Abb. 20: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von <i>Cldn5</i> nach i. m. DOG4-Inokulation.....	78 -
Abb. 21: Semiquantitative Messung des CLDN5-Zig Zag-Indexes in Abhängigkeit von der lokalen ICAM1-Anwesenheit in RABV IR ⁺ und RABV IR ⁻ Bereichen des Kleinhirns nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3- Inokulation (8 d. p. i.).	81 -
Abb. 22: Änderung des CLDN5-Zig Zag-Indexes in Abhängigkeit von der ICAM1-Präsenz nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) sowie i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).	83 -
Abb. 23: Repräsentative Darstellung von T-Zellen und RABV im Kleinhirn nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).	85 -
Abb. 24: Quantifizierung der Albumin IR ⁺ Fläche in Gefäßen innerhalb der Kleinhirnkerne und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).....	88 -
Abb. 25: Mittlerer Grauwert der extravasalen Albumin IR ⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal; i. m.) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).....	89 -
Abb. 26: Intra- und extravasales Albumin in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) sowie in PBS-inokulierten Kontrolltieren.....	90 -

3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer DOG4-Amplikon	- 30 -
Tab. 2: Primer für relative Quantifizierung	- 37 -
Tab. 3: Primer-Effizienz	- 37 -
Tab. 4: Primärantikörper für IHC DAB/Nickel- und Doppelimmunfluoreszenzfärbung	- 45 -
Tab. 5: Biotinylierte Sekundärantikörper für IHC DAB/Nickel- und Doppelimmunfluoreszenzfärbung ...	- 46 -
Tab. 6: Direktmarkierte Sekundärantikörper (Cy3) für Doppelimmunfluoreszenzfärbung	- 47 -
Tab. 7: Reaktions-Kits.....	- 50 -
Tab. 8: Geräte.....	- 50 -
Tab. 9: Chemikalien	- 52 -
Tab. 10: Sonstige Instrumente und Verbrauchsmaterialien	- 53 -
Tab. 11: Software.....	- 54 -
Tab. 12: Korrelation der Viruslast einer Hirnregion mit der relativen mRNA-Expression der Gentranskripte von <i>Adm</i> , <i>Ramp2</i> und <i>Ramp3</i>	- 58 -
Tab. 13: Korrelation der relativen mRNA-Expression der Gentranskripte von <i>Cldn5</i> mit <i>Adm</i> , <i>Ramp2</i> , <i>Ramp3</i> und der Viruslast (n_{VG}).....	- 79 -
Tab. 14: Prozentualer Anteil an intra-, juxta- und extravasalen T-Zellen im RABV-infizierten Kleinhirn.	- 87 -

4 Einleitung

4.1 Tollwut

4.1.1 Epidemiologie und Historisches

Die Tollwut (Rabies) ist beim Menschen sowie Säugetieren eine durch das Rabiesvirus (RABV) ausgelöste, hochakute und fast immer letale Enzephalitis. Als eine der am längsten bekannten Infektionskrankheiten wird sie auch heute mit jährlich ca. 60.000 Todesopfern immer noch gefürchtet [91, 218]. 99 % der Übertragungen auf den Menschen ereignen sich über den Biss infizierter Hunde. Ein weiteres wichtiges Erregerreservoir sind Fledermäuse [91, 218]. Einen Meilenstein in der Bekämpfung der Tollwut wurde im 19. Jahrhundert mit der Entwicklung eines ersten RABV-Impfstoffes durch Louis Pasteur gelegt [219], der nach einigen Weiterentwicklungen den erfolgreichen Weg für die ab den 1950er Jahren weltweit durchgeführten Impfkampagnen an herumstreunenden Hunden ebnete [201]. Ungeachtet dessen ist in über 150 Ländern und damit in weiten Teilen der Welt die Tollwut immer noch endemisch. Das gilt insbesondere für die Entwicklungs- und Schwellenländer Asiens und Afrikas, wo vor allem in ländlichen Bereichen kein adäquater Zugang zu medizinischer Versorgung mit Medikamenten und Impfstoffen etabliert ist [201, 218, 227].

4.1.2 Krankheitsverlauf

Mit einer Inkubationszeit von typischerweise zwei bis drei Monaten nach dem Zeitpunkt der RABV-Erstinfektion treten zunächst unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Kopfschmerzen, Appetitlosigkeit und Fieber auf. Dann folgen die ersten spezifischen Symptome wie Parästhesien und Schmerzen an der Inokulationsstelle. In 80 % der Fälle tritt die enzephalitische Form der Tollwut auf, in 20 % die paralytische Form. Man geht davon aus, dass bei der enzephalitischen Form vor allem das Hirn, bei der paralytischen Form vorwiegend das Rückenmark und periphere Nerven betroffen sind [91, 218]. Bei der häufigeren enzephalitischen Tollwut wechseln sich klare Bewusstseinsphasen mit Hyperexzitation, Desorientierung und Halluzinationen ab. Durch die Beteiligung des autonomen Nervensystems entstehen Symptome wie Hypersalivation, Hyperhidrose und Piloerektion. Wahrscheinlich verursacht die Infektion von Hirnstammneuronen im bzw. in der Nähe des Nucleus ambiguus eine Hydrophobie, wodurch Kontraktionen und Krämpfe der Atemmuskulatur beim Schlucken auftreten und die berüchtigte Angst vor dem Anblick von Wasser und vor einer Flüssigkeitsaufnahme zu erklären ist [91, 209, 210]. Mit Fortschreiten der Erkrankung kommt es zum Bewusstseinsverlust, zu einer Tetraparese und kardiorespiratorischen Komplikationen.

Die Erkrankung führt dann meist circa 14 Tage nach dem Auftreten der initialen Symptome durch ein Multiorganversagen zum Tod [91].

4.1.3 Therapie und Prophylaxe

Primärprophylaktisch stehen effektive Totimpfstoffe zur Verfügung, die auch im Falle eines stattgehabten Erregerkontaktes in Kombination mit Passivimmunisierungen als Postexpositionsprophylaxe erfolgreich eingesetzt werden [58, 91, 201]. Der große Erfolg der Tollwutimpfungen besteht aus einer resultierenden effektiven Immunabwehr, die den Geimpften im Falle einer nachfolgenden Infektion mit dem Virus vor einem ansonsten tödlichen Verlauf der Erkrankung schützt [210]. Insofern wäre sicherlich eine flächendeckende primärprophylaktische Immunisierung in Hochrisikogebieten zur Bekämpfung der fatalen Rabieserkrankung essentiell, wo es aber gerade an medizinischer Grundversorgung, finanziellen Mitteln und der nötigen Infrastruktur in den ländlichen Regionen mangelt [227].

Für die letal verlaufende Tollwut gibt es auch bis heute keine effektive Therapie, sobald sich Symptome etabliert haben [44]. Von erfolgreichen Behandlungen der Virusinfektion wurde bislang nur in vereinzelt Fällen und ohne Reproduzierbarkeit berichtet. Die therapeutischen Bemühungen basierten dabei auf dem Einsatz intravenöser Immunglobuline, der Gabe von hochdosiertem Kortison und Antiepileptika, sowie ein therapeutisches Koma, das eine Zeitgewinnung für die Reifung von Immunantworten durch eine Immunisierung erzielen sollte. Fast ausnahmslos konnte damit jedoch allenfalls kurzfristig ein Überleben verlängert werden, bevor die Erkrankten letztendlich der Infektion erlagen [44, 214].

Erfolgsversprechender als derzeitige antivirale Therapieoptionen erscheinen weitere Impfstoffentwicklungen. Gerade im Rahmen der COVID (Coronavirus-Krankheit)-19-Pandemie kam es diesbezüglich zu rasanten Weiterentwicklungen. Aktuell sind noch immer 180 Impfstoffe, vor allem DNA- (Desoxyribonukleinsäure) und RNA- (Ribonukleinsäure) basierte, als Protein-Untereinheiten-Vakzine, als Kopplung mit viralem Vektor oder in Form inaktivierter, gentechnisch optimierter Viren in der klinischen Forschungsphase [218]. Bezüglich der RABV-Infektion wird gerade eine Studie mit auf mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) -basiertem und mit Lipidnanopartikeln gekoppeltem Impfstoff durchgeführt [9].

4.2 Das Rabiesvirus

4.2.1 Taxonomie und Aufbau

Das RABV aus der Familie der Rhabdoviridae und Gattung der Lyssaviridae besteht aus einem einzelsträngigen kontinuierlichen RNA-Genom in Negativstrangorientierung. Das Virusgenom umfasst zwölf Kilobasen (kb) und kodiert für fünf Strukturproteine, die auf dem Genom von 3' nach 5' in der Reihenfolge Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Glykoprotein (G), und Large-Protein (L) angeordnet sind [8]. Die RNA ist mit dem Nukleoprotein zu einer helikalen Struktur verpackt und wird zusammen mit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase L sowie dem Phosphoprotein zum Nukleokapsid vereint [173]. Das Phosphoprotein ist die nicht-katalytische Untereinheit des Polymerasekomplexes und fördert die virale Transkription und Replikation, es stabilisiert die RNA-Polymerase und unterstützt die Einkapselung der viralen RNA [30]. Das Matrixprotein liegt von außen am Nukleokapsid an. Es dient der Verstärkung und Kondensierung des Ribonukleoprotein-Komplexes während der Virusreplikation, reguliert die Bindung an die Zellmembran und die Ausschleusung der Viruspartikel aus der Zelle [136]. Außerdem bildet es eine Verbindung zur intrazellulären Domäne des Glykoproteins, das als Trimer in der Membranhülle des Virus sitzt und mit seinem größeren Teil nach extrazellulär weist [173]. Mit diesem extrazellulären Anteil vermittelt das Glykoprotein die zur Virusübertragung wichtige Bindung unter anderem an den nikotinergen Acetylcholin-Rezeptor [121], an den p75NTR (p75 Nerve Growth Factor (NGF) receptor) und NCAM (neural cell adhesion molecule) [59, 64] sowie kürzlich entdeckt an den Transferrin-Rezeptor 1 [207] und stimuliert im Wirt die Produktion der zur effektiven Virusabwehr nötigen VNA (Virus-neutralisierende Antikörper) [36].

4.2.2 Infektionszyklus

Das RABV wird in der Regel durch Tierbisse oder Kratzwunden auf den Menschen übertragen [96]. Nach Inokulation der infektiösen Viruspartikel ins Gewebe folgt eine typischerweise zwei bis drei Monate andauernde Inkubationsphase, in der im Muskel, nahe der Bissstelle eine langsame Replikation des Virus stattfindet [91]. Von da aus gewährt sich das neurotrope RABV den Eintritt in die peripheren Nerven, indem es unter anderem an die nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren der neuromuskulären Endplatte bindet und dann über einen retrograden axonalen Transport entlang der motorischen Nerven zum Rückenmark und schließlich ins Hirn gelangt [91, 97, 121]. Daneben kann es als Transportmittel auch sensorische Nerven [200] und dendritische Zellen (DC) nutzen [175]. Nach Erreichen des Zentralnervensystems (ZNS) und dem Auftreten spezifischer Krankheitssymptome durch neuronale Dysfunktionen [54] breitet sich das

Virus dann weiter über autonome und sensorische Nerven in andere Organsysteme wie Haut, Nebennieren und Herz sowie in die Speicheldrüsen aus. Mit Infektion der Speicheldrüsen schließt sich dann der Kreis für die weitere Krankheitsübertragung [91].

4.3 Immunevasive Strategien des Rabiesvirus

4.3.1 Beeinträchtigung der Immunabwehr

Erstaunlicherweise finden sich bei der hochpathogenen RABV-Infektion im ZNS nur wenige neurohistopathologische Veränderungen in Form eosinophiler Einschlusskörperchen (sogenannte Negri-Körperchen) mit allenfalls leichten Entzündungsreaktionen im Zytoplasma infizierter Zellen [91]. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Pathogenität des RABV nicht unbedingt auf einem neuronalen Zelltod oder einer überschießenden Entzündungsreaktion basiert, sondern vielmehr auf neuroprotektiven und antiinflammatorischen Prozessen [54, 90]. Die Pathogenität des RABV begründet sich vor allen Dingen auf seiner Fähigkeit, unter Beteiligung aller fünf Virusproteine und über vielfältige Mechanismen, das Immunsystem des Wirts zu unterwandern und dieses zu seinem Vorteil zu beeinflussen. Damit kann es eine ausreichend lange Replikations- und Ausbreitungszeit im Wirt zur Gewährleistung einer weiteren Übertragung auf den nächsten Wirt erzielen [116, 174].

Bisher sind bereits einige dieser effizienten Immunevasionsstrategien des RABV entdeckt worden. So lässt sich bei der Infektion mit dem hochpathogenen RABV nur eine für die Initiierung einer Immunantwort ungünstig geringe Virusreplikationsrate und Antigenexposition beobachten [42]. Zudem erschwert es durch vollständige Umhüllung der Virus-RNA im Ribonukleoprotein-Komplex die Erkennung von Fremd-RNA durch das angeborene Immunsystem [7]. Außerdem beeinflusst es auf vielfältige Weise den Interferon beta (IFN β)-Signalweg, über den Transkriptionsfaktoren wie Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-kappa B) und die Produktion antiviraler und inflammatorischer Zytokine wie Interferon alpha (IFN α) und IFN β [21, 22, 202, 203]. Darüber hinaus sind effektive Mechanismen zur Unterwanderung der erworbenen Immunabwehr des Wirtes bekannt. Das RABV erhöht die Toleranz für Virusinfektionen über die Hochregulation der Human leucocyte antigen (HLA)-G-Expression [138] und erschwert eine effiziente Bindung an DC, was mit einer verzögerten Aktivierung von T-Zellen einhergeht [223]. Außerdem aktiviert es nur in geringem Maße eine Anlockung von Immunzellen durch Chemokine wie das C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) [27]. Zudem führt es zur Suppression der T-Zell-Funktion über eine Stickstoff (NO)-Produktion und zu einer Fas-Liganden vermittelten Steigerung der

T-Zell-Apoptose [14, 128]. Zusätzlich übt das RABV Effekte auf die Apoptose über Beeinflussung des PD1 (programmed death 1)-Signalwegs aus [117, 118].

4.3.2 Modulation der Blut-Hirn-Schranke

Vor dem Hintergrund dieser differenzierten immunevasiven Strategien des hochpathogenen RABV stellt sich jedoch auch die Frage, welchen Einfluss die Blut-Hirn-Schranke als abschottende Barriere zwischen dem im ZNS replizierenden Virus und den aus dem Blutsystem einwandernden Immuneffektoren auf den Ausgang der Infektion hat.

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine funktionelle Einheit aus geschlossenem Kapillarendothel und Perizyten, deren gemeinsamen, kontinuierlichen und nicht-fenestrierten Basallamina sowie Astrozytenendfüßchen [3, 152]. Auf allen Gefäßebenen des Hirns, also sowohl in den Kapillaren, Arteriolen, postkapillären Venulen als auch in größeren Gefäßen, wie Arterien und Venen, separiert die Blut-Hirn-Schranke das Hirnparenchym vom peripheren Blutgefäßsystem [38]. Auf Kapillarebene grenzt abluminal an die Basallamina der Endothelzellen (EC) die parenchymale Basalmembran und unmittelbar Astro- und Perizyten an. In den postkapillären Venulen können endotheliale Basallamina und parenchymale Basalmembran der Astrozyten, bzw. der Meningen beim Übergang nach extrazerebral, voneinander abgegrenzt werden. [65]. Die endotheliale Basallamina und die parenchymale Basalmembran sind aus unterschiedlichen molekularen Bestandteilen aufgebaut und mit verschiedenen Enzymen ausgestattet [5, 179]. Zwischen ihnen befindet sich der perivaskuläre Raum [65]. Im Übrigen bedeckt die parenchymale Basalmembran mit den Astrozytenendfüßchen die gesamte Hirnparenchymoberfläche. Intrazerebral wird diese Einheit als *Glia limitans vascularis*, extrazerebral als *Glia limitans superficialis* bezeichnet [49].

Die komplex aufgebaute Blut-Hirn-Schranke stellt nicht nur eine mechanische Barriere dar, sondern sie reguliert auch aktiv den Austausch von Ionen und Molekülen zwischen ZNS und Blut und gewährleistet durch ein spezielles System von Membrantransportern und Enzymen auch den Schutz des Hirns vor potentiell toxischen Stoffen. Die Induktion und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke wird von zellulären und nicht-zellulären Komponenten reguliert. Einfluss darauf nehmen Astro- und Perizyten sowie die Extrazellulärmatrix [152]. Darüber hinaus haben für die Regulation der Blut-Hirn-Schranke umgebende Gliazellen, Makrophagen und Neurone als Bestandteile der neurovaskulären Einheit (NVU) regulierenden Einfluss [2, 3]. Abb. 1 gibt einen schematischen Überblick über die am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligten Zellen und Kompartimente.

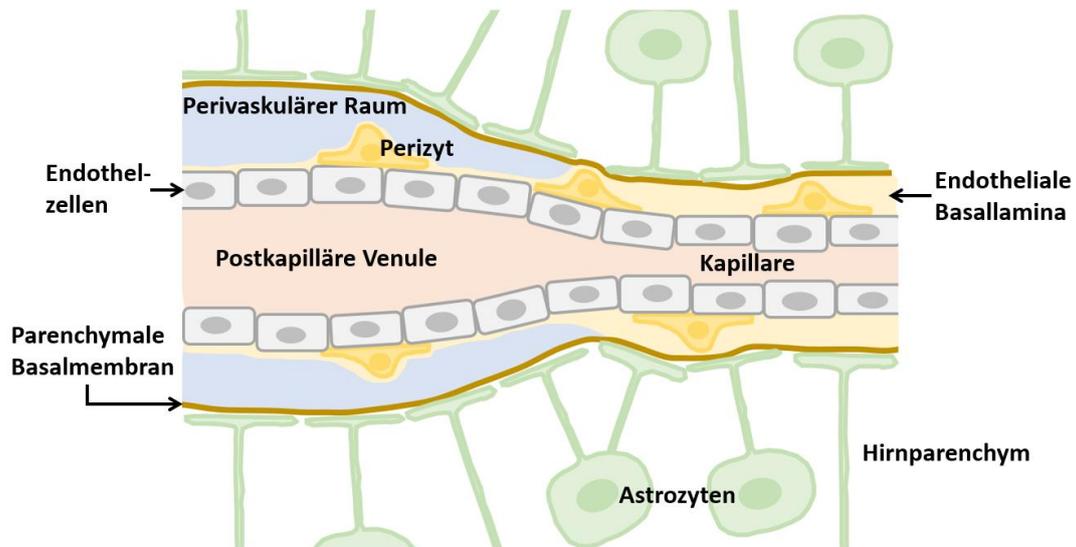


Abb. 1: Schematischer Aufbau der Blut-Hirn-Schranke.
Eigene Darstellung in Anlehnung an [49], S. 580.

Die entscheidende Eigenschaft der Blut-Hirn-Schranke besteht in ihrer außergewöhnlichen Barrierefunktion. Ihrer Fähigkeit, einen so restriktiven Stoffaustausch zwischen zwei Kompartimenten zu gewährleisten, ist neben den beschriebenen zellulären Bestandteilen in einem besonders komplexen Netzwerk an interzellulären Verbindungen zwischen den EC begründet. Diese sind mit hochspezialisierten Oberflächen- und Transmembranproteinen ausgestattet, den Tight Junctions (TJ) und Adherens Junctions (AJ) [152], die die parazelluläre Permeabilität weitgehend einschränken. Zu ersteren zählen die Occludine, Claudine und Junctional adhesion molecules (JAM), letztere bestehen aus Cadherinen [107, 193, 216]. Nach intrazellulär sind die TJ und AJ an der Zonula occludens (ZO) verankert, die wiederum die Aktivitäten der beiden in den Interzellulärspalt spannenden Transmembranproteine beeinflusst, sowie die Verbindung zum intrazellulären Strukturprotein Actin und damit eine Verbindung zum Zytoskelett herstellt [193]. Der über die Blut-Hirn-Schranke gemessene transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) erreicht Werte von bis zu $2.000 \Omega \text{ cm}^2$, in *in vivo*-Experimenten konnten sogar Werte bis $5.900 \Omega \text{ cm}^2$ gemessen werden. Damit liegt die TEER der Blut-Hirn-Schranke im Vergleich zu Barrieren in anderen Geweben mit ca. $30 \Omega \text{ cm}^2$ um ein Vielfaches höher [24, 25]. Entscheidend für die besonders hohe parazelluläre Dichtigkeit ist die Ausstattung der EC mit TJ [55, 144]. Abb. 2 illustriert das Prinzip der den Interzellulärspalt der Blut-Hirn-Schranke abdichtenden TJ und AJ.

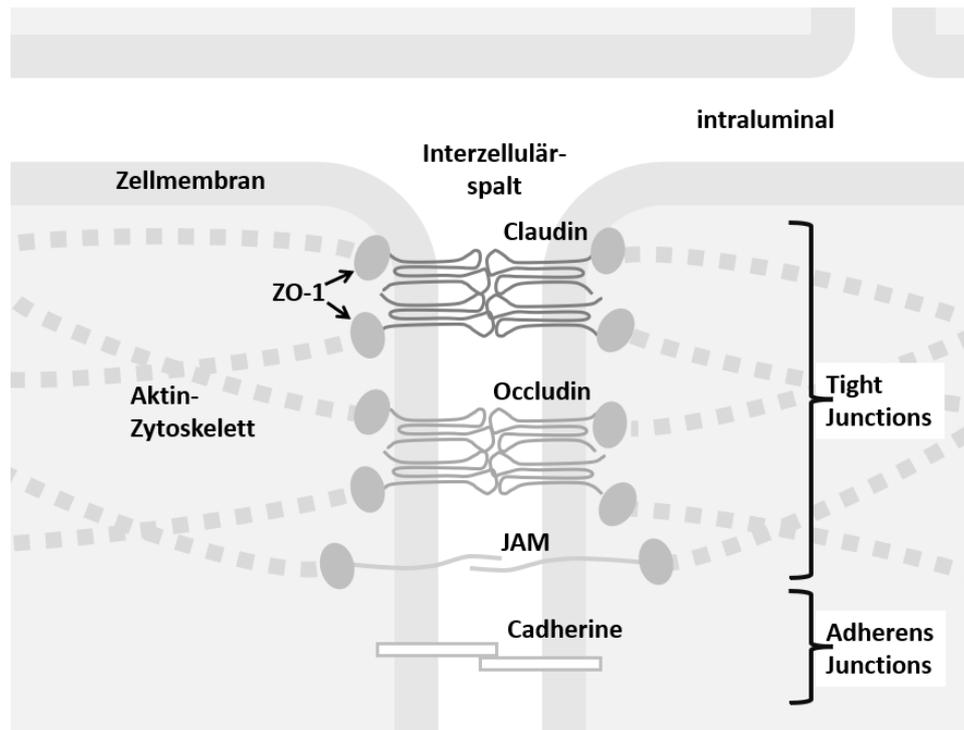


Abb. 2: Endotheliale Tight und Adherens Junctions der Blut-Hirn-Schranke.
Eigene Darstellung in Anlehnung an [30].
Abkürzungen: JAM, Junctional adhesion molecule; ZO-1, Zonula occludens 1.

Das innerhalb der Blut-Hirn-Schranke vorherrschende TJ ist Claudin 5 (CLDN5) [17], das zur Familie der Claudine gehört und von denen bislang 27 bekannt sind [11]. Sie bestehen aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen und zwei zytoplasmatischen Enden (N- und C-Terminus) [11]. CLDN5 hat eine lange extrazelluläre Schleife mit vier beta-Strängen und einer alpha-Helix sowie eine kürzere extrazelluläre Schleife mit einem beta-Strang und einer alpha-Helix, die über beta-Faltblattstrukturen verknüpft sind [113]. Über die extrazellulären Schleifen werden die ionenselektiven Poren gebildet und die Permeabilität des parazellulären Spalts maßgeblich bestimmt [187]. CLDN5 wird nach Synthetisierung und Einbau in die Plasmamembran translokalisiert, wo es dann Di- und Oligomerisierungen über die extrazellulären Schleifen ausbildet, sog. cis- (Verknüpfungen zu Claudinen innerhalb der gleichen Plasmamembran) und trans-Interaktionen (Verknüpfungen zu Claudinen benachbarter Zellen). Die Abschottungs- und Passageeigenschaften der Claudine werden grundlegend über ihre gegenseitigen Interaktionen, Verbindungen und gebildeten interzellulären Poren bestimmt [17, 69, 86, 187, 226]. Auch Strukturveränderungen des Moleküls an sich, die beispielsweise beim Übergang zur Endozytose beobachtet und durch die Interaktion mit benachbarten Elementen wie der ZO-1 beeinflusst werden, sind für die Funktionalität der TJ hinsichtlich ihrer Durchlässigkeit entscheidend [120, 127, 190].

Da die Blut-Hirn-Schranke also über einen besonders restriktiven parazellulären Passageweg verfügt, findet der größte Anteil des Stoffaustauschs von Molekülen und Zellen über den transzellulären Weg, also durch die EC, statt [63]. Wesentliche Faktoren sind dabei die Oberflächenmoleküle ICAM1 (Intercellular adhesion molecule 1), ICAM2 und VCAM1 (Vascular cell adhesion molecule 1), die zur Adhäsion von Immunzellen wie T-Zellen an EC und zu deren Diapedese über das Endothel benötigt werden [162, 184]. Außerdem ist die Blut-Hirn-Schranke mit einer Vielzahl an Transportern ausgestattet, die den aktiven Transport von Stoffen ins ZNS und über Efflux-Transporter aus dem ZNS heraus gewährleisten [183].

Im Rahmen von Virusinfektionen und entzündlichen ZNS-Erkrankungen wird die Eigenschaft der Blut-Hirn-Schranke hin zu einer verstärkten Durchlässigkeit verändert. Diese Regulation ist bei zerebralen Virusinfektionen eine Grundvoraussetzung für das Erreichen des infizierten Parenchyms von aus dem Blutsystem einwandernden Immuneffektoren [27, 39]. Im Zusammenhang dieser beiden pathophysiologischen Situationen besteht im Übrigen eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Schwere der klinischen Symptomatik mit dem Grad der Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für lösliche Stoffe, zu denen auch VNA zählen [51, 73, 74]. Eine Hyperpermeabilität der Blut-Hirn-Schranke als Zeichen der Funktionalitätsstörung führt zu schwerwiegenden Folgen wie der Entstehung von Hirnödemen und gravierenden Organdysfunktionen [1].

Während der Infektion mit dem hochpathogenen RABV zeigt sich eine solche Hyperpermeabilität erstaunlicherweise gerade nicht. Offensichtlich besitzt das RABV also die Fähigkeit, die Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke aufrechtzuerhalten und damit den Zutritt für Immunzellen und VNA in das virusinfizierte ZNS zu verweigern [76, 164, 165]. Im Grunde könnte eine verringerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke auch eine Schutzfunktion des infizierten Organismus vor selbst generierten neuroinflammatorischen und damit gewebeschädigenden Immunantworten sein [74]. Im Falle der hochpathogenen RABV-Infektion wird die aufrechterhaltende Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke über ein Ausbleiben der ansonsten bei Virusinfektionen herabregulierten TJ-Expression generiert. Ursächlich für diese Fähigkeit ist eine im Vergleich zu im Labor attenuierten RABV-Stämmen viel geringere Expression diverser Chemokine [27, 114]. Der negative Einfluss des RABV auf die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen und VNA ins infizierte ZNS stellt also einen entscheidenden Pathogenitätsmechanismus im Hinblick auf den fatalen Verlauf der Infektion dar [157, 164, 165].

4.4 Die Rolle von Neuropeptiden bei zerebralen Virusinfektionen

Neuropeptide sind Signalstoffe, die von neurosekretorischen Zellen ins Blut oder parakrin ins Gewebe abgegeben werden. Sie wirken als Hormone oder Neurotransmitter und sind damit an der Regulation von Prozessen und Signalwegen beteiligt. In der Kommunikation zwischen Nerven- und Immunsystem spielen sie eine herausragende Rolle. Die Interaktionen dieser beiden Systeme sind für die Aufrechterhaltung der Homöostase, biologischer Funktionen sowie Schutzmechanismen für das Überleben eines Organismus essentiell [29].

Unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen werden Neuropeptide verstärkt exprimiert. So führen sie beispielsweise bei Inflammation zu einer verstärkten Immunzellinfiltration in das jeweilige Gewebe [188]. Des Weiteren modulieren sie die Freisetzung inflammatorischer Signalstoffe aus Immunzellen und deren Wirkung am Gefäßendothel wie beispielsweise im Rahmen der neuronalen Schmerzverarbeitung [158]. Zu den Neuropeptiden gehören unter anderem Neuropeptid Y (NPY), Tachykinin 1 (TAC1), Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Somatostatin, Vasoaktives intestinales Polypeptid und Adrenomedullin (ADM) [29, 40, 158, 189].

Zu den pathophysiologischen Situationen, in denen Neuropeptide auch eine wichtige regulatorische Rolle spielen, zählen Infektionen. Nicht nur im ZNS, sondern auch in allen anderen Organsystemen beeinflussen Neuropeptide anti- und proinflammatorisch Entzündungsreaktionen [119]. Speziell neurotrophe Viren verursachen durch die Infektion des ZNS Expressionsveränderungen von Neuropeptiden. Damit nehmen sie für den Infektionsverlauf entscheidenden Einfluss auf die Interaktionen zwischen Immun- und Nervensystem [159]. Im Fall der Bornavirus-Infektion werden beispielsweise NPY und CGRP verstärkt exprimiert [159, 163]. Bei der HIV (Humanes Immundefizienz-Virus)-Infektion kommt es zu einer NPY- und TAC1-Hochregulation [12, 129]. Für das RABV wurde ebenfalls gezeigt, dass es verschiedene Neuropeptide, allen voran CGRP, im infizierten Maushirn hochreguliert [213].

Eine gesteigerte NPY-Expression im Rahmen zerebraler Virusinfektionen führt zu einer Hemmung der Immunzellinfiltration und -anlockung durch verringerte Chemokin- und Zytokinexpression. NPY hat letztlich einen positiven Einfluss auf den zerebralen Blutfluss und stellt einen protektiven Faktor vor weiteren Zellschädigungen dar [43, 178].

TAC1 wird nach Stimulation durch TNF (Tumornekrosefaktor) hochreguliert und führt zu einer Vasodilatation und Chemotaxis von Immunzellen. Außerdem reguliert es ICAM1 auf EC hoch und führt damit zu einer gesteigerten Immunzelladhäsion am Endothel [13].

Das Neuropeptid CGRP verfügt über stark vasodilatatorische und immunsuppressive Eigenschaften. Es verhindert die Antigenpräsentation in Makrophagen und dendritischen Langerhanszellen [77]. Außerdem hemmt es das Anlocken von neutrophilen und mononukleären Zellen [80]. Zudem reguliert CGRP die T-Zell-Proliferation [23] und verschiedene Chemokine, wie IL (Interleukin)-2 [204]. Bei der RABV-Infektion, wo es in gewissem Abstand zu RABV-infizierten Neuronen hochreguliert wird, übt es antiapoptotische und auf die Antigenpräsentation hemmende Effekte aus [213].

Da also Neuropeptide im Rahmen von Virusinfektionen und im Speziellen auch bei der RABV-Infektion eine wichtige Schnittstelle zwischen dem Nerven- und Immunsystem darstellen, könnte deren Regulation auch während der RABV-Infektion ein entscheidender Faktor hinsichtlich seiner Pathogenitätsmechanismen zur Unterwanderung einer effektiven Immunabwehr sein.

4.5 Adrenomedullin

4.5.1 Struktur, Synthese und Sekretion von Adrenomedullin

Das Neuropeptid ADM wurde erstmals 1993 aus einem Phäochromozytom isoliert und wird aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zu CGRP zur Calcitonin-/CGRP-Familie gezählt, der auch Calcitonin und Amylin angehören. ADM besteht aus 52 Aminosäuren mit einer sechsgliedrigen Ringstruktur, die durch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren 16 und 21 generiert wird. Außerdem weist es eine amphipathische alpha-Helix und ein amidiertes Tyrosin am C-Terminus auf [60, 103].

Die Synthese erfolgt ausgehend von seinem 185 Aminosäuren langen Vorläufermolekül Preproadrenomedullin, das nach Abspaltung seines Signalpeptids in Proadrenomedullin und dann schließlich zu ADM und dem weiteren vasoaktiven Protein, PAMP (Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide), prozessiert wird [104, 105].

ADM wird hauptsächlich von EC, glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und Fibroblasten gebildet, darüber hinaus aber auch von Makrophagen, Monozyten, Epithelzellen sowie Tumorzellen in sämtlichen Organsystemen [115, 185, 211]. Es wird kontinuierlich sezerniert und verfügt über keinerlei intrazelluläre Speichermöglichkeit [88]. Im Hirn ist ADM ebenfalls stark verbreitet [176]. Seine wichtigsten zellulären Quellen sind die zerebralen EC, die das Neuropeptid nach Stimulation durch von Astrozyten stammenden Faktoren nach intraluminal ins Gefäßsystem sezernieren [100]. Weitere Quellen der ADM-Sekretion sind: Plexus choroideus, Peri- und Astrozyten, sowie innerhalb des Kleinhirns Purkinjezellen, Neurone der Kleinhirnerne, Golgi-Zellen innerhalb des Stratum granulosum der Kleinhirnrinde und Moosfasern, die von Neuronen der

Brückenkerne abstammen [176, 211]. Die Produktion von ADM wird im Übrigen von einer Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie TNF, Lymphotoxin A, IL1A und IL1B stimuliert [185, 186]. ADM weist nach Sekretion mit rund 22 Minuten nur eine sehr kurze Halbwertszeit auf, bevor es zunächst von der Matrix-Metalloproteinase (MMP) 2 und anschließend von Aminopeptidasen abgebaut wird [132, 137].

4.5.2 Wirkungsweise von Adrenomedullin

Die Signalwirkungen von ADM werden über einen Rezeptorkomplex bestehend aus einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen, dem Calcitonin receptor-like receptor (CRLR), mit einem Receptor activity-modifying protein (RAMP) vermittelt. Die drei bisher bekannten RAMP sind um die 150 Aminosäuren lang und mit einem kurzen intrazellulären C-Terminus, einer Transmembrandomäne, dem extrazellulären N-Terminus mit Signalpeptid sowie zwei Disulfidverbindungen ausgestattet [34].

Das Heterodimer CRLR/RAMP1 bildet den selektiven CGRP-Rezeptor, CRLR/RAMP2 den selektiven ADM-Rezeptor AM1 und CRLR/RAMP3 den AM2, der zusätzlich eine Affinität für CGRP zeigt. Die Assoziation von einem RAMP mit dem CRLR ist nicht nur für die Bestimmung der Ligandenspezifität von Bedeutung, sondern auch für die Translokation des CRLR aus dem endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche [135]. Die zellulären Quellen der ADM-Rezeptoren sind genau wie ADM selbst in großer Zahl in EC und VSMC vorhanden [108, 180]. Im Hirn ist der selektive ADM-Rezeptor AM1 im Kleinhirn, Bulbus olfactorius und Hippocampus nachweisbar, in geringem Maße auch im Mesencephalon und Hirnstamm. Speziell im Kleinhirn findet man ihn in Purkinjezellen und im angrenzenden Plexus choroideus sowie im Ventrikelsystem [195]. Außerdem wird RAMP2 im Vergleich aller RAMP am höchsten in den kleinen zerebralen Gefäßen exprimiert [108].

Nach Bindung von ADM an seinen Rezeptorkomplex kommt es zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und zur Bildung des Signalstoffs cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) [180]. Anschließend werden Kaskaden über die Signalwege PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/AKT (Proteinkinase B) und MAPK-ERK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Serin/ Threonin-Kinase) sowie über Regulation der Synthese des Signalstoffs NO in Gang gesetzt [52, 133]. Schlussendlich beeinflusst ADM entscheidend die Expression von Chemo- und Zytokinen, die wiederum vielfältige Wirkungen erzielen können [78, 94].

4.5.3 Effekte von Adrenomedullin

Sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen hat ADM ein großes Spektrum an Effekten auf die verschiedensten biologischen Prozesse.

Die Schlüsselrolle von ADM besteht in der Regulation der Endothelfunktion und der Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität [111].

Bereits in der Embryogenese zeigt sich seine tragende Rolle hinsichtlich der Angiogenese, da ADM für die Zelldifferenzierung und intakte Gefäßsystementwicklung unabdingbar ist: Homozygote *Adm*-Knockout-Mäuse versterben bereits in utero an nicht mit dem Leben vereinbaren kardiovaskulären Gefäßfehlbildungen und einer pathologisch erhöhten Gefäßdurchlässigkeit [26, 53, 177]. Im Übrigen resultiert die gleiche Konsequenz bei homozygoten *Ramp2*- bzw. *Crlr*-Knockout-Mäusen [84], während homozygote *Ramp1*- und *Ramp3*-Mäuse lebensfähig und voll ausgereift geboren werden [37, 192]. Bei heterozygotem *Adm*-Knockout sind erhöhte Blutdrücke und eine verringerte NO-Produktion, nach heterozygotem *Ramp2*-Knockout eine vermehrte Gefäßdurchlässigkeit und schwere Organfibrosen mit erhöhter vaskulärer Seneszenz beschrieben. Hinsichtlich der Endothelfunktion während der Gefäßentwicklung zeigt sich also dadurch, dass die Rezeptorkomponente RAMP2 für den ADM-Signalweg unverzichtbar ist [84, 111, 177].

Darüber hinaus weist das auto- und parakrin wirkende Neuropeptid mit seinen stark vasodilatatorischen Eigenschaften [70, 103] generell gewebeprotective Fähigkeiten auf [85].

Im Rahmen vieler kardiovaskulärer Erkrankungen kann ein erhöhtes ADM-Plasmalevel gemessen werden [70], wie z. B. bei arterieller Hypertonie, wo ADM an der Blutdruckregulation beteiligt ist [109]. Auch bei einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertension kann ADM organprotectiv wirken [225]. Außerdem wird ADM bei kardialen und zerebralen Ischämien als auch unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert. Es verringert eine Gewebeschädigung durch Förderung der Kollateral- und Gefäßbildung zur Aufrechterhaltung der lokalen Gewebepfusion, Verringerung des oxidativen Stresses sowie Erhöhung des zerebralen Blutflusses [85, 124, 220]. Des Weiteren hat ADM auf die Pathogenese der Atherosklerose mit seinen antiproliferativen und antimigratorischen Effekten auf VSMC einen protektiven Einfluss [110, 221]. Mit seiner Hochregulation unter hypoxischen Bedingungen [147] verbessert ADM mit seiner Fähigkeit der Angiogenesestimulation die Sauerstoffversorgung im Gewebe [142]. Die Höhe des ADM-Plasmalevels hat im Übrigen auch bei der Herzinsuffizienz prognostische Aussagekraft [150].

Darüber hinaus übt ADM auch im Rahmen von Inflammation, wie bei entzündlichen Autoimmunerkrankungen, beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis, einen für das entzündete Gewebe positiven Einfluss aus [61]. Zusätzliche Wirkungen von ADM lassen sich im Gastrointestinaltrakt in der Förderung von Regenerationsprozessen bei entzündlichen Darmerkrankungen [133], in der Uterusdurchblutung und Anpassung des Gefäßsystems in der Schwangerschaft [130], sowie durch seine Hochregulation im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz beobachten [71].

Generell erfolgt die protektive Wirkung von ADM auf das Gefäßsystem über eine Stimulation der Proliferation von VSMC, Hemmung der EC-Apoptose sowie antithrombotische und antikoagulative Effekte durch die Freisetzung von Antithrombin und Plasminogenaktivatoren aus den EC [70, 134, 221]. Im Wesentlichen reduziert ADM also Gewebeschädigungen durch eine verbesserte Barrierefunktion der EC [102].

Weitere Aspekte bestehen unter anderem aus dem Einfluss von ADM auf endokrine Prozesse: Es reguliert die Freisetzung von ACTH (Adrenocortikotropes Hormon) aus der Adenohypophyse [169], die im Hypothalamus stattfindende Regulation von Wasser- und Nahrungsaufnahme [168], den Blutdruck über den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt in der Niere sowie die Aldosteron-Sekretion in der Nebennierenrinde [45, 222]. Zudem ist der ADM-Plasmaspiegel bei Patienten mit diabetischer Nephropathie erhöht [56].

Eine wichtige Rolle spielt ADM auch im Kontext von Tumoren. Es wird von Karzinomen als solide Tumorentität mit hypoxischen Umgebungsbedingungen wie beispielsweise beim Pankreas- [160], Endometrium- [153] und Mammakarzinom [131] sowie beim Glioblastom [154], verstärkt exprimiert. Dort fördert es die Karzinogenese durch Tumorzellproliferation und Hemmung von Apoptose. Außerdem begünstigt ADM die Angiogenese zur verbesserten Blutversorgung des Tumors und stimuliert die Metastasierung [146, 149, 160, 161].

Des Weiteren ist seine antiinflammatorische Wirkung von Bedeutung [70, 166, 217]. Im Rahmen von Sepsis und dem systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS) wird es hochreguliert und weist insbesondere bei einem septischen Schock seine höchsten Plasmalevel auf [31, 151, 194]. Dabei kann es möglichen Gewebeschädigungen nicht nur durch die Verbesserung der Gefäßintegrität [85, 221], sondern auch über die Regulation der Immunabwehr entgegenwirken [115]. Unter infektiösen Bedingungen im Rahmen bakterieller Infektionen wird die Expression von ADM durch proinflammatorische Zytokine wie TNF, LTA, IL1A und IL1B sowie durch Lipopolysaccharid (LPS) – das bakterielle Endotoxin gramnegativer Bakterien – hochreguliert [35, 88, 191, 224].

Die Effekte des ADM-Signalwegs sind vielfältig. So reguliert es zum einen die Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF und IL1B, beispielsweise durch Inhibition der TNF-Produktion in Makrophagen, herunter [217], zum anderen erhöht es IFN-gamma, wodurch die Immuntoleranz über die Stimulation tolerogener antigenpräsentierender Zellen verbessert wird [46]. Zusätzlich fördert ADM die Suppression von Th1-Zellen, aktiviert regulatorische T-Zellen und beeinflusst die Reifung von DC [166].

Die antiinflammatorische Wirkung von ADM lässt sich auch in seiner Beeinflussung der Adhäsionsmoleküle am Endothel beobachten, da eine verringerte ADM-Expression die Ausstattung der EC mit Adhäsionsmolekülen steigert, was zu einem Anheften von Immunzellen wie Makrophagen und damit zu einer Stimulation von Immunantworten führt [111]. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass ADM die Expression der Endothelzelloberflächenproteine ICAM1, VCAM1 und Selectin E negativ beeinflusst [93].

Aber auch bei pathophysiologischen Extremsituationen, wie im Schockzustand oder bei SIRS, kann die Gewebepерfusion durch ADM verbessert werden [151, 194].

Interessanterweise scheint ADM jedoch auch proinflammatorische Effekte, z. B. durch Erhöhung von IL6, bewirken zu können [217]. Die regulatorische Rolle von ADM bei Infektionen, Entzündungen und Sepsis – Zuständen, die mit einer Erhöhung seines Plasmaspiegels einhergehen – begründet die aktuelle intensive Erforschung des Neuropeptids bezüglich seiner klinischen Aussagekraft und Anwendungsmöglichkeiten als prognostischer Marker. Die Höhe der ADM-Expression soll dabei mit der Schwere der Erkrankung bzw. dem Grad der Endothelschädigung korrelieren [126, 150, 194]. Diesbezüglich gibt es bereits vielversprechende Forschungsergebnisse über das ADM-Vorläufermolekül Proadrenomedullin im Rahmen von bakteriellen Pneumonien und Sepsis [47, 89]. Aber auch bei der ambulant erworbenen Pneumonie, die nicht nur durch bakterielle, sondern auch Virus- oder Pilzinfektionen entstehen kann, sind erhöhte Werte von Proadrenomedullin nachgewiesen worden [89]. Dabei sind bei bakteriell sowie viral verursachter Pneumonie sogar gleich hohe Proadrenomedullin-Werte messbar, sodass eine Unterscheidung der Krankheitsätiologie nicht möglich ist [16]. Im Übrigen wurden auch während einer schweren COVID-19-Infektion erhöhte ADM-Expressionslevel gefunden [81], die als erste Hinweise für eine Regulation von ADM bei Virusinfektionen zu interpretieren sind.

ADM beeinflusst noch eine weitere wichtige Schnittstelle: die Blut-Hirn-Schranke. Das auto- und parakrin wirkende Neuropeptid wird nämlich von den an der Blut-Hirn-Schranke beteiligten Zelltypen sezerniert [70, 100] und fördert ihre Induktion und Aufrechterhaltung [101]. Die Regulation der Blut-Hirn-Schranke durch ADM führt zu einer Verringerung der parazellulären Permeabilität und Erhöhung der TEER [98].

Außerdem reduziert ADM die Flüssigphase-Endozytose und steigert die Aktivität von Effluxpumpen [99, 101], wodurch die Endothelfunktion und Gefäßintegrität verbessert wird. Der zugrundeliegende Mechanismus für die Förderung der erhöhten parazellulären Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke durch ADM besteht aus der Stimulation der Expression des TJ-Proteins CLDN5 [72].

5 Fragestellung

Noch immer ist die Tollwut eine weltweit gefürchtete und fast ausnahmslos tödlich verlaufende Infektionskrankheit, die jährlich mehrere zehntausend Opfer fordert. Zwar sind effektive Immunisierungen (Prä- und Postexpositionsprophylaxen) verfügbar, die vor einem letalen Infektionsverlauf schützen, doch sind Impfungen gerade in strukturell und finanziell benachteiligten Regionen dieser Welt nicht ausreichend verfügbar. Gravierender noch ist der Blick auf die therapeutischen Optionen: Im Falle einer symptomatischen RABV-Infektion gibt es bis heute keine Behandlungsmöglichkeit, die den Betroffenen vor einem tödlichen Infektionsausgang bewahrt.

Zur Entwicklung erfolgreicher Therapiestrategien ist daher das Verständnis der für die hohe Pathogenität des RABV verantwortlichen Mechanismen essentiell.

Nach dem aktuellen Stand der Forschung weiß man bereits, dass das RABV über diverse hocheffiziente Strategien verfügt, einer effektiven Immunabwehr des Wirts zu entkommen.

Interessanterweise konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass bei zerebralen Virusinfektionen die Expression von Neuropeptiden hochreguliert wird. Neuropeptide sind wichtige Mediatoren für die Kommunikation zwischen Nerven- und Immunsystem. Eines dieser Neuropeptide ist ADM, dessen Hochregulation bisher hauptsächlich in bakteriellen Infektionen, Sepsis und Inflammation beschrieben wurde. Wenig weiß man über dessen Rolle bei Virusinfektionen. Die Haupteffekte von ADM bestehen in der Stimulation von Angiogenese, in antiinflammatorischen Wirkungen sowie in der Förderung von endothelialen Barrierefunktionen, unter anderem auch die der Blut-Hirn-Schranke. Insofern könnte also die Expression von Neuropeptiden wie z. B. ADM durch das RABV reguliert werden und darin eine weitere immunevasive Strategie des Virus bestehen.

In dieser Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Gibt es Expressionsveränderungen des Neuropeptids ADM bzw. seiner Rezeptorkomponenten im RABV-infizierten Maushirn bzw. in ausgewählten Hirnbereichen?

Haben Veränderungen des ADM-Systems Einfluss auf Komponenten der Blut-Hirn-Schranke?

Kommt es darüber zu einer vermehrten Abschottung des Hirnparenchyms vor aus dem Blutsystem eindringenden Immuneffektoren?

6 Methoden und Material

6.1 Viren, Versuchstiere und *in vivo*-Experimente

6.1.1 Virusstämme

Der hochpathogene Wildtyp-RABV-Stamm DOG4 entstammt aus einem von einem tollwütigen Hund infizierten Menschen und wurde für die Versuche auf murinen Neuroblastomzellen (NA-Zellen) kultiviert. Alle Infektionsversuche wurden unter Verwendung der gleichen Viruspassage durchgeführt [41].

Beim RABV-Stamm Challenge Virus Standard F3 (CVS-F3; F3) handelt es sich um einen zellkulturadaptierten Stamm, der in immunkompetenten Mäusen nach oraler, intramuskulärer (i. m.), intrakranialer und intranasaler (i. n.) Inokulation nicht zum Tod führt. Die Apathogenität beruht auf einer Arginin-zu-Glutamin-Substitution an Position 333 des RABV-G. Das Virus wurde auf Baby Hamster Kidney (BHK)-21-Zellen, einer Fibroblastenzelllinie, kultiviert [75].

6.1.2 Versuchstiere, Infektion und Versuchstiereingruppierung

Für die Tierversuche, die von Dr. Mirjam Bertoune durchgeführt worden sind, wurden weibliche sechs bis acht Wochen alte C57Bl/6N-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden bei einem 12 h/ 12 h-Tag-Nacht-Zyklus mit Zugang zu Futter und Wasser ad libitum in Gruppen von fünf Mäusen gehalten. Für die Infektionsversuche wurden die Tiere paarweise gesetzt. Die Inokulation der Mäuse mit PBS (phosphate-buffered saline) oder dem RABV-Stamm DOG4 erfolgte beidseitig i. m. (M. gastrocnemius) unter kurzzeitiger Isofluran-Inhalationsanästhesie (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen V 54 - 19 c 20 15 h 01 MR 20/26 Nr. 11/2014, durchgeführt an der Philipps-Universität Marburg). Die Inokulationsdosis betrug pro Tier insgesamt 10^6 FFU (focus-forming units) in 100 μ L PBS, was durchschnittlich bei 90 % der Tiere zum Tod führt. Die Tiere wurden bereits eine Woche vor Versuchsbeginn sowie während des Versuchs täglich morgens gewogen, mit spezifischen Symptomen zusätzlich auch abends. Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs wurde ein Scoring mit zahlreichen Tests durchgeführt, mit dem die Tiere in 6 Stadien (Score 0 bis 5) eingruppiert werden konnten:

Score 0: Gesund

Score 1: Zerzaustes Fell

Score 2: Negativer trunk curl-Test

(Tier kann nicht mehr alle vier Extremitäten strecken)

Score 3: Einseitige Hinterbeinparese

Score 4: Zweiseitige Hinterbeinparese

Score 5: Sterbend

Zur Vermeidung von Leiden wurden die Tiere spätestens nach Erreichen eines der drei folgenden Abbruchkriterien durch zervikale Dislokation unter Isofluran-Inhalationsanästhesie euthanasiert: I.) Gewicht < 80% im Vergleich zum Gewicht bei Inokulation, II.) > 72 h im Stadium 3, III.) Stadium 4.

Tiere, die aufgrund eines Abbruchkriteriums getötet wurden, werden im Weiteren als ‚terminal‘ bezeichnet.

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden Tiere zu folgenden Zeitpunkten euthanasiert:

- 1.) 5 d. p. i.: 5 Tage nach Inokulation (dies post infectionem) ohne Auftreten von Krankheitssymptomen (Inkubationsphase); n = 7
- 2.) Score 2: 7 d. p. i., mit ersten spezifischen Krankheitsanzeichen (frühe symptomatische Phase); n = 7
- 3.) terminal: 8 – 10 d. p. i., bei Erreichen eines Abbruchkriteriums; n = 7
- 4.) PBS: 10 d. p. i. nach Injektion von PBS-Lösung (Kontrolltiere); n = 6

Für immunhistochemische (IHC)- und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurden Tiere zu folgenden Zeitpunkten euthanasiert:

- 1.) Score 2: 7 d. p. i., mit ersten spezifischen Krankheitsanzeichen (frühe symptomatische Phase); n = 3
- 2.) terminal: 8 – 10 d. p. i., bei Erreichen eines Abbruchkriteriums; n = 2
- 3.) PBS: 10 d. p. i. nach Injektion von PBS-Lösung; n = 3

Zum Vergleich wurde Hirngewebe aus männlichen C57Bl/6N-Mäusen herangezogen, das von Bernhard Dietzschold (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Diese Mäuse (n = 4) wurden mit dem RABV-Stamm CVS-F3 unter Einhaltung der Regelungen zum tierexperimentellen Arbeiten vor Ort (genehmigt durch das Institutional Animal Care and Use Committee of Thomas Jefferson University,

Experimentnummer #4585 und #4589), ebenfalls unter Isofluran-Inhalationsanästhesie, mit 10^5 FFU CVS-F3 in 10 μ L PBS i. n. inokuliert und an Tag 8 nach Inokulation euthanasiert. Damit ergab sich die letzte Gruppe an Versuchstieren:

4.) F3: Infektion mit CVS-F3-Virus, 8 d. p. i.; n = 4

Außerdem lag für Testfärbungen (unter anderem für die Antikörperfunktionalität in Lunge und Herz) Gewebe aus dem Tierversuch 2011-89 (Aktenzeichen V 54 – 19 c 20 15 (1) MR 20/26 Nr. 89/2011, genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen) vor. Die Maus (weiblich, sechs Wochen alt, C57Bl/6N von Charles River, WIGA Deutschland GmbH, Sulzfeld, DE) wurde mit insgesamt 10^6 FFU DOG4 in 60 μ L physiologischer Kochsalzlösung i. m. (M. gastrocnemius; 30 μ L pro Seite) inokuliert und 11 d. p. i. nach 72 h im Stadium 3 (Abbruchkriterium) durch zervikale Dislokation euthanasiert.

6.1.3 Gewebegewinnung und -fixierung

Nach Euthanasierung der Tiere wurde die Nackenhaut eröffnet und die Nackenmuskulatur abpräpariert. Durch das Foramen magnum wurde die Kalotte beidseitig nach lateral eröffnet und nach rostral abgeklappt, um das Hirngewebe freizulegen.

Für RNA-Analysen vorgesehenes Hirngewebe wurde stumpf voneinander gelöst und in die Bereiche Cortex, Kleinhirn (Cerebellum), Hirnstamm und Rest (Diencephalon und Telencephalon ohne Cortex) aufgeteilt. Die Gewebeproben wurden sofort zur RNA-Stabilisierung nach Herstellerangaben in RNAlater-Lösung (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) eingetaucht und bei 8 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

Für IHC- und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen vorgesehenes Hirngewebe wurde nach vollständiger Entnahme aus der Kalotte mittels Bouin-Hollande-Lösung für mindestens 24 h fixiert. Die Bouin-Hollande-Stammlösung wurde zuvor durch Lösung von 12,5 g Kupferacetat in 250 mL Analyse-Wasser, Zugabe von 30 g Pikrinsäure unter Rühren und Auffüllung auf 500 mL Analyse-Wasser sowie Filtration hergestellt. Anschließend wurden je 100 μ L der Stammlösung mit 10 μ L 37 %-iger Formaldehydlösung und 1 μ L Eisessig versetzt. Nach der Fixierung wurde das Gewebe mehrmals mit 70 %-igem Isopropanol gewaschen, bevor das Gewebe im Gewebe-Einbettautomaten Tissue-Tek (Vogel, Gießen, DE) über eine aufsteigende Alkoholreihe paraffiniert wurde. Danach wurde es in einen Paraffinblock eingebettet, bei Raumtemperatur (RT) ausgehärtet und gelagert.

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 RNA-Isolierung aus Maushirnen

Um Veränderungen der Transkriptionsspiegel spezifischer Gene im RABV-infizierten Maushirn analysieren zu können, wurde die mRNA aus den Hirngeweben isoliert. Dafür wurde das in RNAlater stabilisierte Gewebe nach Herstellerangaben mit 1 mL pro 100 mg Gewebe β -Mercaptoethanol versetzten RLT-Puffer aus dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE) und einem handgehaltenen Omni Tissue Homogenizer unter Verwendung von Soft Tissue Omni Tip Plastic Homogenizing Probes (7 x 110 mm) (Omni International, Inc, Kennesaw, GA, USA) und anschließendem 5- bis 10-maligem Auf- und Abziehen in einer 1 mL-Spritze mit einer 26G-Kanüle homogenisiert. Der RLT-Puffer inaktiviert RNasen, um Verluste an instabiler RNA zu reduzieren. Die Homogenate wurden durch Zentrifugation (3 min, 16000 x g) geklärt und der Überstand bis zur Aufreinigung bei -80 °C gelagert.

Die RNA-Aufreinigung wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer durch polare Wechselwirkungen bedingte Bindung von RNA an Kieselgel (Silica-Membran) in den Zentrifugenröhrchen. Durch Zugabe von Ethanol wird diese Bindung begünstigt, während andere Bestandteile des Lysats wie DNA denaturieren und unter Zentrifugation ausgewaschen werden. Nach einem DNA-Verdau mit DNase I für 15 min und weiteren Waschschritten mit dem Puffer RPE wird die aufgereinigte RNA unter leicht basischen Bedingungen aus der Membran gelöst und mit RNase-freiem Wasser in 50 μ L-Aliquots überführt. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80°C.

6.2.2 Konzentrationsbestimmung der RNA am Nanodrop

Die Konzentration der in wässriger Lösung befindlichen RNA wurde am Spektralphotometer Nanodrop 2000c (Thermo Fisher) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Da 40 μ g RNA in 1 mL Lösung einer Extinktion von 1,0 entspricht, kann auf diese Weise die RNA-Konzentration berechnet werden. Zudem wurde die Extinktion, über die der Proteingehalt der Probe bestimmt wird, bei 280 nm gemessen und die Reinheit der Probe über das Absorptionsverhältnis der optischen Dichte OD_{260}/OD_{280} überprüft, die zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Zur Minimierung von Messfehlern wurde der Mittelwert aus je sechs Messwerten einer Probe berechnet.

6.2.3 Qualitätsüberprüfung der RNA am Bioanalyzer

Die Qualität der RNA in wässriger Lösung wurde mit dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) am Bioanalyzer RNA 2100 (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben überprüft. Das Prinzip der Qualitätsüberprüfung basiert auf einer elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Bestandteile der jeweiligen Probe. Ein in die RNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff wird unter UV-Licht und in Referenz zu einem mitlaufenden Molekulargewichtsstandard detektiert. Der daraus resultierende RIN-Wert (RNA Integrity Number) ist umso höher, je intakter die RNA der jeweiligen Probe ist (Werte zwischen eins und zehn). Für die Analysen wurden nur Proben mit einer RIN > 7 verwendet. So konnte für jedes Krankheitsstadium und jede Hirnregion mit Ausnahme vom Kleinhirn 5 d. p. i. (n = 3) und Kleinhirn terminal (n = 1) aufgrund mangelhafter RIN-Werte je vier aus sieben möglichen Proben ausgewählt werden.

6.2.4 Absolute Quantifizierung von Virusgenomäquivalenten

6.2.4.1 Primer-Design für die Amplifikation viraler Genome

Zur Quantifizierung viraler Genome im DOG4-infizierten Maushirn ist das Primerpaar MP79 und MP80 (Tab. 1) designt worden. Dieses amplifiziert ein 137 Basenpaar (bp) langes Genomfragment des DOG4-Virus. Als Vorlage wurde die Leader- und die sich daran anschließende RABV N-Nukleotidsequenz verwendet. Der zu amplifizierende Genomabschnitt sollte dabei kürzer als 200 bp sein und die Schmelztemperaturen zur Amplifikation höchstens um 1 °C voneinander bei 60 °C abweichen, sodass in der Amplifikationsphase Anlagern der Primer und Elongation gleichzeitig stattfinden können.

Tab. 1: Primer DOG4-Amplikon

Primer	Sequenz und Funktion	Quelle
MP79	ACACCCCTACAATGGATGC, Forward Primer	Preuss, M. A. R., Faber, M.-L., Tan, G. S., Bette, M., Dietzschold, B., Weihe, E. et al. (2009). Intravenous inoculation of a bat-associated rabies virus causes lethal encephalopathy in mice through invasion of the brain via neurosecretory hypothalamic fibers. PLoS pathogens, 5(6), e1000485.
MP80	GGGTTATACAGGGCTTTTTCA Reverse Primer	

6.2.4.2 Reverse Transkription

Vor der Amplifizierung von Genomsequenzen und mRNA muss die aufgereinigte RNA zunächst durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in cDNA (complementary DNA), also einen zum Virusgenom bzw. zur mRNA komplementären Nukleotid-Einzelstrang umgeschrieben werden. Die Durchführung erfolgte mit dem Affinity Script Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben. Als Primer (also zur DNA-Vorlage komplementäre Oligonukleotide als Startpunkt für die DNA-Polymerase) wurden dabei sowohl aus sechs Basen bestehende Random Hexamere eingesetzt, die sich aufgrund ihrer randomisierten Zusammensetzung an passende Stellen auf der gesamte RNA anlagern können, als auch Oligo(dT)s, die spezifisch die Poly-A-Schwänze von mRNA binden. Zusätzlich wurde der Primer MP79 verwendet, der an die Startsequenz des DOG4-Virusgenoms bindet. Durch die Kombination der drei verschiedenen Primer wurde gewährleistet, dass die komplette mRNA inklusive der Virusgenomsequenz umgeschrieben wurde.

Pro Versuchstier, Krankheitsstadium und Hirnregion wurde dreimal 500 ng RNA in 10 µL-Reaktionen zu cDNA umgeschrieben, sodass letztendlich 1500 ng cDNA zur Verfügung standen. Nach Zusammenführung von 1,0 µL Random Hexamer [50 µM], 0,5 µL Oligo(dT) [0,5 µg/µL] und 0,1 µL MP79 [10 µM] wurde diese Lösung zu 5,25 µL RNA, ggf. nach Verdünnung mit ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) gegeben. Zur Anlagerung der Primer wurde im PCR-Cycler PTC-0200 (MJ Research, Waltham, MA, USA) 5 min bei 65 °C inkubiert, dann wieder auf RT abgekühlt. Danach wurden 1,0 µL Affinity Script RT-Buffer [10 x], 1,0 µL DTT [100 mM], 0,4 µL dNTPmix [25 mM], 0,25 µL RNase Inhibitor [40 U/µL] und 0,5 µL Affinity Script Reverse Transkriptase hinzugegeben und die Inkubation zur Amplifikation der cDNA-Sequenzen für 60 min auf 42 °C im PCR-Cycler durchgeführt. Die Reaktion wurde mit Erhitzung auf 70 °C für 15 min und 95 °C für 5 min beendet. Zum Schluss wurden die drei cDNA-Proben zu einem 30 µL cDNA-Aliquot mit insgesamt 1500 ng cDNA und einer Konzentration von 50 ng cDNA/µL gepoolt. Die Aliquots wurden mit 150 µL ddH₂O aufgefüllt und daraus 20 µL-Aliquots hergestellt, die bei -20 °C gelagert wurden. Geringere cDNA-Erzeugnisse stellten die Proben Kleinhirn 5 d. p. i. mit nur n = 3 Tieren und Kleinhirn terminal mit nur n = 1 Tier sowie geringerem RNA-Input von 881,5 ng dar.

6.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, mit der spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden können. Dabei bildet eine hitzestabile DNA-Polymerase nach Denaturierung eines DNA-Doppelstrangs und Anlagerung zweier

Primer an einen DNA-Einzelstrang (cDNA) je einen zur cDNA komplementären DNA-Strang. Durch das Hintereinanderschalten mehrerer Zyklen von Denaturierung der Doppelstränge, Primeranlagerung an die Einzelstränge und Elongation zu neuen Doppelsträngen stehen jedes Mal neue Startpunkte für die DNA-Polymerase zur Verfügung, sodass die Amplifikation ab einem gewissen Zeitpunkt in exponentieller Weise vorstättengeht.

Mittels PCR und Verwendung des PCR Kits KAPA2G (PEQLAB, Erlangen, DE) wurden die DOG4-Templates für die Generierung einer Virusgenom-Standardkurve hergestellt. Dabei wurden 2 µL cDNA vorgelegt und mit 10 µL 2 x KAPA2G (inkludiert DNA-Polymerase, Puffer, dNTPs, MgCl₂ und Stabilisatoren), 1 µL MP 79 [10 µM], 1 µL MP 80 [10 µM] und 6 µL ddH₂O versetzt. Die Inkubation im PCR-Cycler erfolgte nach dem Herstellerschema ‚maximum speed‘ mit anschließendem Abkühlen auf 8 °C (10 min).

6.2.4.4 PCR-Aufreinigung

Die Aufreinigung des PCR-Produkts zu reinen Nukleinsäuren erfolgte mit dem PCR Clean-up Gel Extraction NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren, DE). Das Prinzip der DNA-Aufreinigung beruht auf der DNA-Ausfällung über polare Wechselwirkungen in Verbindung mit Kieselgel (Silica-Membran). Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben mit NT- und NT3-Puffer unter Zentrifugation in Zentrifugenröhrchen gewaschen und die DNA-Bindung in der Membran begünstigt. Danach wurde unter geringem Salzgehalt mit NE-Puffer die gebundene DNA aus der Membran gelöst und als Eluat bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

6.2.4.5 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der DNA-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, die eine Auftrennung der DNA-Fragmente in Abhängigkeit von deren Basenpaarlänge bei gleichzeitigem Mitlaufen eines Molekulargrößenstandards erlaubt. Je kürzer die negativ geladenen DNA-Moleküle sind, desto schneller bewegen sie sich nach Anlegen einer elektrischen Spannung zur positiv geladenen Anode in der Gelmatrix. Durch Zugabe eines in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs lassen sich die Banden dann unter UV-Licht detektieren.

Für PCR-Produkte mit 130 – 200 bp, wie die mit den Primern MP79 und MP80 generierten DOG4-Amplikons, wurde ein 2 %-iges Agarose-Gel als optimales Trägermedium gewählt. Dafür wurde TBE (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer) aus 10,8 g TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), 5,5 g Borsäure, 4 mL 0,5 M EDTA

(Ethyldiamintetraessigsäure) und Auffüllen mit ddH₂O auf 1 L angesetzt. 50 mL TBE wurden mit 1,0 g Agarose versetzt und bis zum vollständigen Lösen unter Schwenken in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Dann wurden 2 µL 1:10-verdünntes GelRed (Thermo Fisher) pro Milliliter Gel hinzugegeben. Nach Abkühlen (circa 10 min) in einem 40 – 50 °C warmen Wasserbad wurde das Gel in einen mit einem Kamm versehenen Gelträger gegossen, der mit seinen Ausbuchtungen die Taschen für die spätere Probenbeladung bildete. Nach etwa 30 min war die Flüssigkeit zu Gel polymerisiert und konnte in die mit TBE befüllte Elektrophoreseapparatur eingesetzt werden. Die Geltaschen wurden mit je 10 µL aufgereinigter PCR-Reaktion und 2 µL 6 x Ladepuffer (zum Absinken auf den Taschenboden) bzw. 5 µL Größenstandard beladen. An die Elektrophoreseapparatur wurde für 1 h eine elektrische Spannung von 100 V angelegt. Danach konnte die Laufstrecke der PCR-Produkte als fluoreszierende Banden im Gel mit dem UV-Photospektrometer Gel Documentation E-Box VX2 (PEQLAB, Erlangen, DE) detektiert werden.

6.2.4.6 Methodik der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Das Verfahren der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), das zur Quantifizierung von Virusgenomäquivalenten (VG) verwendet wurde, kombiniert die Vervielfältigung von Nukleinsäuren einer konventionellen PCR mit einer quantitativen Messung der PCR-Produkte in Echtzeit über Fluoreszenzphotometrie. Dabei werden nach jedem Zyklus Signale des mit den DNA-Strängen interkalierenden fluoreszierenden Farbstoffes SYBR Green (Eurogentec, Lüttich, BEL) gemessen. Da sich das Farbstoffsignal proportional zur DNA-Menge verhält, kann dieses in der exponentiellen Phase quantifiziert werden. Die Werte werden gegen die Zyklusnummer aufgetragen. Der Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Grenzwert überschreitet, kann dann als Cycle Threshold (Ct-Wert) abgelesen werden. Eine anschließende Dissoziationskurve mit langsamer Erhöhung der Temperatur auf 95 °C dient der Denaturierung doppelsträngiger DNA mit einhergehendem Fluoreszenzverlust. Durch den Abgleich mit der spezifischen Schmelztemperatur eines qPCR-Produkts kann eine Abgrenzung von Nebenprodukten wie beispielsweise Primer-Dimeren vorgenommen werden.

6.2.4.7 Erstellung einer Virusgenom-Standardkurve

Zur absoluten Quantifizierung der Viruslast im infizierten Maushirn wurde eine Standardkurve für DOG4-Genome benötigt, mit der die Anzahl neu synthetisierter VG

über den Ct-Wert mit einer bekannten Anzahl an DOG4-Genomäquivalenten bestimmt werden konnte.

Die Standardkurve wurde in einer qPCR mit einer Verdünnungsreihe von DOG4-Amplikons aus aufgereinigten PCR-Reaktionen mit den Primern MP79 und MP80 in sieben aufeinanderfolgenden Log-Stufen generiert. Über die Konzentration der Probe sowie das Gewicht und die Sequenz eines einzelnen Amplikons wurde die Amplikon-Anzahl pro Mikroliter berechnet. Die Konzentration betrug 20,98 ng/μL, das Gewicht der Amplikonsequenz entsprach einem Molekulargewicht von 84.425,08 Da $1,4019 \times 10^{-10}$ ng. Es resultierte eine Amplikon-Anzahl von $1,4965 \times 10^{11}$ Molekülen pro Mikroliter.

Die Verdünnungsreihe wurde in Zehnerschritten mit E.Coli-tRNA (Transport-RNA) MRE 600 (Roche, Basel, CH; Bestell-Nr. 10109541001) hergestellt, sodass DOG4-Genome in sieben Stufen von $10^{7/2}$ μL bis $10^{0/2}$ μL vorlagen. Zur Minimierung von Messfehlern wurde die Verdünnungsreihe zweimal angelegt und jede Verdünnungsstufe als Triplikat unter Standardbedingungen mit dem Takyon Low Rox SYBR 2 x MasterMix blue dTTP qPCR Kit (Eurogentec) amplifiziert und schlussendlich der Mittelwert aus den beiden Mittelwerten der Triplikate errechnet. In den 15 μL-Reaktionen wurden 2 μL der jeweiligen cDNA-Verdünnung und 13 μL MasterMix des Kits Takyon MM, ddH₂O, MP79 [500 nM] und MP80 [500 nM]) miteinander kombiniert. Nach kurzer Zentrifugation wurde im qPCR-Cycler Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies) zunächst die Takyon-Aktivierung bei 95 °C (3 min) initiiert, ehe das Cycling-Programm mit 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung und Primer-Anlagerung bei 95 °C (10 s), Elongation bei 60 °C (60 s) sowie Generierung einer Dissoziationskurve (95 °C (60 s), 55 °C (30 s), 95 °C (30 s)) durchlaufen wurde.

6.2.4.8 Quantifizierung der Proben mittels Standardkurve

Bei der absoluten Quantifizierung von VG wird der Ct-Wert einer cDNA-Probe mit der Standardkurve für das DOG4-Genom abgeglichen. Da nicht auf jeder qPCR-Platte eine Standardkurve mitgeführt werden sollte, wurde jeweils an der gleichen Stelle ein Interplate Calibrator (IPC) mitquantifiziert, von dem ein Aliquot bereits bei der Generierung der Standardkurve mitgeführt wurde. Auf diese Weise konnten die Ct-Werte des aktuellen Laufs an den des Standardkurven-Laufs angeglichen werden. Für die Quantifizierung von VG in den Proben wurden auch hier Triplikate mit je 50 ng in cDNA umgeschriebene RNA und je 500 nM der Primer MP79 und MP80 in Takyon MasterMix (Eurogentec) pro 15 μL-Reaktion verwendet und das gleiche Cycling-Programm wie in 6.2.4.7 gewählt.

6.2.4.9 Auswertung der absoluten Quantifizierung der Virusgenome

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde für die gemessenen Ct-Werte zuerst ein Ausreißer-Test nach Grubb durchgeführt:

$$G = \frac{|x_i - \bar{x}|}{SD}$$

G = kritischer Wert G ; x_i = verdächtiger Wert; \bar{x} = Mittelwert; SD = Standardabweichung

Dabei wurde bei allen Werten die Differenz zu ihren Mittelwerten als Betrag ermittelt und dieser Wert durch die Standardabweichung dividiert. Wenn das Ergebnis größer als 1,15 war, handelte es sich um einen Ausreißer und der Wert wurde bei der weiteren Auswertung nicht weiter berücksichtigt, sondern der Ausreißer durch den Mittelwert der übrigen Werte ersetzt (maximal ein Ausreißer pro Gruppe).

Danach wurden die Mittelwerte aus den zweifach angelegten Triplikaten pro Verdünnungsstufe gebildet, um daraus die Regressionsgerade zu errechnen sowie die Korrelation zwischen dem Ct-Wert und dem Logarithmus der initialen Anzahl an DOG4-Amplikons. Dabei wurde die Anzahl an DOG4-Amplikons gegen den Ct-Wert aufgetragen und folgende Formel verwendet:

$$y = m \cdot x + y$$

m = Steigung; x = log (initiale Anzahl an DOG4-Templates), y = Ct-Wert

Die Standardkurve für DOG4-Genomäquivalente ergab folglich:

$$y = -3,3043 \cdot x + 35,304$$

Der Korrelationskoeffizient R^2 beschreibt die Stärke der linearen Korrelation zwischen dem Ct-Wert und dem dekadischen Logarithmus, wobei 1 das Maximum und 0 das Minimum an Korrelation bedeutet. Dieser beträgt:

$$R^2 = 0,9996$$

Die Effizienz der qPCR-Reaktion wurde über die Steigung der Regressionsgeraden bestimmt:

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

Sie beschreibt insofern die Qualität einer PCR, als dass bei 100 % in jeder Amplifikationsrunde die Amplikonanzahl verdoppelt wird. Dies ist vor allem von den Primern, aber auch von Inhibitoren während der Reaktion abhängig. Hier betrug die Effizienz 100 %:

$$E = 10^{-1/3,3043} = 1,00$$

6.2.5 Relative Quantifizierung von Zielgenen

6.2.5.1 Housekeeping-Gene-Assay

Die quantitativen Veränderungen in der Expression der Zielgene während der DOG4-Infektion wurden über eine relative Quantifizierung gegen nicht infizierte, PBS-inokulierte Mäuse bestimmt. Dabei ist der Bezug auf Gene notwendig, deren Expression sich normalerweise nicht durch äußere Einflüsse verändert, sog. Housekeeping-Gene, die die meist wichtige Gene des Grundstoffwechsels aller Zellen darstellen.

Um die drei besten Gene für die Analysen unter Infektionsbedingungen zu finden, wurden in einer qPCR mithilfe des Mouse Endogenous Control Gene Panel Kit (Tataa Biocenter AB, Göteborg, SWE) Primer von zwölf verschiedenen Housekeeping-Genen an Maushirn-cDNA aus allen Hirnregionen sowohl in DOG4-infizierten als auch in PBS-inokulierten Tieren getestet. Für jeden der zwölf Primer wurden sechzehn 15- μ L-Reaktionen mit einem Input von je 10 ng cDNA durchgeführt. In jedes Well wurde zuerst 6,9 μ L cDNA (10 ng) vorgelegt, ehe 7,5 μ L 2x MasterMix und 0,6 μ L des zu testenden Primerpaares dazugeben wurde. Nach Abdeckung der Wells und kurzer Zentrifugation wurde im qPCR-Cycler (Agilent Technologies) nach Takyon-Aktivierung bei 95 °C (3 min) ein Cycling-Programm aus 40 Zyklen, bestehend aus Denaturierung bei 95 °C (20 s), Primer-Anlagerung bei 60 °C (20 s) und Elongation bei 72 °C (20 s), sowie anschließender Dissoziationskurve (95 °C (60 s), 55 °C (30 s), 95 °C (30 s)) durchlaufen.

Nach Auswertung der Ergebnisse wurden mit Gapdh (Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und Pgk1 (Phosphoglycerat-Kinase 1) zwei Enzyme der Glykolyse sowie mit Actb (Actin-beta) ein Bestandteil des Zytoskeletts als die besten Housekeeping-Gene ausgewählt, da ihre Transkription unter Infektionsbedingungen im Vergleich zur Kontrollgruppe die geringsten Abweichungen aufwies.

6.2.5.2 Primer-Effizienzbestimmung

Nach elektrophoretischer Kontrolle der mit den Primerpaaren für *Adm*, *Crlr*, *Ramp2*, *Ramp3*, *Cldn5*, *Actb*, *Gapdh* und *Pgk1* generierten Amplikons (Tab. 2) wurde die Effizienz der Amplifikation mit den acht Primerpaaren bestimmt. Dazu wurde nach Reverser Transkription von Maushirn-RNA in cDNA mit einer Konzentration von 50 ng cDNA/ μ L eine 1:5-Verdünnungsreihe über fünf Stufen in *E. coli*-tRNA hergestellt, sodass für die 15 μ L-qPCR-Reaktionen die Verdünnungsstufen 100 ng, 20 ng, 4 ng, 0,8 ng, 0,16 ng sowie eine Negativkontrolle angelegt wurden. Nach Vorlage von 1,5 μ L Primer-Mix, 5,0 μ L ddH₂O und 7,5 μ L Takyon MasterMix aus dem Takyon Low Rox SYBR 2 x MasterMix blue dTTP qPCR Kit (Eurogentec) wurde 1 μ L der cDNA-Verdünnung

hinzugegeben. Nach kurzer Zentrifugation wurde das Cycling-Programm aus 6.2.4.7 im qPCR-Cycler (Agilent Technologies) durchlaufen.

Zur Fehlerminimierung wurden die Werte aus drei Läufen gemittelt. Die Gesamtauswertung ergab Effizienzen zwischen 99 und 106 %. Eine Ausnahme stellte das Primerpaar für *Ramp2* mit einer Effizienz von 89 % dar (Tab. 3).

Tab. 2: Primer für relative Quantifizierung

Ziel mRNA	Bezeichnung/ Amplikonlänge	Hersteller/ Katalog-Nr.
<i>Adm</i>	Mm_Admi_1_SG QuantiTect Primer Assay 105 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT00249676
<i>Cldn5</i>	Mm_Cldn5_1_SG QuantiTect Primer Assay 87 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT00254905
<i>Crlr</i>	Mm_Calcr1_1_SG QuantiTect Primer Assay 146 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT00128786
<i>Ramp2</i>	Mm_Ramp2_1_SG QuantiTect Primer Assay 150 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT00161056
<i>Ramp3</i>	Mm_Ramp3_1_SG QuantiTect Primer Assay 74 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT00118657
<i>Actb</i>	Mm_Actb_2_SG QuantiTect Primer Assay 77 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT01136772
<i>Gapdh</i>	Mm_Gapdh_3_SG QuantiTect Primer Assay 144 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT01658692
<i>Pgk1</i>	Mm_Pgk1_2_SG QuantiTect Primer Assay 116 bp	Qiagen (Hilden, DE) QT01780331

Abkürzungen: Actb, Actin beta; Adm, Adrenomedullin; Cldn5, Claudin 5; Crlr, Calcitonin receptor-like receptor; Gapdh, Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Pgk1, Phosphoglycerat-Kinase 1; Ramp, Receptor activity-modifying protein.

Tab. 3: Primer-Effizienz

Primerpaar für	Regressionsgerade	R ²	Effizienz
<i>Adm</i>	$y = -3,2591x + 30,391$	0,9970	103 %
<i>Crlr</i>	$y = -3,2095x + 28,824$	0,9971	105 %
<i>Ramp2</i>	$y = -3,6196x + 33,586$	0,9949	89 %
<i>Ramp3</i>	$y = -3,2646x + 27,043$	0,9995	102 %
<i>Cldn5</i>	$y = -3,353x + 26,027$	0,9984	99 %
<i>Actb</i>	$y = -3,3375x + 20,875$	0,9999	99 %
<i>Gapdh</i>	$y = -3,2851x + 19,795$	0,9990	102 %
<i>Pgk1</i>	$y = -3,2748x + 22,830$	0,9984	102 %

Abkürzungen: Actb, Actin beta; Adm, Adrenomedullin; Cldn5, Claudin 5; Crlr, Calcitonin receptor-like receptor; Gapdh, Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; Pgk1, Phosphoglycerat-Kinase 1; Ramp, Receptor activity-modifying protein; R² = Korrelationskoeffizient.

6.2.5.3 Quantifizierung der Zieltranskripte mittels qPCR

Die Expression von *Adm*, *Crlr*, *Ramp2*, *Ramp3* und *Cldn5* wurde auf mRNA-Ebene mit einer qPCR relativ zu der oben aufgeführten Housekeeping Gene quantifiziert. Jedes Zieltranskript wurde je Hirnregion (Cortex, Kleinhirn, Hirnstamm und Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex) und Krankheitsstadium (5 d. p. i., Score 2, terminal und PBS) in vier biologischen Replikaten und als technisches Triplikat amplifiziert. Ausnahmen waren die Kategorien Kleinhirn 5 d. p. i. mit $n = 3$ und Kleinhirn terminal mit $n = 1$ biologischen Replikaten aufgrund mangelhafter RNA-Qualität. Außerdem wurden Negativ-Kontrollen und ein IPC vorgesehen, der es ermöglichte, Abweichungen zwischen den verschiedenen qPCR-Läufen anzupassen. Es wurden 15- μ L Reaktion angesetzt, indem Takyon MasterMix (Eurogentec) und der entsprechende Primer-Mix mit einer finalen Konzentration von 300 nM (MP79/MP80) bzw. 1x (10xPrimer Assays (Qiagen)) vorgelegt und dann jeweils 50 ng in cDNA umgeschriebene RNA hinzugegeben wurde. Es wurde das Cycling-Programm aus 6.2.4.7 im qPCR-Cycler (Agilent Technologies) durchlaufen.

6.2.5.4 Auswertung der relativen Quantifizierung der Zieltranskripte

Für die relative Quantifizierung von *Adm*, *Ramp2*, *Ramp3*, *Crlr* und *Cldn5* der in der qPCR gewonnenen Daten wurden die zugrundeliegenden Prinzipien und Berechnungen nach Vandesompele angewandt [198]: Aus den Ct-Werten der drei Referenztranskripte wurde für jede cDNA-Probe das geometrische Mittel als Normalisierungsfaktor NF gebildet. Der RQ-Wert (Veränderungsfaktor im Vergleich zum Calibrator) wurde für jede cDNA-Probe unter Einbeziehung der Primer-Effizienz E über die Formel

$$RQ = E^{(\emptyset Cq - CqP)}$$

RQ = Relative Quantifizierung; E = Effizienz; $\emptyset Cq$ = Mittelwert der Ct-Werte der biologischen Replikate; CqP = crossing point (Ct-Wert der jeweiligen Probe)

berechnet und dann nach Division durch NF normalisiert. Nach Normalisierung wurde die Expression der Zieltranskripte zu der in der PBS-inokulierten Gruppe in Relation gesetzt. Zur Ermittlung von Unterschieden bei der Expression der Zieltranskripte zwischen den Gruppen wurde zunächst auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Varianzhomogenität nach Brown-Forsythe getestet. Dann folgte die Varianzanalyse mit zweifaktorieller ANOVA und der entsprechende Posttest nach Tukey bzw. Dunnett.

6.2.5.5 Korrelationsanalyse der relativ quantifizierten Zieltranskripte (*Adm*, *Ramp2* und *Ramp3*) mit *Cldn5* bzw. Virusgenomäquivalenten

Es wurde eine Korrelationsanalyse für die relativ quantifizierten mRNA-Transkripte (NRQ; normalisierte relative Mengen) von *Adm*, *Ramp2* und *Ramp3* mit der Anzahl an VG bzw. mit *Cldn5* durchgeführt. Dafür wurden zunächst die Daten der gleichen RNA-Proben gepaart und mit der ROUT-Methode Ausreißer detektiert und ausgeschlossen. Dabei wurden die Parameter so gewählt (Q = 1 %), dass diese mit 99 %-iger Sicherheit wirklich Ausreißer sind [145]. Anschließend wurde die Normalverteilung der bereinigten und logarithmisch transformierten Daten mit dem D'Agostino und Pearson-Test bestätigt. Das Maß des Zusammenhangs wurde mit dem Pearson-Korrelationskoeffizienten R^2 angegeben:

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2]}}$$

r = Korrelationskoeffizient; x_i, y_i = Werte der Variablen x bzw. y; \bar{x}, \bar{y} = arithmetisches Mittel aller Werte von x bzw. y.

6.3 Histologische und immunhistochemische Methoden

6.3.1 Silanisierung der Objektträger

Vor Verwendung von Objektträgern wurden diese mit Silanverbindungen beschichtet, was die Haftung von Gewebeschnitten auf Glas optimiert. Dabei wurden die Objektträger in mit Spülmittel versetztem Leitungswasser 1 h gewaschen, dann das Spülmittel durch mehrmaliges Waschen mit heißem und demineralisiertem Wasser entfernt. Nach 45-minütigem Waschen mit 70 %-igem Isopropanol wurden die Objektträger über Nacht trocknen gelassen. Daraufhin erfolgte die Beschichtung mit TESAP (3-(Triethoxysilyl)propylamin)) durch Eintauchen in 2-%-iges TESAP in Aceton (30 s), zweimal in reines Aceton (30 s) und zweimal in demineralisiertes Wasser (5 min). Abschließend wurden die Objektträger für 2 – 3 h im 42 °C warmen Inkubationsschrank Heraeus Function Line (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) getrocknet.

6.3.2 Gewebeschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Hirne wurden am Mikrotom HM325 (Thermo Fisher) frontal in 7 µm-dicke Scheiben geschnitten. Je vier aufeinanderfolgende Schnitte wurden bis zur vollständigen Entfaltung und Glättung auf einer 42 °C warmen Wasseroberfläche aus zuvor entgastem Analysewasser im Auffangbecken belassen. Anschließend wurden diese auf einen silanisierten Objektträger aufgezogen und zum Trocknen für mindestens

1 h auf eine 40 °C warme Heizplatte (Medax, Neumünster, DE) gelegt. Über Nacht wurde im Inkubationsschrank (Thermo Electron Corporation) bei 60 °C die endgültige Trocknung und Anhaftung des Gewebes auf dem Objektträger erzielt. Für die Anfertigung von Übersichtsfärbungen erhielten jeder erste und zehnte Objektträger einer Schnittserie immer nur einen Gewebeschnitt.

6.3.3 Auswahl relevanter Bereiche im Maushirn

Als Grundlage für die exakte Lokalisation der zu untersuchenden Hirnbereiche dient der Maushirn-Atlas ‚The Mouse brain in stereotaxic coordinates‘ [155]. Im Motorcortex steht der M1-Bereich in den Bereichen nach Bregma 0,02 mm – -0,94 mm bzw. Interaural 3,82 mm – 2,86 mm im Fokus der Analyse, da dort die Neurone für die motorische Versorgung des M. gastrocnemius lokalisiert sind und über deren Axone das RABV bei der i. m.-Inokulation und Infektion der α -Motoneurone des Rückenmarks direkten Zugang ins ZNS erhält [6, 123]. Darüber hinaus dient innerhalb dieser Ebenen der S2-Bereich (sensorischer Assoziationscortex) als Negativkontrolle. Im Kleinhirn sollen die Bereiche nach Bregma -5,88 mm – -6,48 mm bzw. Interaural -2,08 mm – -2,68 mm untersucht werden, in denen die Kerngebiete des Kleinhirns – unterteilt in laterales, intermediäres und mediales Kerngebiet – liegen. Außerdem wurde der Bereich ‚4&5Cb‘ der Kleinhirnrinde als Region für die Untersuchungen im Kleinhirn festgelegt (Abb. 3, 4).

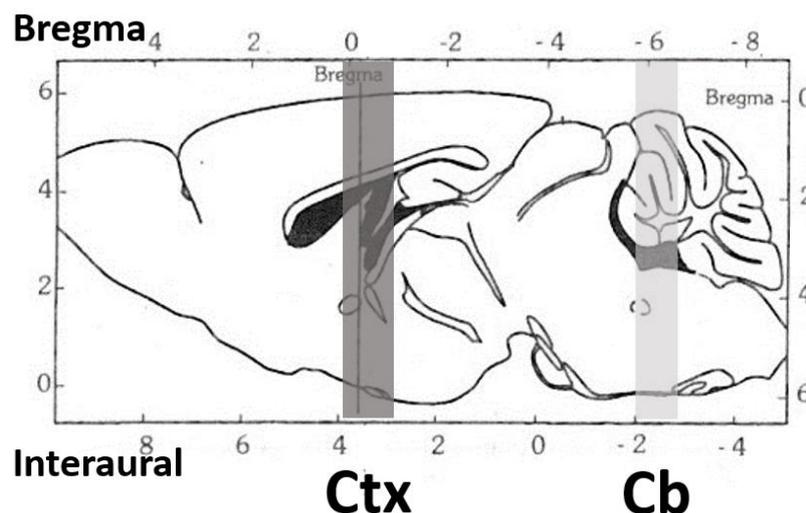


Abb. 3: Überblick über die relevanten Maushirn-Ebenen.

Das Maushirn ist sagittal angeschnitten. Die dunkelgraue Bande zeigt die relevanten Ebenen im Ctx (Bregma 0,02 mm – -0,94 mm bzw. Interaural 3,82 mm – 2,86), die hellgraue Bande die relevanten Ebenen im Cb (Bregma -5,88 mm – -6,48 mm bzw. Interaural -2,08 mm – -2,68 mm). Basierend auf [149].

Abkürzungen: Cb, Cerebellum/Kleinhirn; Ctx, Cortex.

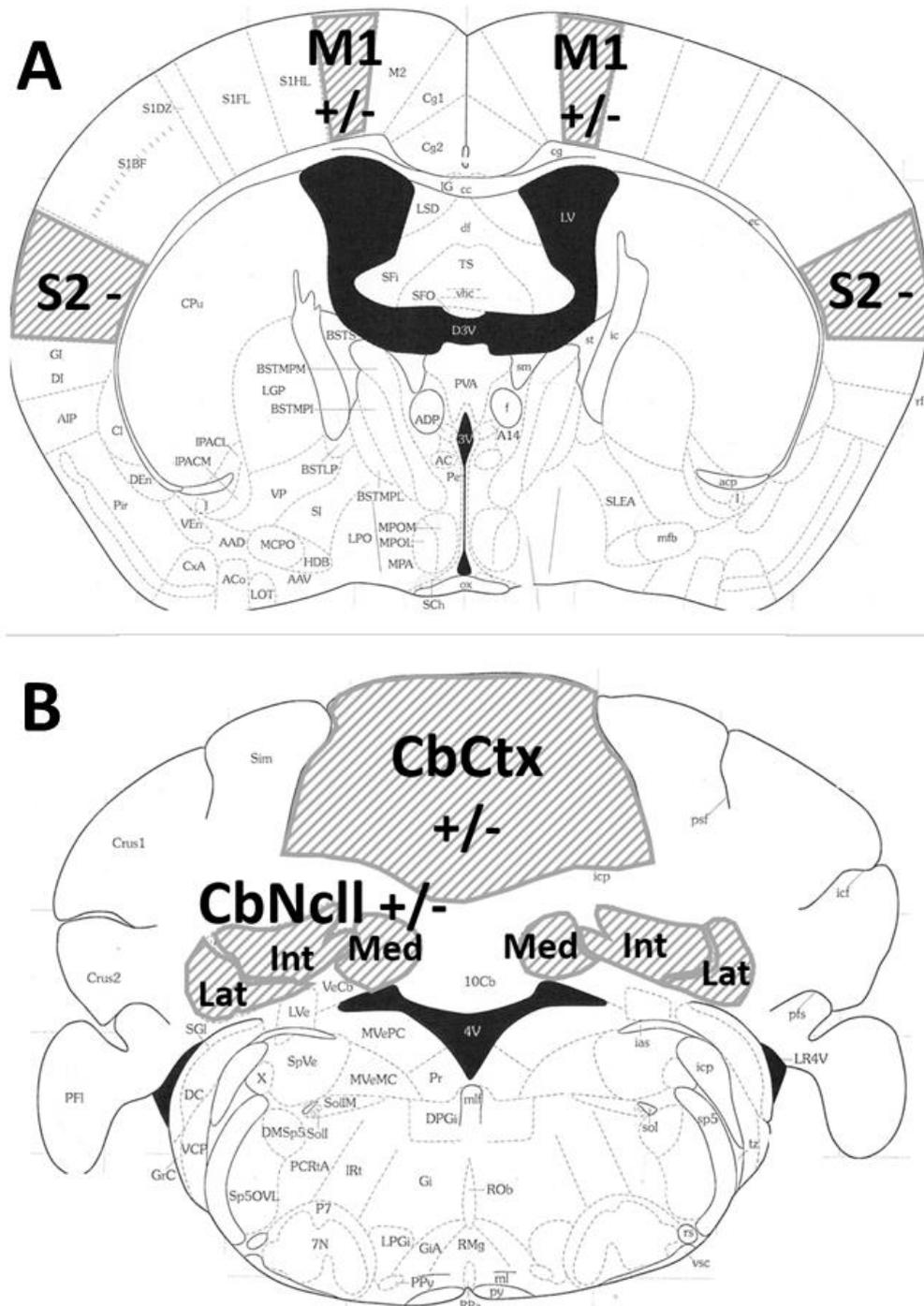


Abb. 4: Relevante Bereiche im Cortex und Kleinhirn.

A Relevante Bereiche im Ctx: Das Maushirn ist frontal angeschnitten. +, RABV-positive Bereiche; -, RABV-negative Bereiche. Aus dem M1-Bereich projizieren die dort lokalisierten Neurone ihre Axone zu Motoneuronen des Rückenmarks, die den M. gastrocnemius innervieren und nach i. m.-Inokulation als Eintrittspforte des RABV dienen. Der S2-Bereich dient als Negativkontrolle, da dort immunhistochemisch kein RABV nachgewiesen werden konnte. **B** Relevante Bereiche im Cb: Das Maushirn ist frontal angeschnitten. +, RABV-positive Bereiche; -, RABV-negative Bereiche. Im Cb sind in den Bregma-Ebenen -5,88 mm – -6,48 mm je nach Ebene zwei bis drei Kerngebiete (Lat, Int, Med) vorhanden. Die Region ,4&5Cb' der CbCtx wird ebenfalls untersucht. In all den relevanten Bereichen können sowohl RABV-positive als auch -negative Bereiche liegen, was bei der späteren Auswertung genauer differenziert wurde. Basierend auf [149].

Abkürzungen: Cb, Cerebellum/Kleinhirn; CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkerne; Ctx, Cortex; Int, Intermediäres Kerngebiet; Med, Mediales Kerngebiet; Lat, Laterales Kerngebiet; RABV, Rabiesvirus.

6.3.4 Übersichtsfärbung zur Fotolokalisierung

Es wurden Giemsa-Übersichtsfärbungen angefertigt, um die Maushirnschnitte mit dem Maushirn-Atlas der entsprechenden Ebene zuordnen zu können. Die Giemsa-Färbung basiert auf einer Azur-Eosin-Methylenblau-Farbstoffkombination und stellt Zellkerne blau und Fasern pink-violett dar. Die Giemsa-Lösung wurde angesetzt, indem 20 mL der Stammlösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE) in 180 mL Analyse-Wasser filtriert wurden (1:10-Verdünnung). Essigsäure-Wasser wurde durch Zugabe von 4 – 5 Tropfen konzentrierter Essigsäure in 200 mL Analyse-Wasser hergestellt und diente der Rottendifferenzierung, Blautöne wurden in 96 %-igem Isopropanol differenziert. Die Entparaffinierung wurde durch Überführen der Schnitte in Xylol (2 x 5 min) und die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (100 % für 2 x 5 min, 96 %, 90 %, 80 % und 70 % Isopropanol für 5 min) bis ins Analyse-Wasser (5 min) gewährleistet. Daraufhin folgte die Färbung in Giemsa-Lösung für 60 min, ehe die Farbton-Differenzierung in Essigsäure-Wasser für 30 s erfolgte. Nach Dehydrierung in 96 % Isopropanol für 30 s und dreimal in 100 % Isopropanol (30 s, 2 min, 5 min) mit anschließender Überführung in Xylol (3 x 5 min), wurden die gefärbten Schnitte mit Depex eingedeckelt und mehrere Tage aushärten gelassen.

6.3.5 Immunhistochemische DAB/Nickel-Färbung

Mithilfe von IHC-Färbungen lassen sich protonierte Zielstrukturen qualitativ im Gewebe nachweisen. Dabei wird nach dem ABC-System ein spezifischer Antikörper auf den Gewebeschnitt gegeben, der eine Zielstruktur (Antigen) bindet. Dann lässt man einen gegen die Herkunftspezies der Primärantikörper gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper aus einer anderen Spezies an den Primärantikörper binden. Schließlich wird durch die Kopplung einer im Komplex mit Avidin vorliegenden biotinylierten Peroxidase an den Sekundärantikörper das zunächst farblose DAB (Diaminobenzidin) am Sekundärantikörper oxidieren, was durch die Präsenz von Nickel als schwarzes Signal auf dem Gewebe sichtbar wird.

Nach Entparaffinierung der Schnitte in Xylol (dreimal) und in 100 %-igem Isopropanol für je 10 min erfolgte die Deaktivierung der endogenen Gewebe-Peroxidasen durch Inkubation in einer 0,15 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung in 100 %-igem Methanol für 30 min. Danach wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100 % Isopropanol (10 min), 96 %, 80 % und 70 % Isopropanol (je 5 min) und Waschen der Objektträger in Analyse-Wasser (2 x 5 min) rehydriert. Dann wurden die Schnitte in Natriumcitratpuffer (pH 6), der zuvor aus 54 mL Zitronensäure (0,1 M), 246 mL Natriumcitrat (0,1 M) und 2700 mL Analyse-Wasser hergestellt und einmal aufgekocht

wurde, bei 92 – 95 °C für 10 min gekocht. Dieser Schritt dient der Denaturierung von Proteinen und Zellbestandteilen. Prinzipiell werden dadurch Antigene demaskiert, die zuvor während der Fixierung möglicherweise miteinander Quervernetzungen ausbildeten, und Antikörperbindungsstellen freigegeben. Die Objektträger wurden anschließend trockengesaugt und die einzelnen Schnitte mit einem PAP-Pen umkreist, was eine wasserabweisende Barriere schafft, um aufgetropfte Reagenzien nur auf dem entsprechenden Schnitt einwirken zu lassen. Die Objektträger wurden in 5 %-igem BSA/PBS (Bovines Serumalbumin in 50 mM PBS-Puffer) für 30 min bei RT in einer Standkuvette zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf Gewebe und Glas inkubiert, dann für 5 min in 1 %-iges BSA/PBS bei RT überführt. PBS wurde zuvor aus 6,55 g NaH_2PO_4 (9,5 mM), 36,05 g Na_2HPO_4 (40,5 mM) und 45,00 g NaCl (153 mM) hergestellt. Den Salzen wurde 4,5 L Analyse-Wasser zugegeben, alle Bestandteile auf dem Magnetrührer gelöst und der pH 7,45 durch Zugabe einiger Tropfen konzentrierter NaOH hergestellt, bevor mit Analyse-Wasser auf 5 L aufgefüllt wurde. Der darauffolgende Avidin-Biotin-Block mit dem Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) dient der Absättigung des im Gewebe in großen Mengen vorhandenen endogenen Biotins, was beim späteren Einsatz biotinylierter Peroxidase im Komplex mit Streptavidin für unspezifische Bindungen sorgen würde. Dafür wurde 30 %-iges Avidin in PBS auf die Schnitte getropft und diese für 20 min bei RT in feuchten Kammern (mit Analyse-Wasser befeuchtet zum Schutz vor Austrocknung der Schnitte und Verdunstung der Reagenzienlösungen) inkubiert. Nach Abspülen der Objektträger mit Analyse-Wasser wurden die Objektträger wieder in 1 %-iges BSA/PBS überführt, was ein Austrocknen der Schnitte verhindert und zum leichteren Auftragen von Lösungen deren Oberflächenspannung herabsetzt. Als nächstes wurde 30 %-iges Biotin (in 1 %-igem BSA/PBS) aufgetragen und in den feuchten Kammern für 20 min bei RT inkubiert, was zur Bindung von Biotin an eventuell aus dem vorhergehenden Schritt noch vorhandenem Avidin führte und dieses neutralisierte. Nach Überführen der Objektträger in Analyse-Wasser und danach in 1 %-iges BSA/PBS wurden die Primärantikörper (Tab. 4) in Arbeitsverdünnung (verdünnt in frischem 1 %-igem BSA/PBS) aufgetropft und die Objektträger in den feuchten Kammern über Nacht bei 16 °C und anschließend 2 h bei 37 °C im Inkubator KB-53 (WTC Binder Labortechnik, Reiskirchen, DE) inkubiert. Nach Abspülen der Primärantikörper mit Analyse-Wasser wurden die Schnitte in Analyse-Wasser (3 x 5 min) und PBS (10 min) gewaschen und in 0,5 %-iges BSA/PBS überführt. Dann wurden die biotinylierten Sekundärantikörper (Tab. 5) in Arbeitsverdünnung (in 1 %-igem BSA/PBS) aufgetropft und für 45 min bei 37 °C in den feuchten Kammern inkubiert. Die Sekundärantikörper richteten sich jeweils gegen die Donorspezies des Primärantikörpers. Nach erneuten Waschschr

die Behandlung mit dem AB-Komplex Vectastain Elite ABC-Kit (Vector Laboratories), der Avidin und biotinmarkierte Peroxidase in einem Komplex vereint und der an den biotinylierten Sekundärantikörper binden kann. Dieser weist mehrere Biotine auf, was zu einer Signalverstärkung führt. Je Milliliter 1 %-iges BSA/PBS wurden 20 µL der Lösung A und 20 µL der Lösung B gegeben und der Ansatz 30 min bei RT vorinkubiert, sodass nach dem stöchiometrischem Verhältnis der beiden Komponenten möglichst drei der vier Bindungsstellen am Avidin mit biotinylierter Peroxidase besetzt wurden und noch eine Bindungsstelle frei blieb, die dann mit dem biotinylierten Sekundärantikörper interagieren konnte. Es schlossen sich die Inkubation der Schnitte in den feuchten Kammern bei 37 °C für 30 min und erneut die Waschschrte an. Im nächsten Schritt wurde die DAB/Nickel-Färbung durchgeführt: Zunächst wurden 100 mg DAB und 600 mg Nickel unter Rühren zu 800 mL PBS gegeben. Nach Filtration der DAB/Nickel-Lösung in ein lichtgeschütztes Gefäß wurden die Objektträger unter ständigem Rühren in die Lösung gegeben und 5 min vorinkubiert. Die Zugabe von 112 µL Wasserstoffperoxid startete die Farbreaktion. Nach achtminütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Überführung der Objektträger in Analyse-Wasser gestoppt und die Objektträger in Analyse-Wasser (3 x 5 min) gewaschen. Um eine bessere Zuordnung der Signale zu verschiedenen Hirnstrukturen zu schaffen, wurden die Schnitte mit Methylgrün gegengefärbt, was die Zellkerne in einem leichten Grünton hervorhebt. Dazu wurden die Schnitte mit der Methylgrün-Arbeitslösung betropft und nach 4 min mit demineralisiertem Wasser für ca. 30 s abgespült. Es folgte eine Entwässerung in 100 %-igem Isopropanol (5 min) und Xylol (3 x 5 min). Die Schnitte wurden mit Depex eingedeckelt und mehrere Tage bei RT aushärten gelassen.

Tab. 4: Primärantikörper für IHC DAB/Nickel- und Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Ziel des Primär-AK	Erläuterung	Donor-spezies	Arbeits-ver-dünnung	Hersteller/ Katalog-Nr.
ADM	Adrenomedullin	rb	1 : 250 (DAB, DF)	Cloud-Clone Corporation (Houston, TX, USA)/ PAA220Mu01
ALB	Albumin, Serumeiweiß, Marker für interzellulären Transport	rb	1 : 8000 (DAB, DF)	Dako (Glostrup, DNK)/ A001
CALB1	Calbinin, Purkinje-Zell- Marker	ms	1 : 300 (DF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)/ C9848
CD3	Cluster of Differentiation 3 (T-Zell-Marker)	rb	1 : 2500 (DAB)	Dako (Glostrup, DNK)/ A452
CLDN5	Claudin 5, Bestandteil von Tight Junctions	rb	1 : 10 (DF)	Bioss Antibodies (Woburn, MA, USA)/ bs-1553R
GFAP	Saures Gliafaser-Protein (Glial fibrillary acidic protein), Astrozyten-Marker	gp	1 : 300 (DF)	Progen (Heidelberg, DE)/ GP 52
ICAM1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (Intercellular adhesion molecule) 1, Marker für aktivierte Endothelzellen	gt	1 : 100 (DAB, DF)	R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)/ AF796
RAMP2	Korezeptor für ADM (Receptor Activity- modifying protein) 2	rb	1 : 1000 (DAB, DF)	Bioss Antibodies (Woburn, MA, USA)/ bs-11971R
RNMAS	RABV-Nukleoprotein	ms	1 : 250 (DF)	Dietzschold, Thomas Jefferson University Philadelphia, PA, USA
RNP	RABV Ribonukleoprotein- Komplex	rb	1 : 3000 (DAB)	Dietzschold, Thomas Jefferson University Philadelphia, PA, USA
VGLUT1	Vesikulärer Glutamattransporter (Vesicular glutamate transporter) 1, pBNPI, Marker für glutamaterge Präsynapsen, Körnerzell- Marker	gp	1 : 600 (DF)	Jeff Erickson (New Orleans, LA, USA)
VGLUT2	Vesikulärer Glutamattransporter (Vesicular glutamate transporter) 2, DNPI, Marker für glutamaterge Präsynapsen, Kleinhirnkerngebiet-Marker	gp	1 : 600 (DF)	Jeff Erickson (New Orleans, LA, USA)

Abkürzungen: AK, Antikörper; DAB, IHC DAB/Nickel-Färbung; DF, Doppelimmunfluoreszenzfärbung, gp, Meerschweinchen; gt, Ziege; ms, Maus; RABV, Rabiesvirus; rb, Kaninchen.

Tab. 5: Biotinylierte Sekundärantikörper für IHC DAB/Nickel- und Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Biotinylierte Sekundärantikörper	Donor-spezies	Arbeits-verdünnung	Hersteller/ Katalog-Nr.
do-anti-gp-IgG	do	1 : 200	Dianova (Hamburg, DE)/ 706-065-148
do-anti-gt-IgG	do	1 : 200	Dianova (Hamburg, DE)/ 705-065-147
do-anti-ms-IgG	do	1 : 200	Dianova (Hamburg, DE)/ 715-065-151
do-anti-rb-IgG	do	1 : 200	Dianova (Hamburg, DE)/ 711-065-152

Abkürzungen: do, Esel; gp, Meerschweinchen; gt, Ziege; ms, Maus; rb, Kaninchen.

6.3.6 Immunfluoreszenzfärbung gegen zwei Antigene

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen zwei Antigene in Kombination mit der Verwendung von zwei Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht eine Komarkierung von zwei Antigenen je Gewebeschnitt, sodass eine bessere Zuordnung eines gesuchten Antigens zu bestimmten Zelltypen oder Strukturen getroffen werden kann.

Die Methode wies bis zum Auftropfen des Primärantikörpers (Tab. 4) das gleiche Vorgehen wie die Einfachmarkierung in der IHC DAB/Nickel-Färbung auf. Die Inkubation erfolgte hierbei allerdings direkt mit zwei Primärantikörpern pro Gewebeschnitt, die zuvor als Mix in Arbeitsverdünnungen zusammenpipettiert wurden. Dabei ist es wichtig, dass die zwei verwendeten Primärantikörper aus zwei verschiedenen Donorspezies stammen, sodass nachfolgend der eine Primärantikörper mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Tab. 5) und der andere Primärantikörper mit einem direktmarkierten Cy3-Sekundärantikörper (Tab. 6) detektiert werden kann.

Nach Auftragen der Primärantikörper auf die Schnitte wurden diese über Nacht bei 16 °C und am nächsten Morgen nach automatischem Aufheizen des Inkubators KB-53 (WTC Binder Labortechnik) bei 37 °C für 2 h inkubiert. Nach den Waschschritten (s. o.) und Überführung in 0,5 %-iges BSA/PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper für Antigen 1 in einer 1:200-Arbeitsverdünnung aufgetragen und die Schnitte 45 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten wieder Waschschrritte und ein zusätzlicher Inkubationsschritt. Bei diesem wurden die Schnitte mit einem Mix aus fluoreszenzmarkiertem Streptavidin Alexa Fluor A488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; Bestell-Nr. S11223), das an die gegen Antigen 1 gerichteten biotinylierten Sekundärantikörper bindet, und direktmarkiertem Sekundärantikörper (Cy3) für die Bindung an den gegen das Antigen 2 gerichteten Primärantikörper, je in einer 1:200-Arbeitsverdünnung, versehen und die Schnitte für 2 h bei 37 °C inkubiert. Das fluoreszenzmarkierte Streptavidin bindet an den biotinylierten Sekundärantikörper, sodass dieser durch ein grün-fluoreszierendes Signal detektierbar wird. Der direktmarkierte Sekundärantikörper, der nun gegen die

Donorspezies des zweiten Primärantikörpers gerichtet ist, zeigt ein rot-fluoreszierendes Signal unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Dann wurden die Schnitte noch einmal gewaschen und mit FluorCare Roti-Mount Reagenz eingedeckelt. Die Aushärtung und Lagerung erfolgte bei RT unter lichtgeschützten Bedingungen.

Tab. 6: Direktmarkierte Sekundärantikörper (Cy3) für Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Cy3-konjugierter Sekundärantikörper	Donor-spezies	Arbeits-verdünnung	Hersteller/ Katalog-Nr.
do-anti-gp-IgG	do	1:200	Dianova (Hamburg, DE)/ 706-165-148
do-anti-gt-IgG	do	1:200	Dianova (Hamburg, DE)/ 706-165-147
do-anti-ms-IgG	do	1:200	Dianova (Hamburg, DE)/ 715-165-151
do-anti-rb-IgG	do	1:200	Dianova (Hamburg, DE)/ 711-165-152

Abkürzungen: do, Esel; gp, Meerschweinchen; gt, Ziege; ms, Maus; rb, Kaninchen.

6.3.7 Tyramid-Verstärkung

Die Signal-Verstärkung nach der Tyramid-Methode wurde mit dem Tyramid Signal Amplification (TSA)-Kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) bei der Färbung des anti-RAMP2-Antikörpers durchgeführt, da Testfärbungen kaum erkennbare Signale bei starker unspezifischer Hintergrundfärbung zeigten. Das Prinzip der Methode basiert auf der Katalyse eines Peroxidase-markierten Antikörpers, der an den Antigenen fluorochromiertes Tyramid akkumuliert und damit zur Signalverstärkung führt. Damit konnte die Antikörper-Arbeitsverdünnung um ein Vielfaches verdünnt, unspezifische Hintergrundfärbung deutlich schwächer und schwache Signale stärker zum Vorschein gebracht werden.

Die Tyramid-Verstärkung schloss sich im Protokollablauf der IHC DAB/Nickel- bzw. Doppelimmunfluoreszenzfärbung nach Inkubation mit dem AB-Komplex an. Nachdem die Schnitte 5 min in Analyse-Wasser gewaschen wurden, wurden sie in TN-Puffer, angesetzt aus 60 mL NaCl (5 M), 100 mL TRIS/HCl (2 M) und 1840 mL Analyse-Wasser, 3 x 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit biotinyliertem Tyramid (zuvor mit TN-Puffer zu einer 1:50-Arbeitslösung verdünnt) für 10 min bei RT. Nach erneutem Waschen in TN-Puffer (2 x 5 min), Analyse-Wasser (5 min) und PBS (10 min) sowie Überführen der Schnitte in 0,5 %-iges BSA/PBS schloss sich eine erneute Inkubation mit dem zuvor 30 min bei RT vorinkubierten AB-Komplex an. Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll der IHC DAB/Nickel- bzw. Doppelimmunfluoreszenzfärbung.

6.3.8 Proteinase K-Verdau

Zur weiteren Optimierung der RAMP2-Färbung wurden diese Schnitte zusätzlich einem leichten Proteinase K-Verdau unterzogen. Proteinase K baut Proteine jeglicher Form ab und kann dadurch die Zugänglichkeit von Antigenen im Gewebe für ihre Antikörper verbessern.

Der Verdau wurde unmittelbar an die Antigendemaskierung in Natriumcitratpuffer angeschlossen. Nach Herstellung des 10 x Proteinase K-Puffers (1 M TRIS/ 0,5 M EDTA) durch Lösen von 242,2 g TRIS in 800 mL Analyse-Wasser und Zugabe von 324,24 g EDTA sowie Auffüllen mit Analyse-Wasser auf 1600 mL wurde auf pH 8 mit 37 %-iger Salzsäure eingestellt. Die Lösung wurde auf 2 L aufgefüllt, filtriert und zu 50 mL-Aliquots bei -20 °C gelagert. Aus 50 mL Proteinase K-Puffer, 500 µL Proteinase K-Stocklösung (10 mg/mL) und 449,5 mL Analyse-Wasser wurde die Proteinase K-Arbeitslösung (10 µg/mL) angesetzt, die nach Waschen der Schnitte in Analyse-Wasser (10 min) auf die Schnitte pipettiert wurde. Nachdem die Objektträger für 5 min auf eine 37 °C warme Heizplatte gelegt wurden, wurde die Reaktion nach Spülen in PBS durch eine 5-minütige Inkubation in 0,2 %-igem Glycin (1 g Glycin in 500 mL PBS) gestoppt und nochmals in PBS gewaschen (5 min). Anschließend erfolgte die Nachfixierung mittels Inkubation in 4 %-igem Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C (10 min). Die PFA-Lösung wurde angesetzt, indem 60 g 100 %-iges PFA in 750 mL PBS auf einem Heizplattenrührer auf 50 – 55 °C erwärmt und unter Rühren tropfenweise konzentriertes NaOH hinzugegeben wurde, bis die Lösung klar war, bevor auf 1,5 L mit PBS aufgefüllt wurde, das Gefäß mit Parafilm verschlossen und in einem kalten Wasserbad abgekühlt wurde. Mit konzentrierter Salzsäure wurde auf pH 7,3 – 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde filtriert und bei 4 °C gelagert. Zum Schluss wurden die Schnitte in PBS gewaschen (3 x 5 min) und nach dem Protokoll der IHC DAB/Nickel- bzw. Doppelimmunfluoreszenzfärbung weiterverfahren.

6.3.9 Auswertung der IHC und Doppelimmunfluoreszenzfärbungen

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden mit den Mikroskopen Olympus AX70 und Olympus BX53 beurteilt und die ROI (Regions of interest) mit der Kamera Olympus UC90 in 40- bzw. 60-facher Vergrößerung und mit dem Programm cellSens (Olympus Corporation, Tokio, JPN) unter einheitlichen Einstellungen fotografiert.

Von den Färbungen gegen RABV RNP (Ribonukleoprotein) und CD3 (T-Zellmarker) wurden jeweils auch Scans des gesamten Schnitts in 10-facher Vergrößerung mit dem

Scanning Mikroskop Leica Dm6000B (Leica Camera AG, Wetzlar, DE) angefertigt, mit der Kamera Leica DFC310FX fotografiert und eine Farbmarkierung der RABV-Signale in Fiji [172] sowie Markierung der CD3-Signale in Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) vorgenommen, ehe die Bildebene der letzteren Markierung über die RABV RNP-Schnitte gelegt wurde, sodass eine qualitative Analyse der räumlichen Relation beider Antikörper ermöglicht wurde. Eine manuelle Auszählung der CD3⁺ Zellen erfolgte im Übrigen auch nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Komarkierung von ICAM1 zur Kategorisierung in intra-/juxta- und extravasale Zellen.

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde am konfokalen Laser Scanning System C2 (Nikon Corporation, Tokio, JPN) in Verbindung mit einem Inversmikroskop (Eclipse Ti2; Nikon) unter Verwendung eines 60x-Öl-Immersionsobjektivs und dem Programm NIS-Elements AR 4.30.01 (Nikon) unter standardisierten Einstellungen gescannt.

Die Gewinnung der Bildinformationen erfolgte für beide Färbemethoden mit Fiji und Photoshop, indem die qualitativen und quantitativen Informationen der Antikörper-Signale (z. B. Flächen, räumliche Nähe zu Nachbarstrukturen, Grauwerte) unter anderem mit programmierten Macros (siehe Anhang 12.1) je nach Fragestellung generiert wurden. Die statistische Auswertung und Aufarbeitung der Rohdaten erfolgte dann in Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) und Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Nach Berechnung der Mittelwerte und des Standardfehlers (SEM, standard error of the mean)

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

(SD = Standardabweichung der Messwerte; n = Anzahl der Stichproben)

zur Analyse der Streuung der Mittelwerte wurden prinzipiell nach der ROUT-Methode Ausreißer ermittelt und ausgeschlossen. Anschließend wurden die bereinigten Daten mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurde zur Varianzanalyse zwischen den Gruppen eine ordinary ANOVA bzw. bei Varianzheterogenität ein Brown-Forsythe-Test oder alternativ nach F-Test ein ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur (Welch-ANOVA) angeschlossen. Aufgrund der Durchführung multipler Vergleiche zwischen den Gruppen wurde das Signifikanzniveau (p-Wert) entsprechend [92] angepasst.

Im Falle von Varianzhomogenität und signifikanten Abweichungen der Mittelwerte in der ANOVA wurden die Gruppen mit den entsprechenden Posttests für Mehrfachvergleiche paarweise geprüft (nach Tukey, Dunnett bzw. Šídák). Bei Varianzheterogenität wurde ein Dunnett-T3-Posttest angeschlossen.

War der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung bei mindestens einer Gruppe negativ, wurde eine Rangvarianzanalyse nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Bei Signifikanz dieses Tests folgte auch hier der entsprechende Posttest zur Prüfung signifikanter Gruppenunterschiede nach Dunn.

6.4 Materialien

Tab. 7: Reaktions-Kits

Kit	Hersteller/ Katalog-Nr.
Affinity Script Multiple Temperature Reverse Transcriptase Kit	Agilent Technologies (Waldbronn, DE)/ 200436
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)/ SP-2001
KAPA2G Fast 2 x ReadyMix with Dye PCR Kit	PEQLAB (Erlangen, DE)/ 07-KK5101-02
Mouse Endogenous Control Gene Panel Kit	Tataa Biocenter AB (Göteborg, SWE)/ A102
PCR Clean-up Gel Extraction NucleoSpin Extract II Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)/ 740609.250
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden, DE)/ 79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, DE)/ 74106
Takyon Low ROX SYBR 2 x MasterMix blue dTTP qPCR Kit	Eurogentec (Lüttich, BEL)/ UF-LSMT-B0701
TSA Kit	PerkinElmer (Waltham, USA)/ SAT700001EA
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)/ PK-6100

Tab. 8: Geräte

Gerät und Bezeichnung	Hersteller
Bioanalyser Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies (Waldbronn, DE)
Gelelektrophorese Apparatur PEQLAB 40-0708	PEQLAB (Erlangen, DE)
Gelelektrophorese Power Supply EPS 200	Pharmacia Biotech (Uppsala, SWE)
Gewebe-Einbettautomat Tissue-Tek	VOGEL Medizinische Technik und Elektronik (Gießen, DE)
Heizplatte WT-13	Medax (Neumünster, DE)
Induktionskochplatte	Alaska E.k. (Viernheim, DE)
Inkubationsschrank (60 °C und 42 °C) Heraeus Function Line	Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)
Inkubationsschrank (37°C/16°C) KB-53	WTC Binder Labortechnik (Reiskirchen, DE)

Kamera für Nikon-Mikroskop DS-Fi3	Nikon (Tokio, JPN)
Kamera für Olympus-Mikroskope UC90	Olympus (Tokio, JPN)
Kamera für Scanning Mikroskop Leica DFC310FX	Leica Camera AG (Wetzlar, DE)
Konfokalmikroskop (Lasermikroskop) Nikon Eclipse Ti	Nikon (Tokio, JPN)
Laborschüttler Duomax 2030	Heidolph Instruments (Schwabach, DE)
Magnetrührer MR3001	Heidolph Instruments (Schwabach, DE)
Mikroskop (Hellfeld) Olympus AX70 und BX53	Olympus (Tokio, JPN)
Mikrotom (Rotationsmikrotom) Microm HM 325	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Mikrowelle	LG Electronics (Seoul, KOR)
PCR-Cycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research (Waltham, USA)
PCR-Workstation Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB (Erlangen, DE)
pH-Meter FiveEasy	Mettler Toledo (Gießen, DE)
Präzisions-Waage Pioneer PX	Ohaus Corporation (Parsippany, USA)
Real-Time-PCR-Cycler Stratagene Mx3005P	Agilent Technologies (Waldbronn, DE)
Reinstwasseranlage TKA X-CAD	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Scanning Mikroskop Leica Dm6000B	Leica Camera AG (Wetzlar, DE)
Spektrometer Nanodrop 2000c	PEQLAB (Erlangen, DE)
Taumler MAX2030	Heidolph Instruments (Schwabach, DE)
UV-Photospektrometer Gel Documentation E-BOX VX2	PEGLAB (Erlangen, DE)
Vakuumpumpe ME2	Vacuubrand (Wertheim, DE)
Vakuumsauger Miniport	KNF Neuberger (Freiburg, DE)
Vortexer VF2	Janke und Kunkel IKA-Labortechnik (Staufen, DE)
Vortexer für Bioanalyser-Chips IKA MS2	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Waage PT310	Sartorius (Göttingen, DE)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, DE)
Zentrifuge, gekühlt, für Eppendorf-Cups Biofuge fresco	Heraeus GmbH (Hanau, DE)
Zentrifuge für Eppendorf-Cups Heraeus Pico 17	Thermo Electron Corporation (Waltham, USA)
Zentrifuge für qPCR-Platten Perfect Spin P	PEQLAB (Erlangen, DE)

Tab. 9: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/ Katalog-Nr.
Aceton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 7328.2
Agarose	Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, USA)/ 15510-027
Borsäure	KMF Laborchemie Handels GmbH(Lohmar, DE)/ KMF.08-146
BSA (Bovines Serumalbumin, „Albumin Fraktion V“)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 8076.3
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)/ D5637-5G
Dinatriumphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 4984.1
DNA-Leiter (100 bp-Marker) Gene Ruler	Fermentas/ ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)/ SM0241
EDTA 0,5M	VWR Prolabo Chemicals International GmbH (Darmstadt, DE)/ 20296.291
Essigsäure (Eisessig, CH ₃ COOH, wasserfrei)	Merck KGaA (Darmstadt, DE)/ 1.00063.2511
Essigsäure (CH ₃)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 3738.4
Eukitt Quick-hardening mounting medium (Eindeckmedium)	Sigma-Aldrich(St. Louis, USA)/ 03989
FluorCare Roti-Mount (Eindeckmedium für Fluoreszenzmikroskopie)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ HP19.1
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 4979.1
GelRed Nucleic Acid Stain (Biotrend Chemikalien 41003)	Fisher Scientific (Schwerte, DE)/ 10170625
Giemsa-Stammlösung	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ T862.3
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 3908.2
HCl (37 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 4625.1
H ₂ O ₂ (30 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 8070.2
Isofluran	Webster Veterinary Supply, Inc (Devens, USA)/ 1-800-225-7911
Isopropanol (99,5 %)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 9866.4
Kupferacetat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 8625.2
Methanol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 4627.5
Methylgrün-Farbstoff	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 5159.1
NaCl 5 M	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 35256
NaOH	Honeywell Riedel-de Haen AG (Seelze, DE)/ 35256
Natriumcitrat 0,1M (tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 3580.3

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ K300.1
Nickel (Ammonium-Nickel-Sulfat)	Sigma-Aldrich (Schnelldorf, DE)/ 09885-250G
Orange DNA Loading Dye 6x	Fermentas/ ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)/ R0631
Paraffin	Vogel Histo-Comp (Gießen, DE)
PFA	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 0335.1
Pikrinsäure	Merck (Darmstadt, DE)/ 197378
Proteinase K	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 7528.1
RNAlater (RNA-Stabilisator)	ThermoFisher (Waltheim, MA, USA) AM7020
TESAP (3-(Triethoxysilyl)-propylamin zur Synthese)	Merck (Darmstadt, DE)/ 821619
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-HCl 2M	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 4855.2
Xylol (Isomere) > 99 %	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 4436.2
Zitronensäure 0,1M	Merck (Darmstadt, DE)/ 244

Tab. 10: Sonstige Instrumente und Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller/ Katalog-Nr.
Deckgläser 24 x 50 mm	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 1871
Einmalkanülen Sterican (26 G)	B. Braun (Melsungen, DE)/ 4657683
Einmalsonden	Omni International (Marietta, USA)
Faltenfilter, 150 mm Durchmesser	Schleicher und Schuell GmbH (Dassel, DE)/ 311645
Faltenfilter (Whatman)	GE Healthcare Life Sciences (Buckinghamshire, UK)
Färbeküvetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Glaswaren, Laborflaschen, Bechergläser	Schott (Mainz, DE)
Inkubationskammern	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg, DE)
Mikroliterpipetten verschiedener Volumina	Gilson (Middleton, USA), Eppendorf (Hamburg)
Mikro-Reaktionsgefäße (vers. Größen)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)
Objektträger SuperFrost Weiß	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, DE)/ 1879
Omni Tissue Homogenizer mit Soft Tissue Omi Tip Plastic Homogenizing Probes (7 x 110 mm)	Omni International Inc., Kennesaw, GA, USA
Pipettenspitzen (vers. Größen)	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)

Pipettenspitzen (vers. Größen) Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)
Plastikgefäße	VITLAB GmbH (Grossostheim, DE)
Quetschpipetten (Pastette, 3 mL)	Alpha Laboratories Limited (Hampshire, UK)/ LW4111
Super PAP-PEN Liquid Blocker	Science Services GmbH (München, DE)/ N71310-N
Thermometer	IKA Werke GmbH & Co KG (Staufen, DE)
8er Ketten-Abdeckung für PCR-Platten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE)/ 65.1998.400
15 mL-Röhrchen	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, DE)/ 62.554.502
96 Well-PCR-Platten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE)/ 72.1979.102

Tab. 11: Software

Software	Hersteller/ Quelle
cellSens	Olympus Corporation, Tokio, JPN
Fiji	Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T. et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods, 9 (7), 676-682
Microsoft Office, Excel	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
NIS-Elements AR 4.30.01	Nikon, Tokio, JPN
Photoshop	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Prism 9	GraphPad Software, San Diego, CA, USA

7 Ergebnisse

7.1 Expression von *Adm* und seinen Rezeptorkomponenten im Maushirn nach i. m. DOG4-Inokulation

Zunächst stellte sich die Frage, inwiefern sich die Expression von *Adm* und seinen Rezeptorkomponenten *Crlr*, *Ramp2* und *Ramp3* in den verschiedenen Bereichen des RABV-infizierten Hirns und im Vergleich zu Kontrolltieren verhält. Zum Nachweis von *Adm*, *Crlr*, *Ramp2* und *Ramp3* in den verschiedenen Hirnarealen im Verlauf der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus wurde eine relative Quantifizierung (qPCR) der mRNA-Expression durchgeführt.

Abb. 5 zeigt, dass *Adm* bei Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus ab Score 2 in allen untersuchten ZNS-Regionen hochreguliert wurde. Bereits in der Inkubationsphase war ein leichter Anstieg und mit Auftreten erster spezifischer Krankheitszeichen waren signifikant erhöhte mRNA-Spiegel messbar. *Ramp2* wies im Verlauf der DOG4-Infektion parallele Veränderungen, also eine Koregulation zu *Adm* auf, wohingegen *Ramp3* und *Crlr* meist unverändert oder sogar eher herunterreguliert wurden.

Bemerkenswerterweise stellte sich das Kleinhirn als die Hirnregion mit den größten Veränderungen der Genexpression heraus: *Adm* wies dort in RABV-infizierten Tieren im Vergleich zu PBS-inokulierten Kontrolltieren sowie im Vergleich zu den anderen Hirnbereichen bis zu vierfach erhöhte Werte, *Ramp2* während der symptomatischen Phase sowohl im Score 2 als auch im terminalen Erkrankungsstadium sogar eine vier- bis achtfache Erhöhung und damit im Vergleich zu den anderen Hirnbereichen ebenfalls signifikante Veränderungen auf.

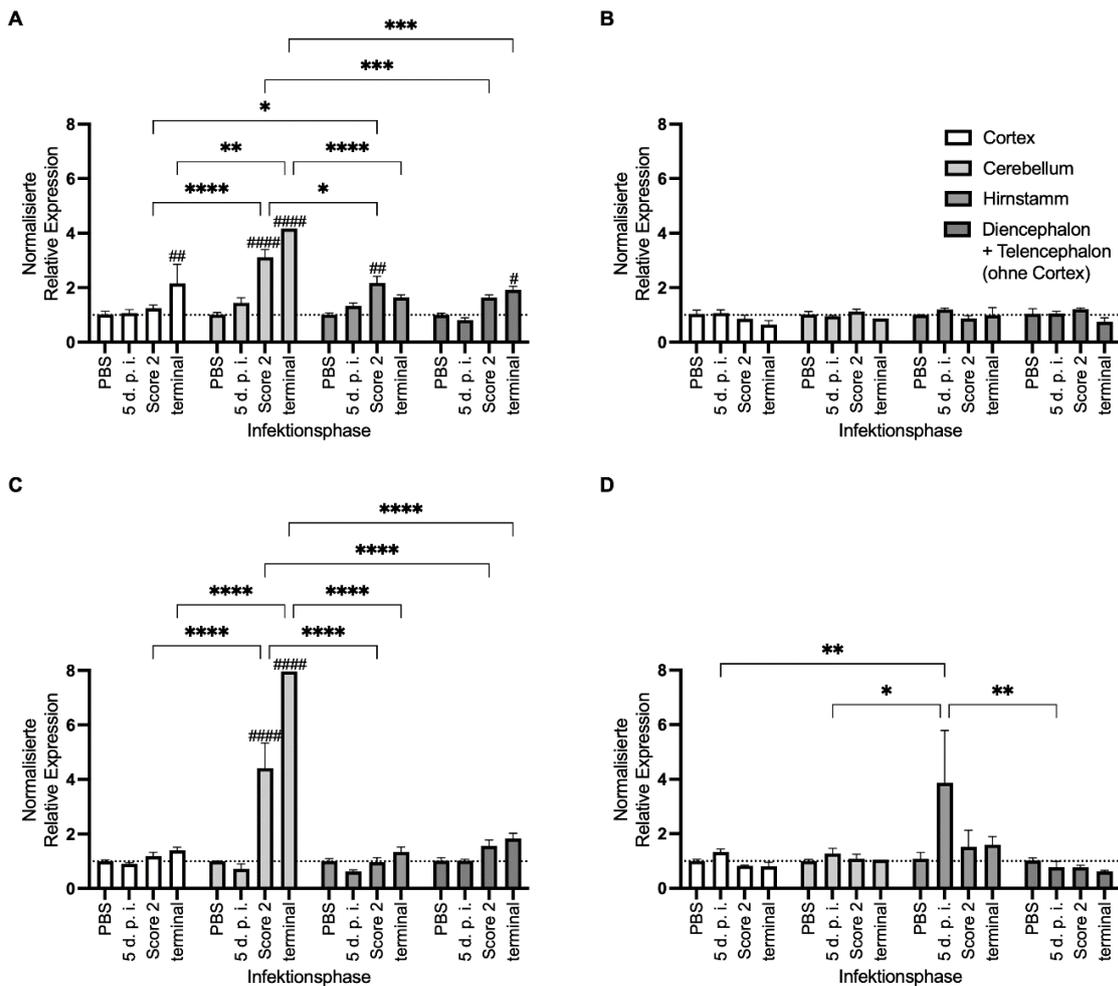


Abb. 5: Relative mRNA-Quantifizierung von *Adm* und seinen Rezeptormolekülen.

A *Adm*. **B** *Crlr*. **C** *Ramp2*. **D** *Ramp3*. Es wurde eine Normalisierung gegen drei Referenzgene (*Actb*, *Gapdh*, *Pgk1*) vorgenommen und die Mittelwerte \pm SEM mit $n = 4$ Tieren in allen Geweben außer Cb 5 d. p. i. ($n = 3$) und terminal ($n = 1$) dargestellt. Zunächst wurden die Werte auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Varianzhomogenität nach Brown-Forsythe getestet, dann erfolgte für die verschiedenen Hirnareale (Ctx, Cb, Hirnstamm, De/Te (ohne Ctx)) und Infektionsstadien (5 d. p. i., Score 2, terminal und PBS-inokulierte Kontrolltiere) eine Varianzanalyse mittels zweifaktorieller ANOVA. Beim Vorliegen eines signifikanten Einflusses ($p \leq 0,05$) einer Variablen in der Varianzanalyse wurden Posttests wie folgt durchgeführt: Tukey-Test für alle möglichen Vergleiche zwischen den Hirnarealen (*, angepasster p-Wert $\leq 0,05$; **, angepasster p-Wert $\leq 0,01$; ***, angepasster p-Wert $\leq 0,001$; ****, angepasster p-Wert $\leq 0,0001$) bzw. Dunnett-Test für den Vergleich zwischen PBS vs. 5 d. p. i./ Score 2/ terminal (#, angepasster p-Wert $\leq 0,05$; ##, angepasster p-Wert $\leq 0,01$; ###, angepasster p-Wert $\leq 0,001$).

Abkürzungen: Actb, Actin beta; Adm, Adrenomedullin; Cb, Cerebellum/Kleinhirn; Crlr, Calcitonin receptor-like receptor; Ctx, Cortex; De/Te (ohne Ctx), Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex; Gapdh, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Pgk, Phosphoglyceratkinase; Ramp, Receptor activity-modifying protein; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums); 5 d. p. i., 5 dies post infectionem (Inkubationsphase).

7.2 Regionale Differenzierung der Viruslast im Maushirn im Verlauf der DOG4-Infektion

Um zu untersuchen, ob die Expressionsveränderungen von *Adm* im Verlauf der RABV-Infektion auch der Viruslast des DOG4-Stammes in den entsprechenden Hirnarealen entspricht, wurde zunächst die Anzahl viraler DOG4-Genome durch eine absolute Quantifizierung von VG via qPCR bestimmt.

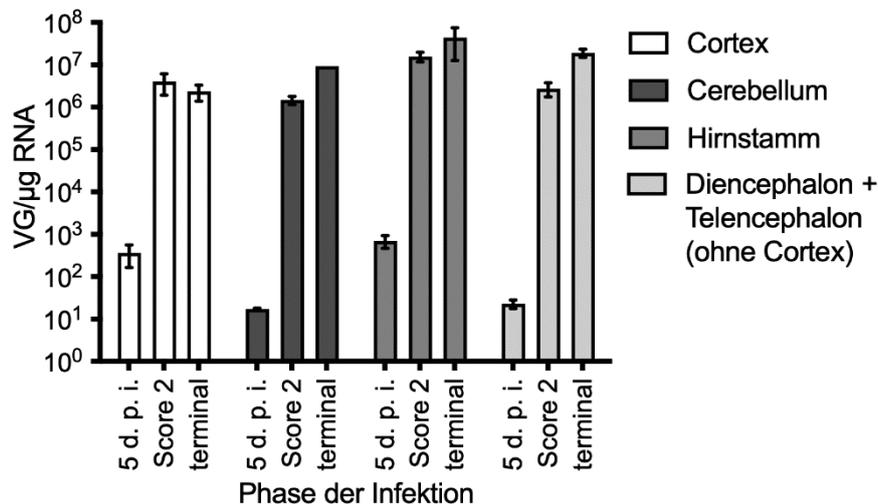


Abb. 6: Absolute Quantifizierung von DOG4-Virusgenomäquivalenten.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 4$ Tieren (außer Cb terminal ($n = 1$) und Cb 5 d. p. i. ($n = 3$)) der VG/ μ g RNA in den verschiedenen Hirnarealen (Ctx, Cb, Hirnstamm, De/Te (ohne Ctx)) und Infektionsstadien (5 d. p. i., Score 2 und terminal).

Abkürzungen: Cb, Cerebellum/Kleinhirn; Ctx, Cortex; De/Te (ohne Ctx), Diencephalon /Telencephalon ohne Cortex; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums); VG, Virusgenomäquivalente; 5 d. p. i., 5 dies post infectionem (Inkubationsphase).

Abb. 6 zeigt, dass ab 5 d. p. i. in allen Hirnbereichen VG vorhanden waren und diese mit Beginn der symptomatischen Phase (Score 2) einen starken Anstieg um mehr als das 10.000-fache zeigten. Die Viruslast war zum Zeitpunkt 5 d. p. i. im Cortex mit ca. 800 VG/ μ g RNA am größten und im Kleinhirn bzw. Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex mit ca. 10 VG/ μ g RNA am geringsten, was im Wesentlichen dem anatomischen Invasionsweg des Virus von der Inokulationsstelle über motorische Nervenbahnen entspricht. In der symptomatischen Phase konnte in allen untersuchten Hirnteilen zwischen ca. 10^6 und 5×10^7 VG/ μ g RNA detektiert werden.

7.3 Korrelation der Expression von *Adm*, *Ramp2* und *Ramp3* mit der Viruslast im Maushirn nach i. m. DOG4-Inokulation

Um nun zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Viruslast und den Expressionsveränderungen von *Adm*, *Ramp2* und *Ramp3* in den jeweiligen Hirnregionen wahrscheinlich ist, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

Tab. 12: Korrelation der Viruslast einer Hirnregion mit der relativen mRNA-Expression der Gentranskripte von *Adm*, *Ramp2* und *Ramp3*

Hirn-region	Gen-transkript (NRQ)	n	Ausreißer nach ROUT (Q = 1 %)	Korrelation der log-transformierten Daten		
				R ²	P-Wert	Signifikanz
Ctx	<i>Adm</i>	16	1	0,2879	0,0392	*
	<i>Ramp2</i>	16	0	0,0016	0,8848	n. s.
	<i>Ramp3</i>	16	0	0,3908	0,0096	**
Cb	<i>Adm</i>	12	0	0,4567	0,0159	*
	<i>Ramp2</i>	12	0	0,5013	0,0100	**
	<i>Ramp3</i>	12	0	0,0102	0,7553	n. s.
Hirn-stamm	<i>Adm</i>	16	0	0,1032	0,2251	n. s.
	<i>Ramp2</i>	16	0	0,0002	0,9571	n. s.
	<i>Ramp3</i>	16	2	0,0065	0,7839	n. s.
De/Te (ohne Ctx)	<i>Adm</i>	16	0	0,3985	0,0087	**
	<i>Ramp2</i>	16	0	0,5389	0,0012	**
	<i>Ramp3</i>	16	0	0,1796	0,1019	n. s.

n, Anzahl der RNA-Proben, für die sowohl n_{VG} als auch NRQ vorlagen. Die Daten wurden mit der ROUT-Methode von Ausreißern bereinigt, dann mit dem D'Agostino- und Pearson-Test die Normalverteilung der logarithmisch-transformierten Daten bestätigt. *, signifikant (p -Wert $\leq 0,05$); **, hoch signifikant (p -Wert $\leq 0,01$).

Abkürzungen: *Adm*, Adrenomedullin; *Cb*, Cerebellum/Kleinhirn; *Ctx*, Cortex; *De/Te* (ohne *Ctx*), Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex; NRQ, Gentranskripte (normalisierte relative Mengen); n. s., nicht signifikant; n_{VG} , Viruslast; *Ramp*, Receptor activity-modifying protein; R^2 = Pearson Korrelationskoeffizient.

Die Analysen (Tab. 12) ergaben, dass die stärkste Korrelation der Viruslast mit *Adm* ($R^2_{Adm} = 0,4567$) und *Ramp2* ($R^2_{Ramp2} = 0,5013$) im Kleinhirn existiert. Darüber hinaus zeigte sich auch eine Korrelation von n_{VG} mit *Adm* und *Ramp2* im Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex ($R^2_{Adm} = 0,3985$, $R^2_{Ramp2} = 0,5389$).

Da also nicht nur nach quantitativer Expressionsanalyse die deutlichste Steigerung der *Adm*- und *Ramp2*-Expression im Kleinhirn gefunden wurde, sondern gerade dort auch

die stärkste Korrelation von *Adm* und seinem Rezeptormolekül *Ramp2* mit der Viruslast nachweisbar war, lag die Vermutung nahe, dass gerade das Kleinhirn im RABV-infizierten Hirn die beeinflussbarste Region durch das Neuropeptid ADM sein könnte. Insofern wurde im weiteren Verlauf der Fokus auf diesen Hirnabschnitt gelegt.

Um nun innerhalb des Kleinhirns die vielversprechendsten Regionen (ROI) in Bezug auf den Einfluss von *Adm*-Expressionsveränderungen während der RABV-Infektion zu identifizieren, wurde unter der Annahme, dass in räumlicher Nähe zu RABV-infizierten Bereichen *Adm*-Expressionsveränderungen auftreten, RABV RNP mit immunhistochemischen Methoden im Gewebe untersucht und die Lokalisation der Immunreaktivität (IR) identifiziert.



Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von RABV in Kerngebieten und der Rinde des Kleinhirns. Dargestellt ist ein Ausschnitt des rechten Cb einer DOG4 i. m. infizierten Maus im Score 2 nach immunhistochemischer DAB/Nickel-Markierung mit Antikörpern gegen RABV RNP und Giemsa-Färbung. RABV RNP immunreaktive Kleinhirnkerne sind rot, positive Rindenbereiche gelb eingekreist. Abkürzungen: Cb, Cerebellum/Kleinhirn; RABV, Rabiesvirus; RNP, Ribonukleoprotein; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen).

Abb. 7 illustriert, dass RABV RNP IR im Kleinhirn konsistent in Neuronen der Kleinhirnkerns sowie häufig auch innerhalb der Kleinhirnrinde in Purkinjezellen und ihren durch das Stratum moleculare ziehenden Dendriten lokalisiert war. Folglich wurden die Kleinhirnkerns mit ihrer Einteilung in eine laterale, mediale und intermediäre Kerngruppe

sowie die Kleinhirnrinde im Bereich ,4,5 Cb' [155] zwischen den Koordinaten Bregma - 5,88 mm – -6,48 mm und Interaural -2,08 mm – -2,68 mm als ROI festgelegt.

Um nun in diesen Regionen einen Zusammenhang zwischen Veränderungen der *Adm*-Expression auf Proteinebene und der Viruslast bzw. der lokalen Anwesenheit des RABV zu untersuchen, wurde zunächst die immunreaktive Fläche nach IHC DAB/Nickel-Färbung gegen RABV gemessen. Neben Gewebe aus DOG4-infizierten Tieren wurde auch solches aus Mäusen berücksichtigt, die mit dem apathogenen RABV-Laborstamm F3 i. n. inokuliert und acht Tage später in symptomfreien Zustand euthanasiert wurden. Damit entspricht der Zeitpunkt der Gewebegewinnung in etwa dem in der Experimentgruppe DOG4 i. m. terminal.

Eine Gegenüberstellung der Infektionsmodalitäten – hochpathogenes DOG4- vs. apathogenes F3-Virus – soll weitere Erkenntnisse über die spezifischen Pathogenitätsmechanismen der letal verlaufenden DOG4-Infektion bringen.

In Abb. 8 ist dargestellt, dass die Viruslast, gemessen an der RABV RNP-immunreaktiven Bildfläche, in den Kleinhirnkernen sowohl nach DOG4- als auch nach F3-Inokulation ähnlich niedrig, F3 jedoch in der Kleinhirnrinde verbreiteter war als DOG4 im terminalen Stadium, während zu Beginn der symptomatischen Phase (Score 2) DOG4 noch in beiden ROI deutlich detektierbar war. Obwohl also das apathogene F3-Virus eine ähnliche Viruslast in der Kleinhirnrinde verursachte wie DOG4 im frühen Stadium der symptomatischen Phase, und die Kleinhirnkern im terminalen Stadium der DOG4-Infektion ähnlich wenig Virusantigen aufwies wie in etwa zum gleichen Zeitpunkt nach Inokulation mit dem apathogenen F3-Virus, ist der Ausgang der Infektion maximal unterschiedlich.

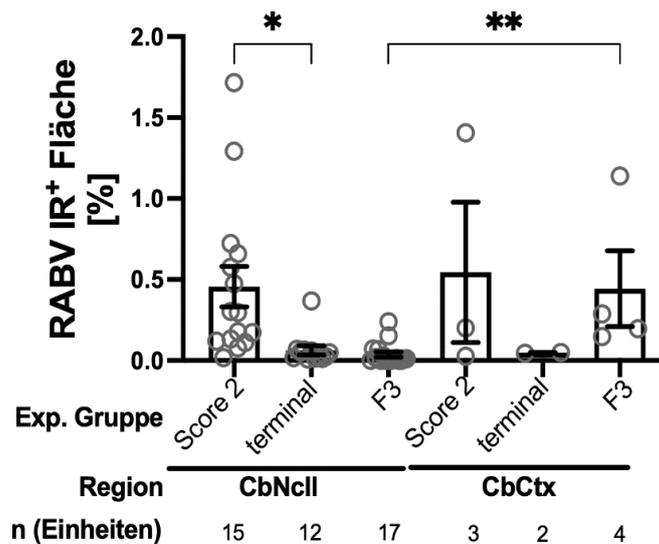


Abb. 8: Quantifizierung der RABV RNP IR⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) sowie i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM des prozentualen Anteils der RABV IR⁺ Fläche an der Gesamtbildfläche nach IHC DAB/Nickel-Markierung gegen RABV RNP nach DOG4- (Score 2 und terminal) und F3-Inokulation. n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 17), z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli. Es wurde der Mittelwert der RABV RNP IR⁺ Einheiten (z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli) aus einem bis vier Schnitten und deren Mittelwerte \pm SEM berechnet. Es folgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk. Da dieser negativ ausfiel, wurde ein Kruskal-Wallis-Test für Rangvarianzanalyse der Gruppen angeschlossen (p-Wert < 0,0001). Dann wurde ein Dunn-Test für multiple Vergleiche zur Analyse des Einflusses des Erkrankungsstadiums (Score 2 vs. terminal), der Pathogenität bei vergleichbarem Zeitpunkt nach Inokulation (DOG4 terminal vs. F3 8 d. p. i.) sowie ein Kruskal-Wallis-Test zur Analyse der Rolle der Kleinhirnregion (CbNcll vs. CbCtx) durchgeführt (*, angepasster p-Wert \leq 0,05; ** angepasster p-Wert \leq 0,01).

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; IR⁺ Immunreaktivität-positiv; RABV, Rabiesvirus; RNP, Ribonukleoprotein; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

Abb. 9 zeigt repräsentative Fotos der für die Quantifizierung der RABV IR⁺ Fläche zugrundeliegenden IHC DAB/Nickel-Färbung gegen RABV RNP.

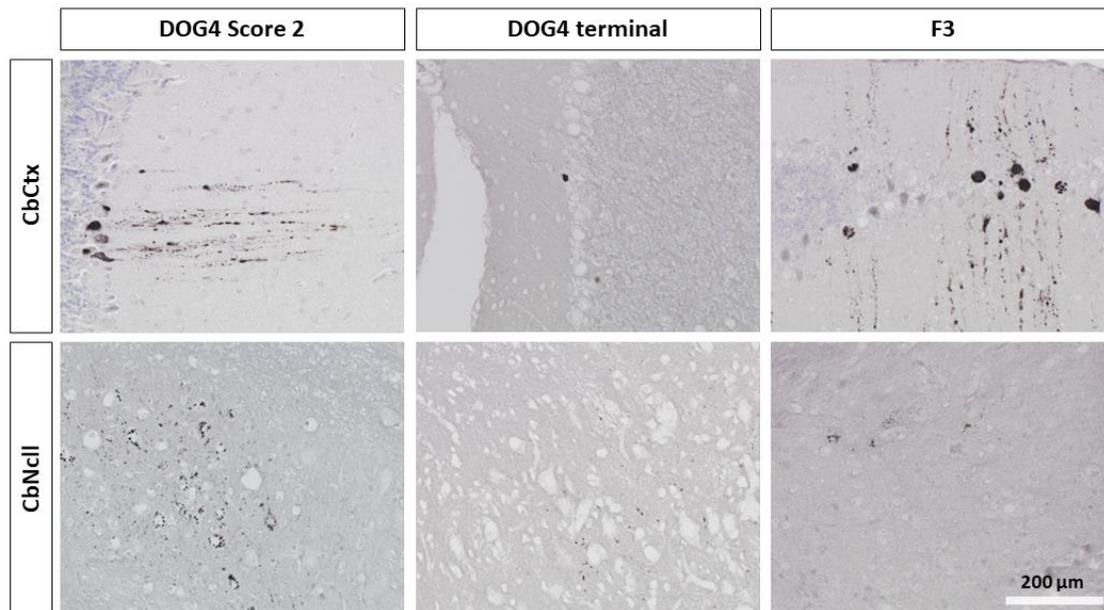


Abb. 9: Immunhistochemischer RABV-Nachweis nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) in den Kernen und der Rinde des Kleinhirns.

Repräsentative Fotos nach IHC DAB/Nickel-Färbung mit Antikörpern gegen RABV RNP.

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

7.4 Das Adrenomedullin-System im Kleinhirn der RABV-infizierten Maus

7.4.1 Zelluläre Quellen von Adrenomedullin im Kleinhirn

Bisher konnte gezeigt werden, dass das Kleinhirn hinsichtlich einer verstärkten *Adm*- und *Ramp2*-Genexpression nach DOG4-Inokulation eine herausragende Rolle zu spielen schien. Sowohl in den Kerngebieten als auch in der Rinde des Kleinhirns ließen sich Proteine des hochpathogenen DOG4- und des apathogenen F3-Virus nachweisen. Es schloss sich die Frage an, welche Zelltypen genau im Rahmen der RABV-Infektion innerhalb dieser beiden Regionen für die Sekretion von ADM verantwortlich sein könnten.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass ADM im Gehirn von zerebralen EC, Astrozyten und Perizyten [100], außerdem speziell im Kleinhirn von Purkinje- und Körnerzellen sowie Neuronen der Kerngebiete exprimiert wird [176, 211]. Ergänzend dazu wurde eine RAMP2-Expression bisher von Purkinjezellen, EC, Astrozyten, Perizyten, VSMC, im Plexus choroideus und in der Pia mater, RAMP3 von EC und im Stratum granulosum beschrieben (Abb. 10) [195].

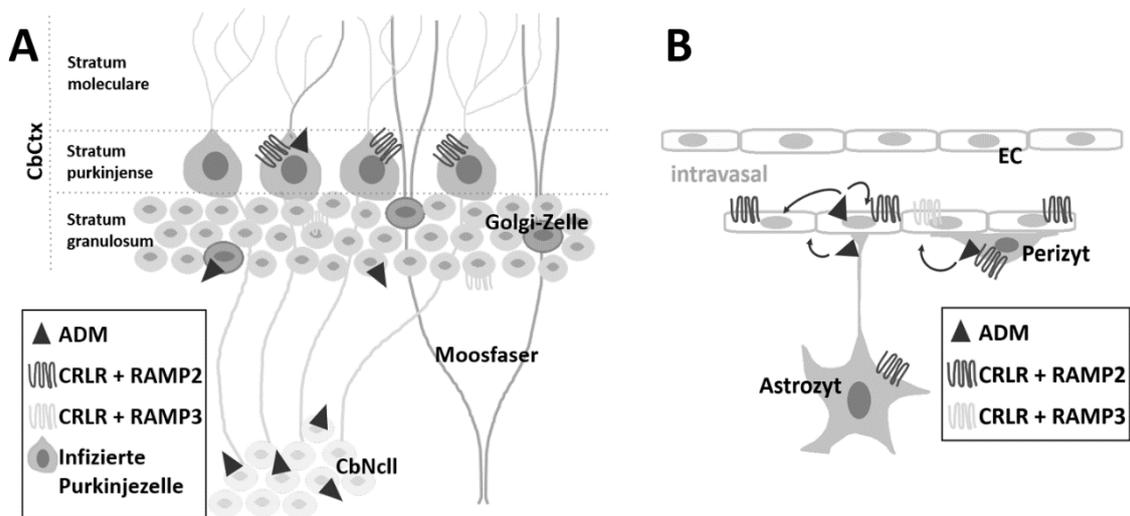


Abb. 10: Zelluläre Quellen der ADM-, CRLR/RAMP2- und CRLR/RAMP3-Expression im Kleinhirn.

A Kleinhirnrinde und -rinde. **B** Zerebrale Kapillare.

Abkürzungen: ADM, Adrenomedullin; CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnrinde; CRLR, Calcitonin receptor-like receptor; EC, Endothelzelle; RAMP, Receptor activity-modifying protein.

Zur Identifikation der während der RABV-Infektion für die ADM-Sekretion verantwortlichen Zelltypen wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen ADM und ein jeweiliges zelltypspezifisches Antigen bzw. das RABV selbst durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen in Abb. 11, dass ADM im RABV-infizierten Kleinhirn überwiegend von EC auf der intraluminalen Seite exprimiert wurde (Abb. 11 A-C). Darüber hinaus traten einzelne ADM-Signale zusätzlich in der Nähe von RABV-infizierten Purkinjezellen in Erscheinung, was bei nicht infizierten Purkinjezellen nicht zu beobachten war (Abb. 11 D, G). Vereinzelt ADM-Signale waren außerdem im Bereich der Kerngebiete und in der Rinde des Kleinhirns, genauer gesagt im Stratum granulosum, zu verzeichnen (Abb. 11 E, F). Dahingegen existierten im RABV-infizierten Kleinhirn in direkter räumlicher Nähe zu Astrozyten keine ADM-Signale (Abb. 11 H).

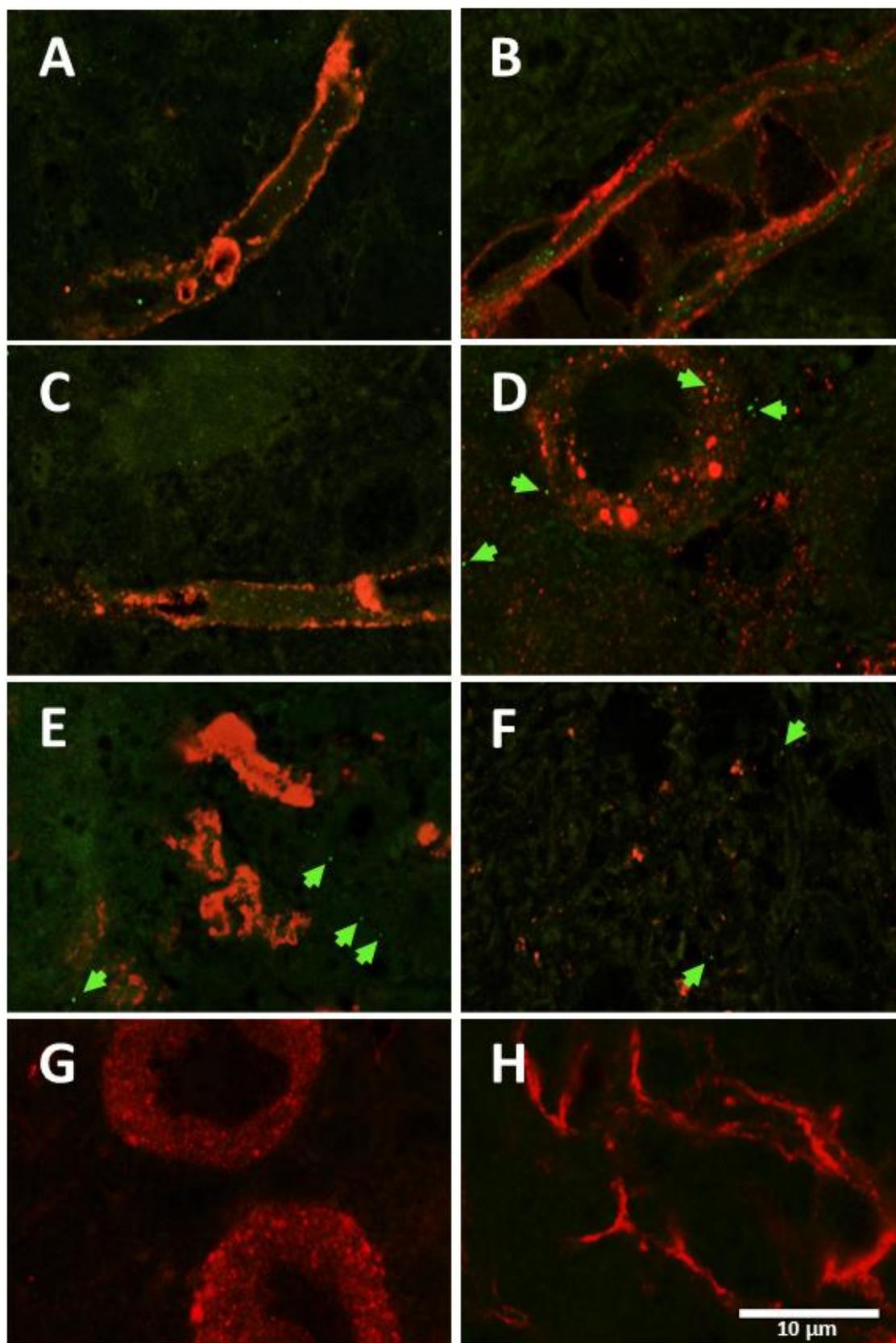


Abb. 11: Zelluläre Quellen von ADM im Kleinhirn nach i. m. DOG4-Inokulation.
Fortsetzung nächste Seite.

Abb. 11: Zelluläre Quellen von ADM im Kleinhirn nach i. m. DOG4-Inokulation.

Doppelimmunfluoreszenzfärbungen gegen ADM (grün) und ein zelltypisches Antigen (rot): **A** ICAM1 (Endothelzellmarker) in der Körnerzellschicht der CbCtx. **B** ICAM1 in CbNcll. **C** ICAM1 in der Molekularschicht der CbCtx. **D** RABV-N in der Purkinjezellschicht der CbCtx. **E** VGLUT1 (Körnerzellmarker) in der Körnerzellschicht der CbCtx. **F** VGLUT2 (Kleinhirnkernmarker) in CbNcll. **G** Calbindin (Purkinjezellmarker) in der Purkinjezellschicht der CbCtx. **H** GFAP (Astrozytenmarker) in CbNcll; Grüne Pfeile weisen auf ADM IR hin.

Abkürzungen: ADM, Adenomedullin; CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkerne; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; ICAM1, Intercellular adhesion molecule 1; IR, Immunreaktivität; RABV-N, Rabiesvirus-N-Protein; VGLUT1, Vesicular glutamate transporter 1; VGLUT2, Vesicular glutamate transporter 2.

7.4.2 Einfluss der RABV-Infektion auf die ADM-Proteinexpression im Kleinhirn

Im Rahmen der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus im Kleinhirn wurde also festgestellt, dass die *Adm* und *Ramp2* mRNA-Expression in Korrelation mit der Viruslast hochreguliert und ADM insbesondere von EC und RABV-infizierten Purkinjezellen sezerniert wurde. In den beiden Kleinhirnregionen der Kerngebiete und Rinde ließen sich dabei in ausgeprägtem Maße sowohl DOG4- als auch F3-Proteine nachweisen. Während in den Kerngebieten im terminalen Erkrankungsstadium der DOG4-Infektion ähnlich wenig Virusprotein nachweisbar war wie in der F3-Infektion, zeigten sich in der Rinde in der frühen symptomatischen Phase der DOG4-Infektion ähnlich hohe Level wie bei Infektion mit dem apathogenen Virus.

Im Folgenden sollte die ADM-Proteinexpression im RABV-infizierten Kleinhirn genauer untersucht und mögliche Einflussfaktoren identifiziert werden, die den Verlauf der Infektion mit dem hochpathogenen Virus über Auswirkungen auf die ADM-Expression mitbestimmen. Von daher sollte untersucht werden, ob die erhöhte *Adm*-Genexpression, die auf mRNA-Ebene bei DOG4 i. m.-Infektion im Kleinhirn festgestellt wurde, auch auf Proteinebene nachgewiesen werden kann, es einen Zusammenhang zwischen der Phase der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus und der ADM-Sekretion gibt und die Pathogenität des RABV-Stammes (DOG4 vs. F3) eine Rolle für die ADM-Sekretion spielt. Außerdem soll herausgefunden werden, ob es Unterschiede in der ADM-Expression zwischen den Kleinhirnkernen und der -rinde gibt und ob die direkte räumliche Nähe zu RABV-infizierten Zellen ausschlaggebend für Veränderungen der ADM-Sekretion ist.

Um Antworten auf diese Fragen zu finden, wurde die ADM IR in den beiden für das Kleinhirn festgelegten ROI (Kerngebiete und Kleinhirnrinde) in Abhängigkeit von der Infektionsphase (Score 2 bzw. terminal) nach DOG4 i. m.-Inokulation im Vergleich zu PBS-inokulierten Kontrolltieren quantifiziert, wobei zwischen RABV-Antigen-negativen und -positiven (RABV IR⁻ bzw. IR⁺) Regionen unterschieden wurde. Zudem wurden in

den Analysen mit dem apathogenen F3-Virus i. n. inokulierte Tiere (8 d. p. i.) herangezogen, um die Rolle der Pathogenität eines RABV-Stammes zu untersuchen.

Zur Quantifizierung der ADM-Proteinexpression in diesen unterschiedlichen Experimentgruppen wurde nun also sowohl die Anzahl der Punkte, bei denen das Immunfluoreszenzsignal nach Färbung mit Antikörpern gegen ADM maximale Intensität zeigte, ausgezählt (Abb. 12) sowie die prozentuale ADM IR⁺ Fläche ermittelt (Abb. 13).

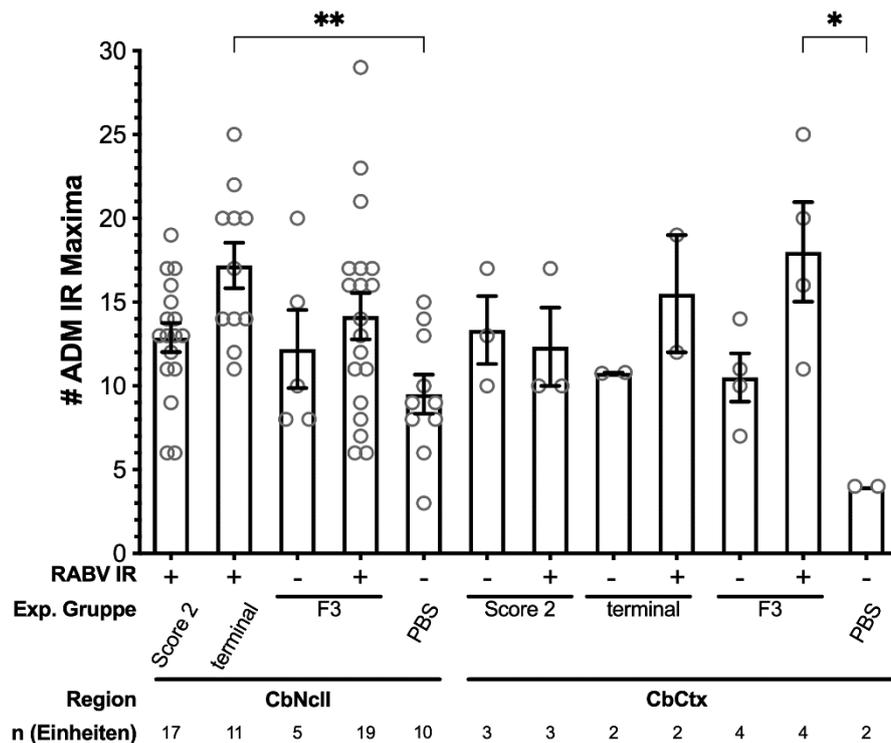


Abb. 12: Durchschnittliche Anzahl der ADM IR Maxima pro Bild in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl der ADM-Signale (graue Kreise) aus einem bis vier Bildern pro Einheit (z.B. linker Nucleus lateralis cerebelli) nach DOG4- (Score 2 und terminal) sowie nach F3-Inokulation und in Kontrolltieren (PBS) nach Immunfluoreszenzfärbung gegen ADM. Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Differenzierung in RABV IR⁺ und RABV IR⁻ Bereiche vorgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 19), z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurde kein Ausreißer detektiert. Darauf folgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Varianzhomogenität nach Brown-Forsythe. Anschließend wurde eine ordinary ANOVA zur Analyse von Gruppenvarianzen durchgeführt (p-Wert = 0,0052). Zuletzt erfolgte ein Šidák-Posttest für multiple Vergleiche zum Test auf Einfluss der Infektion selbst (infizierte Experimentgruppen vs. PBS), der Infektionsphase (Score 2 vs. terminal), des Virusstammes zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (terminal vs. F3 8 d. p. i.) sowie der Rolle der Kleinhirnregion (CbNcll vs. CbCtx) (*, angepasster p-Wert \leq 0,05; **, angepasster p-Wert \leq 0,01).

Abkürzungen: ADM, Adrenomedullin; CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

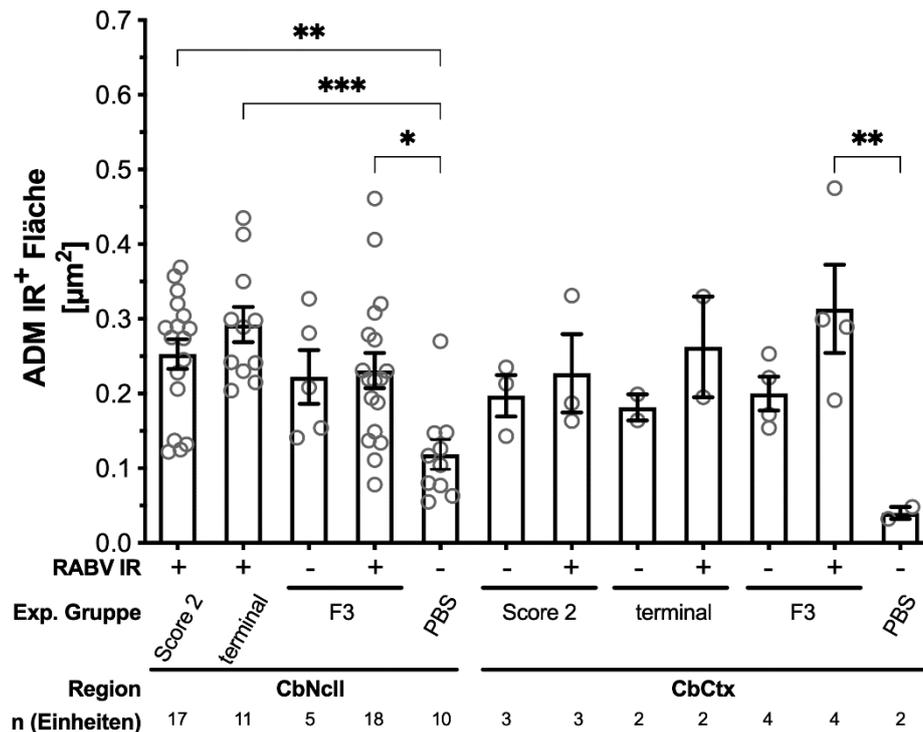


Abb. 13: Quantifizierung der durchschnittlichen ADM IR+ Fläche [µm²] pro Bild in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist die mittlere ADM IR+ Fläche (graue Kreise) aus einem bis sechs Bildern pro Einheit (z.B. linker Nucleus lateralis cerebelli) nach DOG4- (Score 2 und terminal) und F3-Inokulation sowie in Kontrolltieren (PBS) nach Immunfluoreszenzfärbung gegen ADM. Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Differenzierung in RABV IR+ und RABV IR- Bereiche vorgenommen. Die Balken repräsentieren die Gruppenmittelwerte ± SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 19), z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurde ein Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen. Es wurde ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Varianzhomogenität nach Brown-Forsythe und anschließend eine ordinary ANOVA zur Analyse von Gruppenvarianzen durchgeführt (p-Wert = 0,0003). Dann erfolgte eine ANOVA und Šidák-Posttest für multiple Vergleiche zum Test auf Einfluss der Infektion selbst (infizierte Experimentgruppen vs. PBS), der Infektionsphase (Score 2 vs. terminal), des Virusstammes zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (terminal vs. F3 8 d. p. i.) sowie der Rolle der Kleinhirnregion (CbNcll vs. CbCtx) (*, angepasster p-Wert ≤ 0,05; **, angepasster p-Wert ≤ 0,01; ***, angepasster p-Wert ≤ 0,001). Abkürzungen: ADM, Adrenomedullin; CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

Die Proteinexpressionsanalysen bestätigten sowohl nach Auszählung der einzelnen ADM-Signale als auch nach Messung der ADM IR+ Fläche die aus der mRNA-Untersuchung hervorgegangenen Ergebnisse, dass ADM insgesamt im RABV-infizierten Kleinhirn im Vergleich zu Kontrolltieren verstärkt exprimiert wurde.

In den Kleinhirnkernen war im Score 2 1,4-, terminal 1,8- sowie in F3-Tieren 1,5- (RABV IR+) bzw. 1,3-fach (RABV IR-) mehr ADM-Signal vorhanden als in Kontrolltieren. In der Rinde waren die ADM-Signale im Score 2 3,1- (RABV IR+) bzw. 3,3-fach (RABV IR-), terminal 3,9- (RABV IR+) bzw. 2,7-fach (RABV IR-) und in der F3-Gruppe 4,5- (RABV IR+) bzw. 2,6-fach (RABV IR-) erhöht.

Die Auswertung der ADM IR⁺ Fläche zeigt in den Kerngebieten im Score 2 eine 2,3-, terminal eine 2,4- und in der F3-Gruppe eine 1,9- (RABV IR⁺) bzw. 1,8-fache (RABV IR⁻) Erhöhung gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. In der Kleinhirnrinde war die ADM IR⁺ Fläche im Score 2 5,6- (RABV IR⁺) bzw. 5-fach (RABV IR⁻), terminal 6,5- (RABV IR⁺) bzw. 4,5-fach (RABV IR⁻) und in der F3-Gruppe 7,8- (RABV IR⁺) bzw. 5-fach (RABV IR⁻) erhöht. Zusätzlich ergaben die Untersuchungen, dass die ADM IR⁺ Flächen vor allem in den Kleinhirnkernen sowohl nach DOG4- als auch F3-Inokulation im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht waren.

Hinsichtlich der Pathogenität der Virusstämme zeigten sich bei der Gegenüberstellung von DOG4- und F3-Infektion keine signifikanten Unterschiede und somit eine vom Virusstamm unabhängige ADM-Expression im Kleinhirn. Was den zeitlichen Verlauf der DOG4-Infektion (Score 2 vs. terminal) und die räumliche Differenzierung (Kerngebiete vs. Rinde) von ADM betrifft, wurden keine signifikanten Unterschiede in der ADM-Expression gefunden (Abb. 12 und 13). Wenngleich eine deutliche Abnahme der RABV-Last im Verlauf der DOG4-Infektion und eine differenzierte Viruslast bei F3-Infektion in den jeweiligen Kleinhirnregionen festgestellt wurde (Abb. 8), schien doch die Regulation von ADM im DOG4-infizierten Hirn sowohl unabhängig vom zeitlichen Verlauf als auch von der Kleinhirnregion zu sein. Was hingegen den Einfluss der direkten räumlichen Nähe des RABV auf die Expression von ADM angeht, so zeigen die Ergebnisse, dass in allen Infektionsmodalitäten eine erhöhte ADM-Expression in RABV IR⁺ Regionen, mit Ausnahme von Score 2 in der Kleinhirnrinde, vorlag (Abb. 12 und 13) und damit ADM in Abhängigkeit von der lokalen Nähe zu RABV-infizierten Zellen hochreguliert wurde.

Zusammenfassend konnte also nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Proteinebene eine erhöhte Expression von ADM im RABV-infizierten Hirn nachgewiesen werden. Diese war weder von der Erkrankungsphase noch der Kleinhirnregion oder dem Virusstamm abhängig. Dafür wurden jedoch Hinweise gefunden, dass sowohl bei Infektion mit DOG4 als auch F3 die direkte lokale Nähe zu RABV-infizierten Zellen einen positiven Effekt auf die ADM-Proteinexpression im Kleinhirn haben könnte. Die Viruslast allein schien dabei jedoch kein ausschlaggebender Faktor für den Anstieg der ADM-Expression zu sein.

7.4.3 Einfluss der RABV-Infektion auf die RAMP2-Expression im Kleinhirn

Da wie in 7.4.2 beschrieben die ADM-Proteinexpression im Kleinhirn hauptsächlich im Rahmen der RABV-Infektion selbst und darüber hinaus zusätzlich von der direkten lokalen Nähe zu RABV-infizierten Zellen, weniger jedoch von der Pathogenität des Virusstamms, der Infektionsphase oder der Kleinhirnregion abhängig zu sein schien,

stellte sich die Frage, ob die auf mRNA-Ebene nach DOG4 i. m.-Inokulation gezeigte, bis zu achtfache Hochregulation der *Adm*-Rezeptorkomponente *Ramp2* auf Proteinebene zu einem ähnlichen oder aber einem differenzierteren Bild in den einzelnen Experimentgruppen führt. Dazu wurde analog zur Analyse der IHC DAB/Nickel-Färbung gegen ADM (siehe Kapitel 7.4.2) Gewebe mit Antikörpern gegen RAMP2 angefärbt und dessen IR⁺ prozentuale Fläche gemessen.

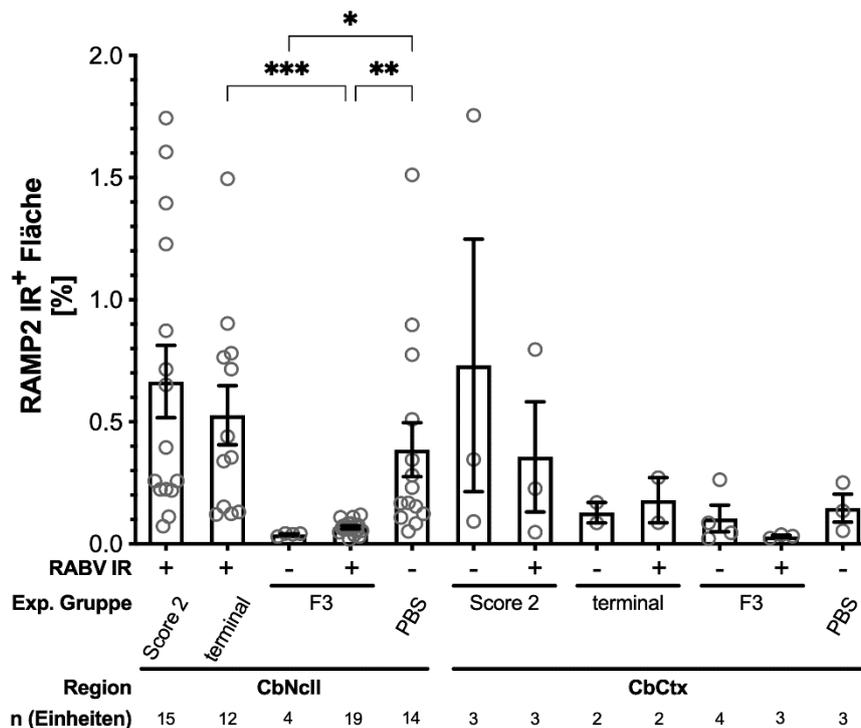


Abb. 14: Quantifizierung der RAMP2 IR⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der RAMP2 IR⁺ Fläche pro Auswertungseinheit (z.B. linker Nucleus lateralis cerebelli), gemittelt aus einem bis sechs Bildern, nach DOG4- (Score 2 und terminal) und F3-Inokulation sowie in Kontrolltieren (PBS) nach Immunfluoreszenzfärbung gegen RAMP2 (graue Kreise). Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Differenzierung in RABV-positive (IR⁺) und RABV-negative (IR⁻) Bereiche vorgenommen. Die Balken repräsentieren die Gruppenmittelwerte \pm SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 19), z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurden vier Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen. Es erfolgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Varianzhomogenität nach Brown-Forsythe. Anschließend wurde ein Kruskal-Wallis-Tests zur Analyse von Gruppenvarianzen (p-Wert < 0,0001) und ein Dunns-Posttest für multiple Vergleiche zum Test auf Einfluss der Infektion selbst (infizierte Experimentgruppen vs. PBS), der Infektionsphase (Score 2 vs. terminal), des Virusstammes zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (terminal vs. F3 8 d. p. i.) sowie der Rolle der Kleinhirnregion (CbNcll vs. CbCtx) für die im Kruskal-Wallis-Test detektierten Unterschiede durchgeführt (*, angepasster p-Wert \leq 0,05; **, angepasster p-Wert \leq 0,01; ***, angepasster p-Wert \leq 0,001). Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; RAMP, Receptor activity-modifying protein; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

Die Proteinexpressionsanalyse von RAMP2 im Kleinhirn (Abb. 14) zeigt dabei durchaus differenziertere Resultate als die mRNA-Quantifizierung vermuten ließ:

Im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren wurde hier nach Inokulation mit DOG4 im Wesentlichen mehr RAMP2-Signal gemessen: Im Score 2 zeigten sich in den Kleinhirnkernen 1,7-fach, in der Kleinhirnrinde 2,4- (RABV IR⁺) bzw. 4,9-fach (RABV IR⁻) erhöhte RAMP2-Werte. Im terminalen Erkrankungsstadium waren die RAMP2-Level im Vergleich zur PBS-Gruppe jeweils in etwa gleich hoch (in den Kernen 0,40 % vs. PBS 0,39 %; in der Rinde 0,18 % (RABV IR⁺) bzw. 0,13 % (RABV IR⁻) vs. PBS 0,15 %). Nach Inokulation mit F3 zeigten sich hingegen interessanterweise niedrigere Werte: In den Kleinhirnkernen war nur ein Fünftel (RABV IR⁺) bzw. ein Zehntel (RABV IR⁻), in der Kleinhirnrinde ein Fünftel (RABV IR⁺) bzw. zwei Drittel (RABV IR⁻) an RAMP2-Signal im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren vorhanden. Die auf Proteinebene gemessene Zunahme von RAMP2 nach Inokulation mit DOG4 zeigte somit zwar die gleiche Tendenz wie nach Analyse der mRNA-Expression, jedoch keine Erhöhung in dem erwarteten Ausmaß.

Darüber hinaus schien die Pathogenität des Virusstammes einen bedeutenden Einfluss auf die Expression von RAMP2 im RABV-infizierten Kleinhirn zu haben: Während der DOG4-Infektion war die RAMP2-Proteinexpression höher als bei der apathogenen F3-Infektion: In den Kleinhirnkernen zeigten sich die RAMP2-Level im Score 2 9,4- und terminal 5,7-fach erhöht. In der Kleinhirnrinde konnte im Score 2 eine 12- (RABV IR⁺) bzw. 7,3-fache (RABV IR⁻) und terminal eine 6- (RABV IR⁺) bzw. 1,3-fache (RABV IR⁻) Erhöhung von RAMP2 im Gegensatz zur F3-Gruppe gemessen werden.

Im zeitlichen Verlauf der DOG4-Infektion wurde eine leichte Abnahme an RAMP2 IR⁺ Fläche (Score 2 vs. terminal) registriert, was gegenläufig zu dem auf mRNA-Ebene gemessenen Anstieg der *Ramp2*-Genexpression im Kleinhirn ist (siehe Abb. 5). Die räumliche Nähe zu RABV IR⁺ Zellen schien im Gegensatz zur Proteinexpression von ADM keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression von RAMP2 im Kleinhirn zu haben, ebenso wenig die Gegenüberstellung der Kleinhirnregionen (Kerne vs. Rinde).

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass nach DOG4-Inokulation im Vergleich zu Kontrolltieren, und da besonders in der frühen symptomatischen Phase (Score 2), in den Kleinhirnkernen eine 1,7- und in der Kleinhirnrinde eine 2,4- (RABV IR⁺) bzw. 4,9-fach (RABV IR⁻) erhöhte RAMP2-Proteinexpression nachgewiesen werden konnte, auch wenn die Unterschiede zu Kontrolltieren deutlich geringer als in den mRNA-Analysen ausfielen (vierfache Erhöhung der *Ramp2*-Expression im Kleinhirn im Score 2, vgl. Abb. 5). Außerdem schien eine Abhängigkeit der RAMP2-Proteinexpression von der Pathogenität des Virusstammes vorzuliegen, da während der Infektion mit DOG4 im

Kleinhirn – in den Kerngebieten sogar signifikant – eine größere RAMP2 IR⁺ Fläche als bei der Infektion mit F3 gemessen werden konnte.

Abb. 15 veranschaulicht RAMP2-Markierungen nach Immunfluoreszenz- und IHC DAB/Nickel-Färbung im Kleinhirn (Abb. 15 A–C) und zusätzlich zum Test der Antikörperfunktionalität RAMP2-reiches Lungengewebe als Positivkontrolle (Abb. 15 D).

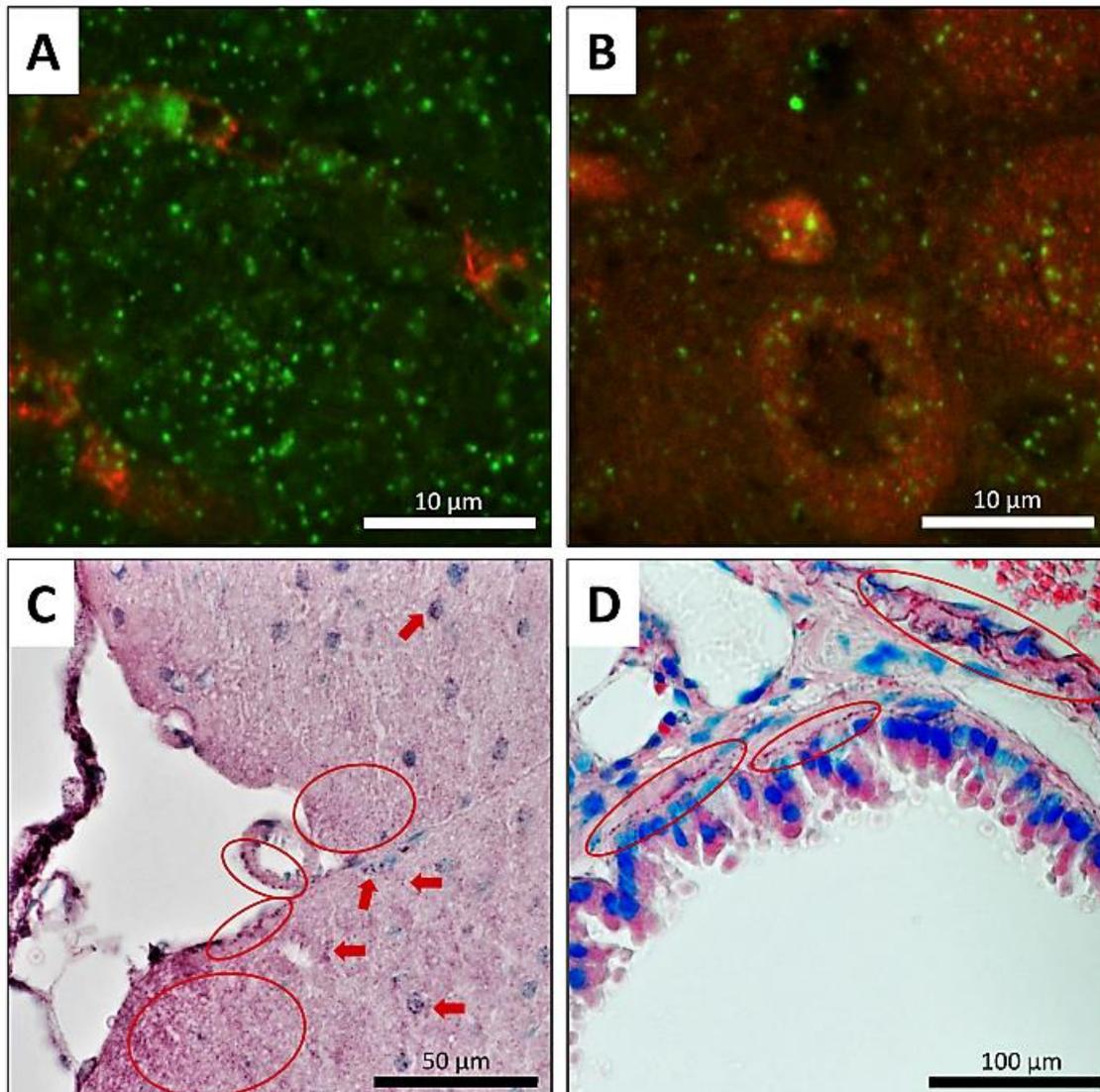


Abb. 15: Darstellung von RAMP2 mit Immunfluoreszenzfärbung und IHC DAB/Nickel-Färbung nach DOG4-Inokulation.

A und **B** Immunfluoreszenzfärbung im Cb gegen RAMP2 (grün) und **(A)** ICAM1 (Endothelzellmarker) bzw. **(B)** Calbindin (Purkinjezellmarker). RAMP2-Signale sind identifizierbar, jedoch bei erheblicher unspezifischer Färbung. **C** DAB/Nickel-Färbung mit Giemsa-Gegenfärbung im Cb. In Parenchym, Gefäßendothel, Pia mater sowie Arachnoidea mater sind eindeutige Signale erkennbar. **D** DAB/Nickel-Färbung mit Giemsa-Gegenfärbung in Lungengewebe der Maus. In Alveolar- und Endothelzellen sind starke RAMP2-Signale erkennbar. RAMP2-Signale sind in C und D eingekreist bzw. mit Pfeilen markiert. Abkürzungen: Cb, Cerebellum/Kleinhirn; ICAM1, Intercellular adhesion molecule 1; RAMP, Receptor activity-modifying protein.

7.5 Regulation der Blut-Hirn-Schranke im Kleinhirn im Rahmen der RABV-Infektion

7.5.1 Transzellulärer Transport: Endothelzell-Aktivierung

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass ADM vor allem im RABV-infizierten Kleinhirn von EC (wahrscheinlich intraluminal) sezerniert wurde. Dafür schien gerade die lokale Nähe zu mit dem hochpathogenen DOG4-Virus infizierten Zellen ein entscheidender Faktor zu sein. Außerdem wurde die ADM-Rezeptorkomponente RAMP2 in Abhängigkeit vom Virusstamm insbesondere zu Beginn der symptomatischen Phase hochreguliert.

Wie bereits eingangs erwähnt, hat das von EC sezernierte auto- und parakrin wirkende Neuropeptid ADM eine herausragende Bedeutung hinsichtlich der Endothelfunktionalität.

Kann die in dieser Arbeit beobachtete Regulation des ADM/RAMP2-Signalwegs im DOG4-infizierten Kleinhirn nun mitverantwortlich für die Pathogenität und Begünstigung der besonders hohen Letalität des RABV sein?

Da aus Voruntersuchungen bekannt ist, dass ADM die Expression der Endothelzelloberflächenproteine ICAM1, VCAM1 und Selectin E negativ beeinflusst [93] und diese Regulation wiederum zu einer fehlenden bzw. verminderten Aktivierung der EC führt [184], soll nun im Rahmen der RABV-Infektion geprüft werden, ob dies ein möglicher Pathomechanismus für eine verringerte Diapedese von Immunzellen von intravasal über die Blut-Hirn-Schranke in den zerebralen Extrazellularraum darstellt.

Dazu wurde immunhistochemisch die ICAM1-Expression in Experimentgruppen mit viel ADM/RAMP2- zu solchen mit wenig ADM/RAMP2-Signal gegenübergestellt (Abb. 16) und die ICAM1-Expression in den gleichen ROI analysiert (Abb. 17). Nach der RAMP2-Analyse (siehe Abb. 14) erschien hier insbesondere das Infektionsstadium Score 2 nach DOG4-Inokulation, außerdem nach der ADM-Analyse (siehe Abb. 12 und 13) die unmittelbare Nähe zu RABV IR⁺ Bereichen von Interesse. Außerdem ist eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen ICAM1 und ADM bzw. das RABV durchgeführt worden, um den direkten räumlichen Zusammenhang dieser Komponenten zu untersuchen (Abb. 18 und 19).

	Score 2	terminal	F3	PBS	
RABV IR ⁻			3,85 % \varnothing 3,86 %	0,03 % \varnothing 0,03 %	CbNcll
RABV IR ⁺	3,70 % \varnothing 3,89 %	3,21 % \varnothing 3,02 %	7,90 % \varnothing 6,18 %		
RABV IR ⁻	0,96 % \varnothing 1,03 %	0,50 % \varnothing 0,49 %	1,16 % \varnothing 1,20 %	0,01 % \varnothing 0,01 %	CbCtx
RABV IR ⁺	0,69 % \varnothing 0,62 % 100 μ m	1,35 % \varnothing 1,73 %	2,20 % \varnothing 1,83 %		

Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von ICAM1 nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) sowie in PBS-inokulierten Kontrolltieren in Kleinhirnkernen und -rinde.

Repräsentative Fotos der ICAM1 IR⁺ Fläche nach IHC DAB/Nickel-Färbung mit Antikörpern gegen ICAM1. Es wurde neben einer räumlichen Differenzierung in CbNcll und CbCtx eine Differenzierung in RABV IR⁺ und RABV IR⁻ Bereiche vorgenommen. Die Werte im jeweiligen Bild links oben entsprechen dem exakten Bildwert, die Werte rechts oben dem Gruppenschnittswert (siehe Abb. 17).

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; ICAM1, Intercellular adhesion molecule 1; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

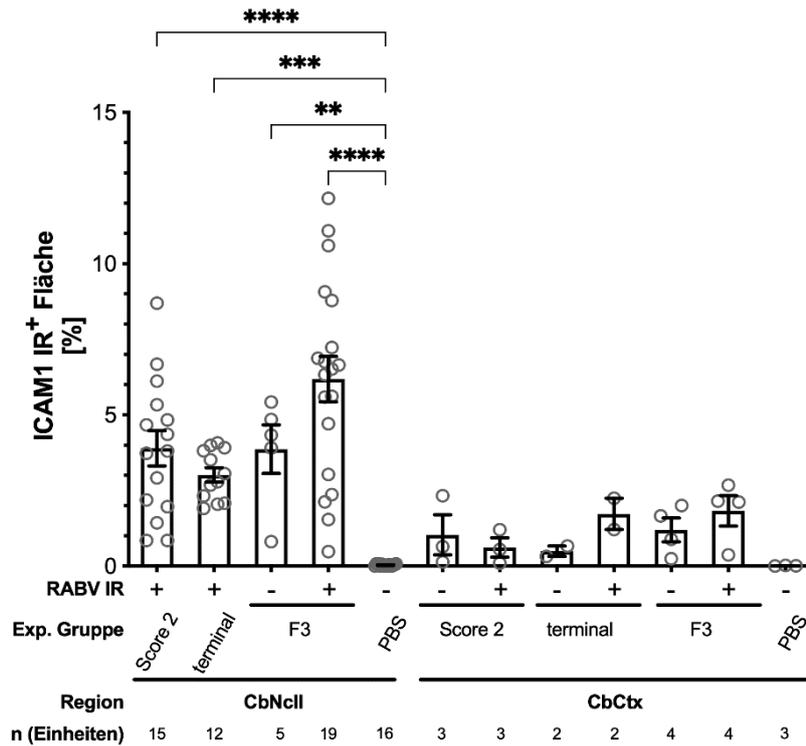


Abb. 17: Quantifizierung der ICAM1 IR⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) sowie PBS-inokulierten Kontrolltieren.

Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der ICAM1 IR⁺ Fläche pro Auswertungseinheit (z.B. linker Nucleus lateralis cerebelli) aus einem bis vier Bildern nach DOG4- (Score 2 und terminal) und F3-Inokulation sowie in Kontrolltieren (PBS) nach IHC DAB/Nickel-Färbung gegen ICAM1 (graue Kreise). Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Differenzierung in RABV IR⁺ und RABV IR⁻ Bereiche vorgenommen. Die Balken repräsentieren die Gruppenmittelwerte \pm SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 19), z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurde kein Ausreißer detektiert. Die Daten wurden dann auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und anschließend auf Unterschiede zwischen den Gruppen nach Kruskal-Wallis getestet ($p < 0,0001$). Ein Dunn-Test für multiple Vergleiche zum Test auf Einfluss der Infektion selbst (DOG4 bzw. F3 vs. PBS), der Infektionsphase (Score 2 vs. terminal), des Virusstammes zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (terminal vs. F3 8 d. p. i.) sowie der Rolle der Kleinhirnregion (CbNcll vs. CbCtx) wurde für die im Kruskal-Wallis-Test detektierten Unterschiede angeschlossen (**, angepasster p-Wert $\leq 0,01$; ***, angepasster p-Wert $\leq 0,001$; ****, angepasster p-Wert $\leq 0,0001$).

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; ICAM1, Intercellular adhesion molecule 1; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

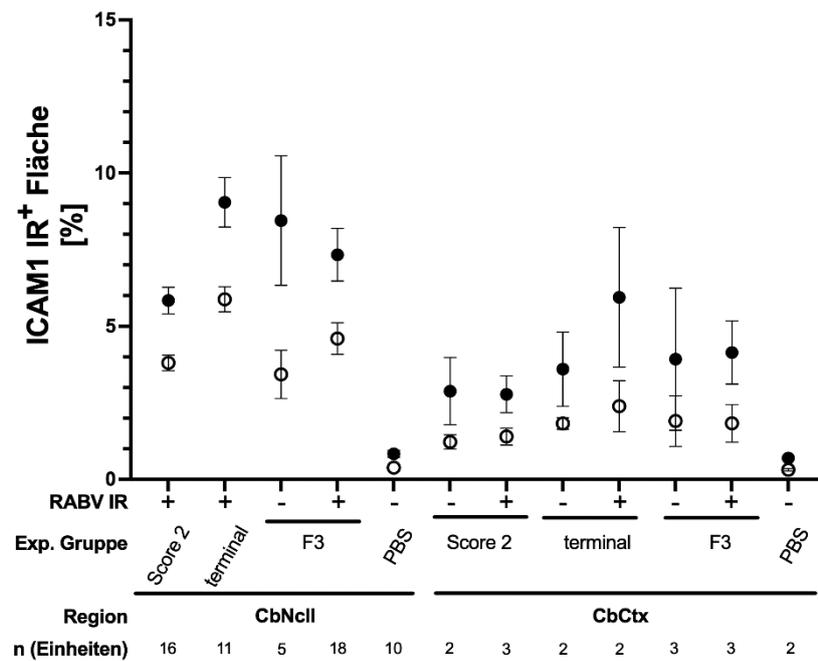


Abb. 18: Quantifizierung der ICAM1 IR+ Fläche [%] in Kleinhirnkernen und -rinde in Abhängigkeit von der lokalen ADM-Anwesenheit nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) sowie PBS-inokulierten Kontrolltieren.

Dargestellt ist die prozentuale ICAM1 IR+ Fläche nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen ADM und ICAM1. Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Differenzierung entsprechend der parakrinen Reichweite von ADM (innerhalb = schwarze Kreise; außerhalb = weiße Kreise) sowie eine Differenzierung in RABV IR+ und RABV IR- Bereiche vorgenommen; Dargestellt sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 18), wobei der Mittelwert jeder Auswertungseinheit, z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli, aus einem bis vier Bildern berechnet wurde. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurden drei Ausreißer detektiert und ausgeschlossen. Die Daten wurden dann auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk getestet, danach wurde eine zweifaktorielle ordinary ANOVA zur Analyse von Effekten der Experimentgruppen (p-Wert < 0,0001) und der lokalen Anwesenheit von ADM (p-Wert < 0,0001) durchgeführt. Schließlich folgten Posttests zum Test auf Einfluss der lokalen ADM-Anwesenheit außerhalb (Šidák-Test) und innerhalb der Experimentgruppe (Tukey-Test).

Abkürzungen: ADM, Adrenomedullin; CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; ICAM1, Intercellular adhesion molecule 1; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

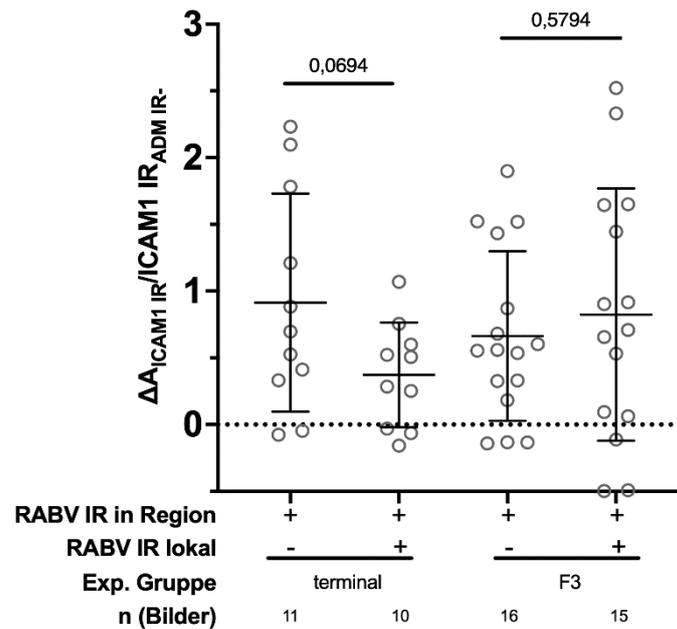


Abb. 19: Lokale Veränderungen der ICAM1 IR in direkter Nähe von ADM.

Die Daten wurden aus n Bildern nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen ICAM1 und ADM ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Punktwolken \pm SD als Linien. Die Punkte repräsentieren die Differenz zwischen der ICAM1 IR⁺ Fläche [%] außerhalb und innerhalb der parakrinen Reichweite der ADM-Signale ($\Delta A_{ICAM1 IR} = ICAM1 IR_{ADM IR^+} - ICAM1 IR_{ADM IR^-}$) in Bezug auf die ICAM1 IR⁺ Fläche [%] außerhalb der parakrinen Reichweite der ADM-Signale ($ICAM1 IR_{ADM IR^-}$). Alle Bilder wurden aus den RABV IR⁺ CbNcll gewonnen, wobei jedoch wenige Schnitte keine RABV IR Signale aufwiesen (nach terminaler DOG4- und F3-Inokulation). In diesen Fällen wurden die Regionen als IR⁻ eingeordnet, wenn benachbarte gegen RABV RNP gefärbte Gewebeschnitte ebenfalls IR⁻ waren. Mit der ROUT-Methode ($Q = 1\%$) wurden keine Ausreißer detektiert. Es folgte die Testung auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk. Zur Prüfung auf Unterschiede zwischen den lokalen ICAM1 IR Veränderungen in direkter ADM-Nähe in Abhängigkeit von der lokalen Anwesenheit des RABV (IR⁺) wurde ein ungepaarter T-Test mit Welch-Korrektur für ‚terminal‘ aufgrund der signifikanten Varianzheterogenität für beide Experimentgruppen durchgeführt (exakter p-Wert siehe Graph).

Abkürzungen: ADM, Adrenomedullin; CbNcll, Kleinhirnerkerne; F3, CVS-F3; ICAM1, Interzellular adhesion molecule 1; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

Die Daten zeigen, dass die Expression des Endothelzelloberflächenproteins ICAM1 im Kleinhirn während der RABV-Infektion insgesamt deutlich höher ausfiel als in gesunden Kontrolltieren: In den Kerngebieten war im Score 2 die ICAM1 IR⁺ Fläche 130-mal, terminal 100-mal und nach F3-Inokulation sogar 206- (RABV IR⁺) bzw. 129-mal (RABV IR⁻) höher als in der PBS-Gruppe. In der Kleinhirnrinde wurde im Score 2 eine 62- (RABV IR⁺) bzw. 103-fach (RABV IR⁻), terminal eine 173- (RABV IR⁺) bzw. 49-fach (RABV IR⁻) und bei F3-Infektion eine 183- (RABV IR⁺) bzw. 120-fach (RABV IR⁻) höhere ICAM1 IR⁺ Fläche gemessen als in der Kontrollgruppe (Abb. 17).

In den Kerngebieten war somit sogar über alle Infektionsgruppen hinweg ein signifikant höheres ICAM1-Level zu beobachten. Der zeitliche Verlauf der DOG4-Infektion, der Virusstamm und die lokale Nähe zu RABV-infizierten Zellen schienen keinen signifikanten Einfluss auf die ICAM1-Expression zu haben. Insofern deuten die Resultate

zunächst einmal darauf hin, dass entgegen der Erwartungen sowohl nach DOG4- als auch nach F3-Inokulation eine erhöhte ICAM1-Aktivierung innerhalb des Kleinhirns und zwar besonders in den Kleinhirnkernen und damit eine Aktivierung der die Blut-Hirn-Schranke auskleidenden EC vorzuliegen schien. Interessanterweise war jedoch in der Kleinhirnrinde, in der, wie bereits erwähnt, zu Beginn der symptomatischen Phase die stärksten ADM/RAMP2-Veränderungen registriert wurden, zwar wie oben beschrieben durchweg erhöhte ICAM1-Proteinlevel messbar (0,62 % (RABV IR⁺) bzw. 1,03 % (RABV IR⁻) vs. 0,01 % in PBS-Tieren), jedoch im Gegensatz zu den Kleinhirnkernen ohne statistische Signifikanz. Insofern fiel die ICAM1-Proteinexpression dort prinzipiell geringer aus.

Im Übrigen zeigte sich diese Tendenz ebenfalls nach Auswertung der Doppelimmunfluoreszenzfärbung (Abb. 18). Darin stellte sich zudem dar, dass ICAM1 in allen Experimentgruppen innerhalb der parakrinen Reichweite von ADM vermehrt exprimiert wurde. Dies erscheint zunächst widersprüchlich zu bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen, in denen belegt wurde, dass ADM einen negativen Einfluss auf die ICAM1-Expression ausübt [93]. Bei zusätzlicher Betrachtung der lokalen Veränderung der ICAM1-Expression in ADM-Nähe (Abb. 19) zeigte sich, dass die direkte lokale Nähe zu RABV-infizierten Zellen nach DOG4-Inokulation tendenziell zu weniger ICAM1-Anstieg in parakriner ADM-Reichweite führte (p -Wert = 0,0694) als bei der F3-Infektion (p -Wert = 0,5794). Neben der wie bereits in Abb. 17 dargestellten erhöhten ICAM1-Expression vor allem in den Kerngebieten ergaben die anderen Vergleiche der Experimentgruppen nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung (Abb. 18) keinen Anhalt für einen Einfluss auf das Expressionsniveau von ICAM1.

Zusammenfassend zeigen also die Analysen im RABV-infizierten Kleinhirn und vor allem innerhalb der Kerngebiete in besonderem Maße eine Aktivierung der EC, dargestellt als gesteigerte Expression des Oberflächenproteins ICAM1. Die Hochregulation von ICAM1 wird dabei sowohl nach Inokulation mit dem hochpathogenen DOG4- als auch dem apathogenen F3-Virus beobachtet (Abb. 17). Interessant erscheint jedoch, dass in unmittelbarer Nähe zu ADM-Signalen höhere ICAM1-Werte als außerhalb derer Reichweite gemessen wurden und dieser Effekt aber gerade in der Rinde zu Beginn der symptomatischen Erkrankungsphase (Abb. 18) sowie im terminalen Erkrankungsstadium bei unmittelbar angrenzenden RABV-Signalen (Abb. 19) weniger stark auszufallen schien.

7.5.2 Parazellulärer Transport: Claudin 5

Als nächstes stellte sich die Frage, ob ADM neben seinem Einfluss auf die EC-Aktivierung über Hochregulation des Oberflächenproteins ICAM1 auch Einfluss auf die parazelluläre Passage von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke haben könnte.

Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst die Transkription des *Cldn5*-Gens, dessen Produkt CLDN5 als TJ-Protein eine besonders hohe Dichtigkeit zwischen benachbarten EC herstellt [11, 17], mittels relativer Quantifizierung (qPCR) im Verlauf der DOG4-Infektion in den verschiedenen Hirnbereichen analysiert (Abb. 20) und die Ergebnisse mit der Transkription der Gene *Adm*, *Ramp2* und *Ramp3* (siehe Abb. 5), sowie mit der Anzahl der VG (siehe Abb. 6) korreliert (Tab. 13).

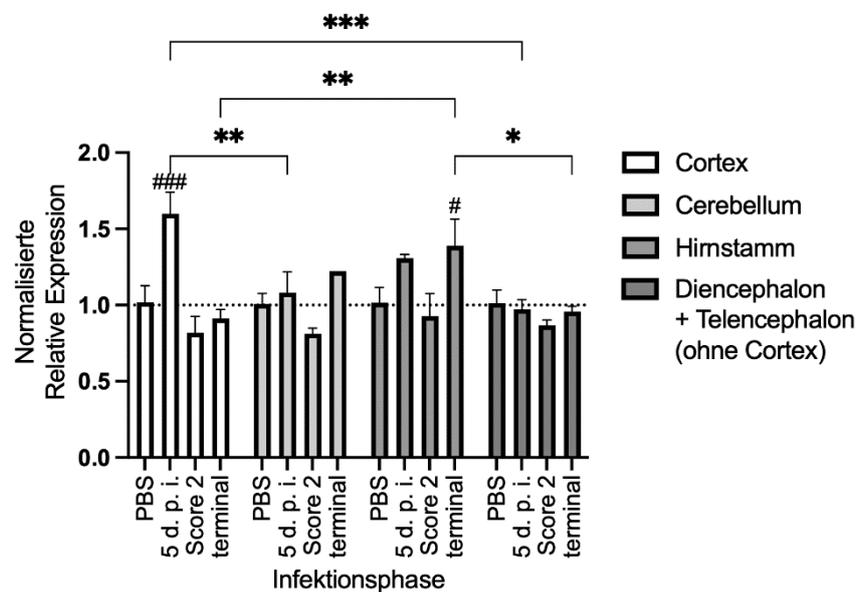


Abb. 20: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von *Cldn5* nach i. m. DOG4-Inokulation.

Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM mit $n = 4$ für alle Gewebe außer Cb 5 d. p. i. ($n = 3$) und terminal ($n = 1$). Mit der ROUT-Methode ($Q = 1\%$) wurden keine Ausreißer detektiert. Anschließend wurde ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk durchgeführt, dann eine zweifaktorielle ordinary ANOVA zum Test auf Effekte der Hirnregion (Ctx, Cb, Hirnstamm, De/Te (ohne Ctx)) und Infektionsphase (5 d. p. i., Score 2, terminal, PBS-inokulierte Kontrolltiere). Es folgte zum Test auf Einfluss der Hirnregion (für alle möglichen Vergleiche) ein Posttest nach Tukey; *, angepasster p-Wert $\leq 0,05$; **, angepasster p-Wert $\leq 0,01$; ***, angepasster p-Wert $\leq 0,001$; bzw. ein Posttest nach Dunnett zum Test auf Einfluss der Infektionsphase (5 d. p. i./ Score 2/ terminal vs. PBS); #, angepasster p-Wert $\leq 0,05$; ###, angepasster p-Wert $\leq 0,001$.

Abkürzungen: Cb, Cerebellum/Kleinhirn; *Cldn5*, Claudin 5; Ctx, Cortex; De/Te (ohne Ctx), Diencephalon und Telencephalon ohne Cortex; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums); 5 d. p. i., 5 dies post infectionem (Inkubationsphase).

Tab. 13: Korrelation der relativen mRNA-Expression der Gentranskripte von *Cldn5* mit *Adm*, *Ramp2*, *Ramp3* und der Viruslast (*n_{VG}*)

	NRQ _{Cldn5} in	n	Korrelation der log-transformierten Daten		
			R ²	P-Wert	Signifikanz
NQR _{Adm}	Ctx	16	0,0003	0,9502	n. s.
	Cb	12	0,0710	0,4025	n. s.
	Hirnstamm	16	0,0020	0,8691	n. s.
	De/Te (ohne Ctx)	16	0,0272	0,5420	n. s.
NQR _{Ramp2}	Ctx	16	0,0399	0,4585	n. s.
	Cb	12	0,0200	0,6612	n. s.
	Hirnstamm	16	0,0520	0,3957	n. s.
	De/Te (ohne Ctx)	16	0,1585	0,1267	n. s.
NQR _{Ramp3}	Ctx	16	0,5514	0,0018	**
	Cb	12	0,1199	0,2702	n. s.
	Hirnstamm	16	0,0905	0,2575	n. s.
	De/Te (ohne Ctx)	16	0,2993	0,0283	*
<i>n_{VG}</i>	Ctx	16	0,1324	0,1659	n. s.
	Cb	12	0,0133	0,7208	n. s.
	Hirnstamm	16	0,0002	0,9570	n. s.
	De/Te (ohne Ctx)	16	0,0058	0,7793	n. s.

n = Anzahl der NRQ-Paare (NRQ_{Cldn5} + NRQ_{Adm/Ramp2/Ramp3} bzw. *n_{VG}*). Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurden keine Ausreißer detektiert. Anschließend wurde mit dem D'Agostino- und Pearson-Test die Normalverteilung der logarithmisch-transformierten Daten bestätigt. *, signifikant; **, hoch signifikant. Abkürzungen: Adm, Adrenomedullin; Cb, Cerebellum/Kleinhirn; Cldn5, Claudin 5; Ctx, Cortex; De/Te (ohne Ctx), Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex; NRQ, Gentranskripte (normalisierte relative Mengen); n. s., nicht signifikant; *n_{VG}*, Viruslast; Ramp, Receptor activity-modifying protein; R², Pearson Korrelationskoeffizient; VG, Virusgenomäquivalente.

Die Analysen (Abb. 20) zeigen, dass *Cldn5* nach Inokulation mit dem hochpathogenen DOG4-Virus zunächst in der präsymptomatischen Infektionsphase (5 d. p. i.) in allen Hirnbereichen mit Ausnahme des Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex verstärkt transkribiert wurde. Im weiteren Krankheitsverlauf (Score 2) wurde dann eine verminderte *Cldn5*-Expression in allen Hirnbereichen gemessen, bevor im Kleinhirn und Hirnstamm in der terminalen Erkrankungsphase eine deutlich erhöhte *Cldn5*-Expression und damit eine verstärkte parazelluläre Ausstattung mit, die Blut-Hirn-Schranke abdichtenden, TJ detektierbar war.

Es konnten also im zeitlichen Verlauf der DOG4-Infektion spezifische Veränderungen der *Cldn5*-Expression nachgewiesen werden, für die es aber noch fraglich war, ob sie im Zusammenhang mit dem Neuropeptid ADM oder seinen Rezeptorkomponenten standen und den parazellulären Transport in infizierten Bereichen einschränkten.

Die Regressionsanalysen (Tab. 13) ergaben, dass die *Cldn5*-mRNA-Expression am stärksten mit der *Ramp3*-mRNA-Expression im Cortex ($R^2 = 0,5514$) bzw. im Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex ($R^2 = 0,2993$) korrelierte. Dahingegen zeigte sich jedoch weder ein Zusammenhang mit *Adm* bzw. *Ramp2*, noch eine relevante Veränderung der *Cldn5*-Transkription im Kleinhirn, das bereits durch die stärkste *Adm*- und *Ramp2*-Hochregulation als der in dieser Hinsicht relevanteste Ort unter den untersuchten Regionen im RABV-infizierten Hirn identifiziert wurde.

Da in vorausgegangenen Studien davon berichtet worden ist, dass die Barrierefunktion von TJ wie CLDN5 nicht unbedingt durch dessen mRNA- oder Proteinspiegel bedingt ist, sondern vielmehr durch seine Proteinkonformation [95, 127], wurde in einem nächsten Schritt mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen CLDN5 untersucht, ob das TJ-Protein in Regionen mit hoher ADM- bzw. RAMP2-Expression, also vorwiegend zu Beginn der symptomatischen DOG4-Infektion in RABV IR⁺ Regionen, in einer anderen molekularen Struktur vorlag, als in Regionen mit einer nur geringen Expression dieser zwei Moleküle. Dabei soll eine lineare Form der TJ zu einer Zunahme der Dichtigkeit, eine ‚Zig Zag‘-Konformation zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke führen [95, 127, 226]. Um einen möglichen Zusammenhang von Veränderungen des parazellulären Transportweges über die Blut-Hirn-Schranke mit der Aktivierung der für den transzellulären Transport verantwortlichen EC zu untersuchen, wurde eine Komarkierung von ICAM1 vorgenommen. Der räumliche Fokus lag dabei auf den Bereich der Kleinhirnrkerne (RABV IR⁺) und des angrenzenden Marklagers (RABV IR⁻) (Abb. 21 und 22).

Nach den Vorüberlegungen war hier zu erwarten, dass vorwiegend eine Abnahme des Zig Zag-Indexes von CLDN5 und damit eine verringerte parazelluläre Durchlässigkeit über die Blut-Hirn-Schranke in DOG4-infizierten Tieren zu Beginn der symptomatischen Phase (Score 2) und nicht im terminalen Stadium zu erwarten sei, wo bisher die höchsten ADM- bzw. RAMP2-Expressionen nachgewiesen werden konnten.

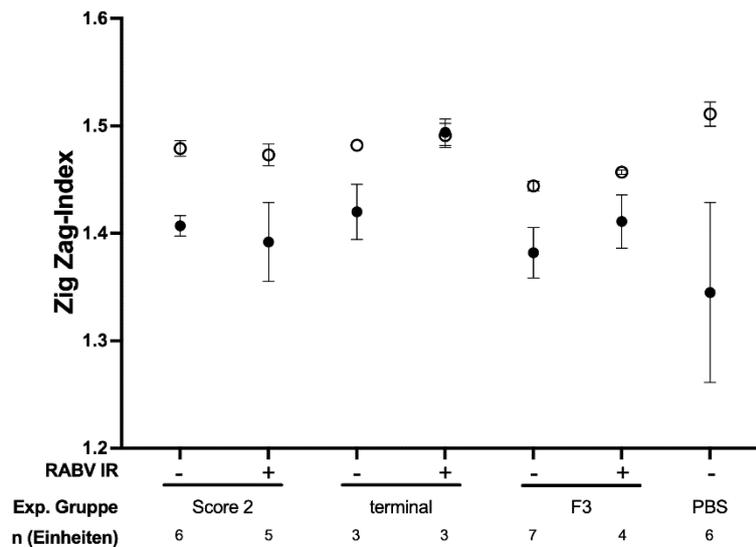


Abb. 21: Semiquantitative Messung des CLDN5-Zig Zag-Indexes in Abhängigkeit von der lokalen ICAM1-Anwesenheit in RABV IR⁺ und RABV IR⁻ Bereichen des Kleinhirns nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3- Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist der Zig Zag-Index von CLDN5 nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen CLDN5 und ICAM1 bzw. RABV-N. Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Kategorisierung in RABV IR⁺ und RABV IR⁻ Auswertungseinheiten sowie eine räumliche Differenzierung in ICAM1 IR⁺ (schwarze Kreise) und IR⁻ Bereiche (weiße Kreise) vorgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (3 – 7), wobei der Mittelwert jeder Auswertungseinheit, z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli, aus 22 bis 54 Bildern berechnet wurde. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurden sechs Ausreißer detektiert und ausgeschlossen. Anschließend folgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und eine zweifaktorielle ordinary ANOVA zur Analyse von Effekten der Experimentgruppe (p-Wert > 0,05) und der lokalen Anwesenheit von ICAM1 IR (p-Wert = 0,0004). Schließlich folgte ein Posttest nach Šidák zum Test auf Einfluss der Experimentgruppen.

Abkürzungen: CLDN5, Claudin 5; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; ICAM1, Intercellular adhesion molecule 1; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; RABV-N, RABV-Nukleoprotein; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

Die Ergebnisse in Abb. 21 zeigen, dass der Zig Zag-Index von CLDN5 in allen Experimentgruppen in unmittelbarer Nähe zu ICAM1 geringer war als in dessen Abwesenheit. So war dieser in Bereichen mit ICAM1 IR im Score 2 sowohl in unmittelbarer RABV-Nähe als auch außerhalb dieser 5 %, bei terminal infizierten Tieren (RABV IR⁻) 4 %, in der F3-Gruppe 3 % (RABV IR⁺) bzw. 4 % (RABV IR⁻) und bei PBS-Tieren 10 % niedriger als außerhalb ICAM1 IR⁺ Regionen. Eine Ausnahme stellt das terminale Erkrankungsstadium der DOG4-Infektion dar, wo in RABV IR⁺ Regionen keine Unterschiede gezeigt werden konnten.

Die Nähe zu RABV-infizierten Zellen schien in den anderen Gruppen bezüglich der Veränderung der CLDN5-Konformation keine Rolle zu spielen. Interessanterweise deutete sich aber an, dass CLDN5 in RABV-infizierten Tieren in Bereichen, wo keine EC-Aktivierung gemessen wurde in einem etwas höheren Anteil in Zig Zag-Konformation vorlag und das Endothel damit dort tendenziell hinsichtlich seiner parazellulären Eigenschaften durchlässiger gewesen sein sollte. In direkter Nähe zu aktivierten EC mit

erhöhter ICAM1-Expression war im Vergleich zu Kontrolltieren jedoch in allen Infektionsmodalitäten eine Verminderung der Zig Zag-Struktur von CLDN5 zu messen. Am geringsten veränderte sich die CLDN5-Konformation dabei im frühen symptomatischen Stadium der DOG4-Infektion (Score 2). Schließlich stellte sich eine je nach Nähe zu aktivierten EC differenzierte Regulation der Konformationsänderung im Vergleich von infizierten zu Kontrolltieren dar.

Bislang konnte also, entgegen der Erwartungen, kein direkter Zusammenhang der CLDN5-Struktur mit dem ADM/RAMP2-Signalweg im RABV-infizierten Maushirn gezeigt werden. Da es aber im terminalen Erkrankungsstadium der DOG4-Infektion in der Nähe zu RABV-infizierten Zellen keinen wesentlichen Unterschied der Konformation von CLDN5 in An- bzw. Abwesenheit von ICAM1 gab, schloss sich die Frage an, inwiefern die CLDN5-Konformationsänderung von der Präsenz von ICAM1 abhängt.

Abb. 22 verdeutlicht, dass sich im RABV-infizierten Kleinhirn in allen Gruppen das Verhältnis der beiden CLDN5-Konformationen in unmittelbarer Nähe von ICAM1-exprimierendem aktiviertem Endothel in Relation zu Bereichen, in denen keine EC-Aktivierung vorlag, von einer überwiegend linearen vermehrt zu einer Zig Zag-Form veränderte. Das bedeutet, dass in Bereichen mit erhöhter transzellulärer Permeabilität durch EC-Aktivierung eine Erhöhung der parazellulären Durchlässigkeit anzunehmen ist. Eine Ausnahme dessen wurde im terminalen Stadium in RABV-positiven Regionen nach Inokulation des hochpathogenen DOG4-Virus beobachtet, wo es im Vergleich zu RABV-negativen Bereichen sogar signifikant weniger Konformationsänderungen von CLDN5 gab.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Permeabilitätsänderungen der Blut-Hirn-Schranke im RABV-infizierten Kleinhirn sowohl über Aktivierung der EC durch Hochregulation ihrer ICAM1-Expression als auch über Regulationen des parazellulären Weges über Konformationsänderungen von CLDN5 stattfanden. Einen unmittelbaren Zusammenhang von CLDN5 mit einer gesteigerten ADM- bzw. RAMP2-Expression konnte hingegen nicht direkt bestätigt werden.

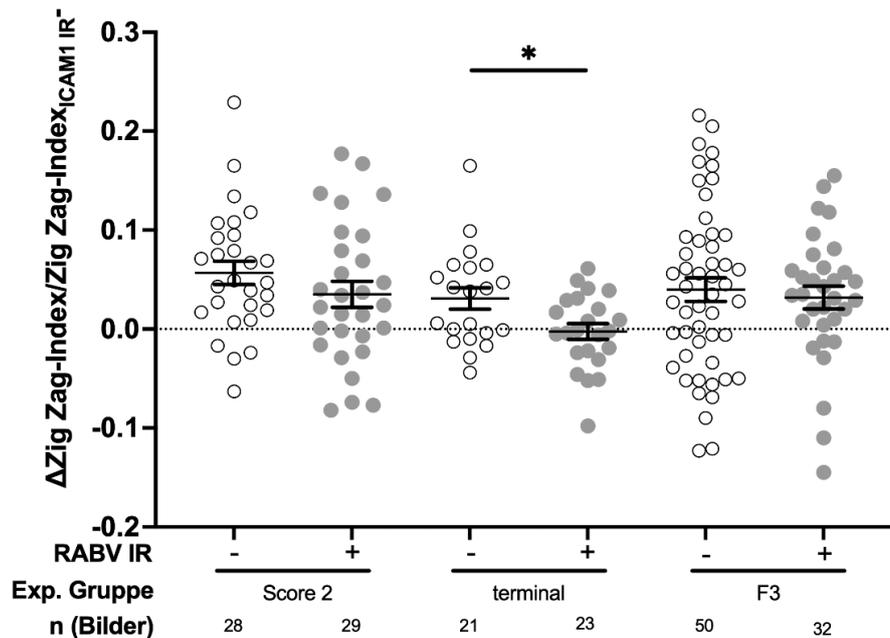


Abb. 22: Änderung des CLDN5-Zig Zag-Indexes in Abhängigkeit von der ICAM1-Präsenz nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) sowie i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist das Verhältnis des CLDN5-Zig Zag-Indexes in ICAM1 IR⁺ zu ICAM1 IR⁻ Bereichen nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen CLDN5 und ICAM1 als Streudiagramm der Mittelwerte \pm SEM als Linien. Die Punkte repräsentieren die Differenz zwischen dem Mittelwert des Zig Zag-Indexes von CLDN5-Signalen in unmittelbarer ICAM1-Nähe (IR⁺) bzw. in dessen Abwesenheit (IR⁻) (Δ Zig Zag-Index_{ICAM1 IR-} = \text{Zig Zag-Index}_{\text{ICAM1 IR-}} - \text{Zig Zag-Index}_{\text{ICAM1 IR+}}) in Relation zu seinem Mittelwert in ICAM1 IR⁻ Bereichen. n, Anzahl der Bilder (21 – 50). Alle Bilder wurden aus Regionen der CbNcll (RABV IR⁺) oder des unmittelbar angrenzenden Kleinhirnmarklagers (RABV IR⁻) angefertigt, wobei die An- bzw. Abwesenheit von Virus durch Immunfärbung gegen RABV RNP auf direkten Folgegewebeschnitten überprüft wurde. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurde ein Ausreißer detektiert und ausgeschlossen. Es folgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk. Um Unterschiede zwischen den lokalen Veränderungen des CLDN5-Zig Zag-Indexes in Anwesenheit von ICAM1 und in Abhängigkeit der lokalen RABV-Anwesenheit zu detektieren wurde ein ungepaarter T-Test für jede Experimentgruppe durchgeführt (*, p-Wert < 0,05).}

Abkürzungen: CbNcll, Kleinhirnkerne; CLDN5, Claudin 5; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; ICAM1, Intercellular adhesion molecule 1; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; RNP, Ribonukleoprotein; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

7.5.3 Immunzellpassage über die Blut-Hirn-Schranke

Im RABV-infizierten Kleinhirn wurde also bei Erreichen erster Krankheitszeichen (Score 2) ADM vor allem in direkter RABV-Nähe, RAMP2 hingegen virusstammabhängig nach DOG4-Inokulation hochreguliert. In Bezug auf die Blut-Hirn-Schranke zeigte sich insgesamt eine EC-Aktivierung durch eine ICAM1-Hochregulation, die in der durch das ADM/RAMP2-System am stärksten beeinflussbaren Kleinhirnregion, nämlich der Rinde deutlich geringer ausfiel als in den Kerngebieten. Was die parazelluläre Passage über die Blut-Hirn-Schranke via Regulation des TJ-Proteins CLDN5 anbelangt, war in RABV IR⁺ Bereichen – wo eine ADM-Hochregulation gemessen wurde – im terminalen Erkrankungsstadium nach DOG4-Inokulation und in der Nähe von aktivierten EC verhältnismäßig weniger Konformationsänderung von CLDN5 zu seiner Zig Zag-Form als außerhalb aktivierter EC festzustellen. Als Konsequenz war also in der Kleinhirnrinde

im Score 2 weniger Immunzelldiapedese ins Hirnparenchym zu erwarten. Von Interesse war hier außerdem, ob ein solcher Effekt auf die Immunzelldiapedese auch im terminalen Erkrankungsstadium der DOG4-Infektion zu sehen sein würde. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde eine IHC DAB/Nickel-Färbung gegen den T-Zell-Marker CD3, sowie auf benachbarten Gewebeschnitten gegen RABV-N durchgeführt. Anschließend wurden jeweils die zwei benachbarten Schnitte parallel betrachtet, um eine qualitative Auswertung der T-Zell-Diapedese vorzunehmen. Abb. 23 verdeutlicht exemplarisch den räumlichen Zusammenhang durch die digitale Überlagerung der im Schnitt rot dargestellten RABV-N-Signale und die am Nachbarschnitt vorgenommenen manuellen Markierungen von CD3-Signalen (eingezeichnete Kreise).

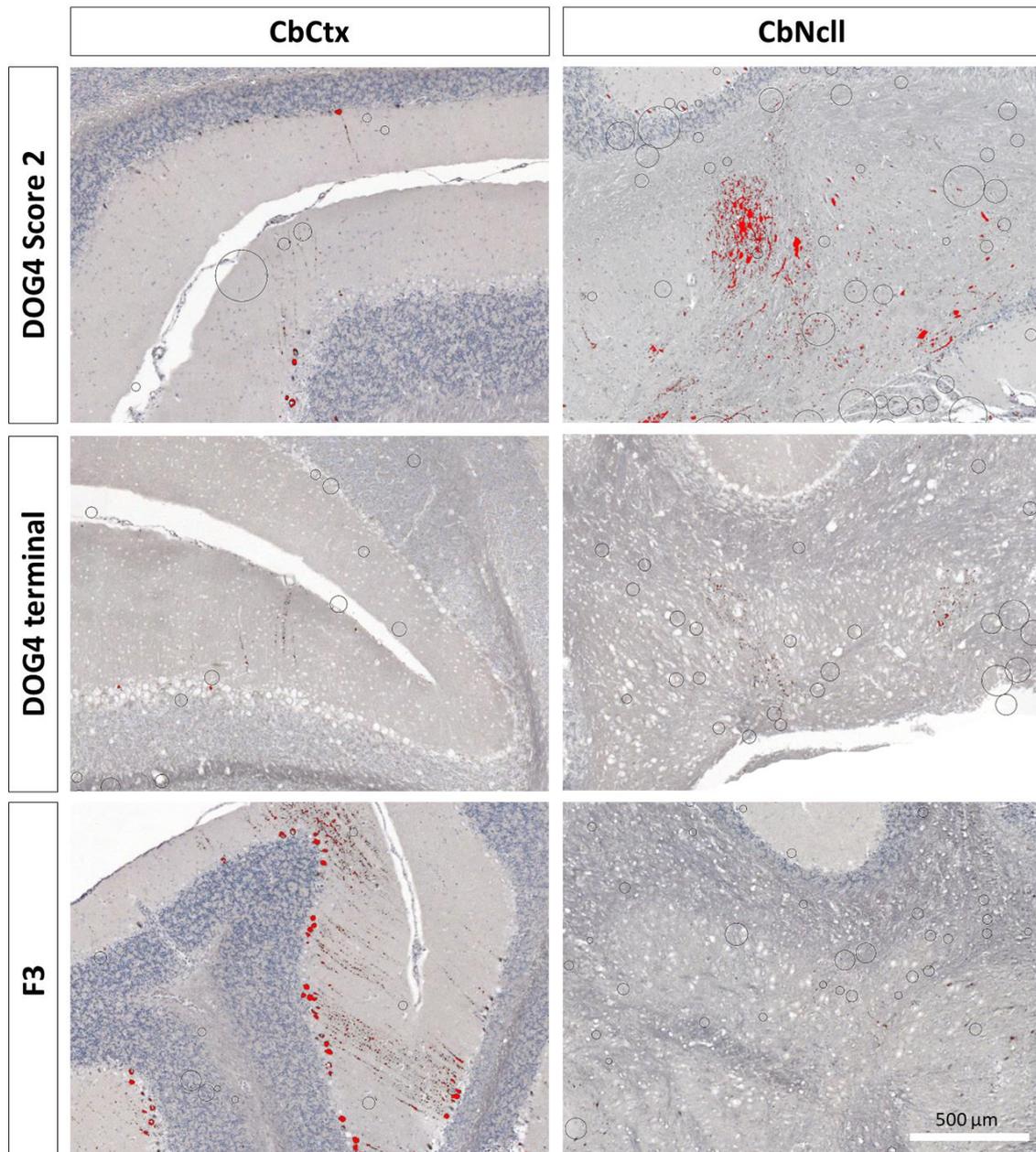


Abb. 23: Repräsentative Darstellung von T-Zellen und RABV im Kleinhirn nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Es wurde eine IHC DAB/Nickel-Färbung gegen CD3 (T-Zellmarker) und RABV RNP auf benachbarten Gewebeschnitten durchgeführt. Die RNP-Signale wurden durch Bildbearbeitung rot dargestellt. Die markierten T-Zellen wurden am Mikroskop detektiert und manuell auf dem jeweiligen dazugehörigen RNP-Bild durch Kreise repräsentiert. Je mehr T-Zellen an einer Stelle zu erkennen waren, desto größer wurde der Radius des Kreises an der entsprechenden Stelle im RNP-Bild.

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkerne; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; RABV, Rabiesvirus; RNP, Ribonukleoprotein; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

Nach qualitativer Analyse der Immunzellinfiltration zeigte sich, dass in gesunden Kontrolltieren keine einzige T-Zelle im Kleinhirnparenchym detektiert werden konnte. Bei Infektion mit DOG4 sowie F3 waren jedoch eindeutig CD3-Signale im Kleinhirn auszumachen. Generell konnte nach Inokulation mit dem apathogenen F3-Virus eine

stärkere T-Zell-Invasion im Randbereich der Kerngebiete beobachtet werden als nach DOG4-Inokulation. In den Kernen wurde im Übrigen auch deutlich weniger F3-Virusantigen nachgewiesen. In der Kleinhirnrinde waren viele RABV-Signale, jedoch eher weniger Immunzellen nachweisbar. Während der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus war das RABV in den Kleinhirnkernen in sehr unterschiedlichem Ausmaß detektierbar. CD3⁺ T-Zell-Signale waren jedoch sowohl zu Beginn als auch im terminalen Stadium der Infektion zahlreich vorhanden. In der Rinde hingegen wurden relativ wenige RABV-infizierte Zellen und auch nur spärlich T-Zellen im Hirnparenchym identifiziert. Außerdem fiel auf, dass die CD3-Signale in beiden Kleinhirnregionen eher in Distanz von RABV-infizierten Zellen lokalisiert waren.

Um nun zu überprüfen, ob die durch das ADM/RAMP2-System bedingten Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke T-Zellen vor einem Übertritt aus dem Blutgefäßsystem ins Hirnparenchym hinderten, wurde nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung gegen den T-Zellmarker CD3 und den EC-Marker ICAM1 in verschiedenen Arealen des Kleinhirns die Anzahl von T-Zellen und ihre Lage in Bezug zu Blutgefäßen dokumentiert und gezählt (Tab. 14).

Die Quantifizierung ergab, dass die meisten T-Zellen nach F3-Inokulation nachweisbar waren. Im terminalen Stadium der DOG4-Infektion waren mit 165 T-Zellen mehr Immunzellen im RABV-infizierten Kleinhirn als im Score 2 mit 144 T-Zellen. Im Bereich der Kleinhirnerne, wo RABV-Signal zumeist deutlich detektierbar war, zeigten sich in allen Infektionsgruppen nur relativ wenige T-Zellen (2 % der T-Zellen in F3-Tieren, 4 % im Score 2 und 18 % in terminal infizierten Tieren), wohingegen im angrenzenden Marklager etwas mehr lokalisierbar waren (F3 16 %, Score 2 10 %, terminal 8 %). Darüber hinaus waren in allen Gruppen mit 82 % (F3), 85 % (Score 2) und 74 % (terminal) die meisten CD3⁺ T-Zellen im Bereich der Rinde zu messen. Insbesondere im Stratum granulare der Kleinhirnrinde waren mit 56 % (F3), 80 % (Score 2) und 61 % (terminal) besonders viele CD3-Signale lokalisiert. Zudem fiel auf, dass bei der F3-Infektion der größte Anteil der T-Zellen (40 %) intravasal verblieb und vergleichsweise etwas weniger T-Zellen aus dem Blutgefäßsystem über die Blut-Hirn-Schranke ins Hirnparenchym austraten (31 %). Bei der DOG4-Infektion hingegen war häufiger ein Übertritt von T-Zellen aus den Blutgefäßen (intravasal: 19 % der T-Zellen im Score 2 bzw. 36 % im terminalen Stadium) ins Parenchym (extravasal: 57 % im Score 2 bzw. 35 % im terminalen Stadium) zu verzeichnen.

Die Ergebnisse zeigen also, dass trotz des möglichen negativen Einflusses von ADM auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke im Bereich der RABV-infizierten Kleinhirnrinde

im Vergleich von hochpathogenem DOG4- zu apathogenem F3-Virus eine Immunzellinfiltration stattfand.

Tab. 14: Prozentualer Anteil an intra-, juxta- und extravasalen T-Zellen im RABV-infizierten Kleinhirn

Hirnregion	Bezug zu Blutgefäßen	F3 n = 185 Zellen [%]	DOG4 Score 2 n = 144 Zellen [%]	DOG4 terminal n = 165 Zellen [%]
Marklager	Intravasal	6	4	6
	Juxtavasal	5	1	1
	Extravasal	5	5	1
CbNcll	Intravasal	0	3	6
	Juxtavasal	2	1	10
	Extravasal	0	1	2
CbCtx, Stratum granulare	Intravasal	25	9	18
	Juxtavasal	16	22	14
	Extravasal	15	49	29
CbCtx, Stratum moleculare	Intravasal	9	3	6
	Juxtavasal	6	0	4
	Extravasal	11	2	3
Gesamt	Intravasal	40	19	36
	Juxtavasal	29	24	29
	Extravasal	31	57	35

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkerne; F3, CVS-F3; n, Anzahl der CD3-positiven Zellen; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

7.5.4 Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke: Intra- und extravasales Albumin

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass das ADM/RAMP2-System im Rahmen der RABV-Infektion vorwiegend im Bereich der Kleinhirnrinde Effekte bedingt, die vor allem auf eine verminderte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke hinzielen: Weniger ICAM1-Expression während der DOG4-Infektion und weniger Konformationsänderungen von CLDN5 im terminalen DOG4-Erkrankungsstadium. Jedoch waren erstaunlicherweise bei der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus mit 57 % (Score 2) bzw. 34 % (terminal) deutlich mehr CD3⁺ T-Zellen nach

extravasal ins Parenchym gelangt als bei der Infektion mit dem apathogenen F3-Virus (31 %) (vgl. Tab. 14).

Um nun zu eruieren, ob die beobachteten Effekte am Endothel, die in Zusammenhang mit der Regulation von ADM und RAMP2 standen, sich eher auf den Übertritt von z. B. löslichen Stoffen oder Entzündungsmediatoren ins Parenchym auswirken, wurde eine IHC DAB/Nickel-Färbung gegen das im Blut ubiquitär vorkommende Plasmaprotein Albumin durchgeführt und dessen intra- (Abb. 24) und extravasale (Abb. 25) Verteilung quantifiziert. In Abb. 26 sind repräsentative Fotos der DAB/Nickel-Färbung gegen Albumin dargestellt.

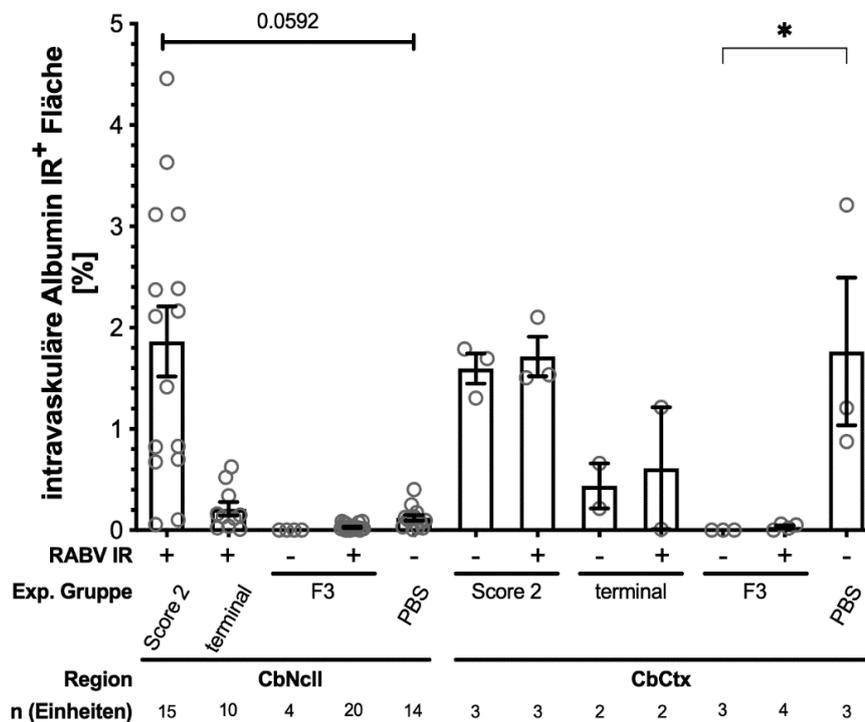


Abb. 24: Quantifizierung der Albumin IR⁺ Fläche in Gefäßen innerhalb der Kleinhirnerne und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist der durchschnittliche prozentuale Anteil der intravasalen Albumin IR⁺ Fläche pro Auswertungseinheit (z.B. linker Nucleus lateralis cerebelli), gemittelt aus einem bis vier Bildern, nach DOG4- (Score 2 und terminal) und F3-Inokulation sowie in Kontrolltieren (PBS) nach IHC DAB/Nickel-Färbung gegen Albumin (graue Kreise). Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Differenzierung in RABV IR⁺ und RABV IR⁻ Bereiche vorgenommen. Die Balken repräsentieren die Gruppenmittelwerte ± SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 20), z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli. Mit der ROUT-Methode (Q = 1 %) wurden drei Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen. Es folgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk, anschließend ein Kruskal-Wallis-Test zum Test auf Gruppenvarianzen (p-Wert < 0,0001), ein Dunn-Test für multiple Vergleiche zum Test auf Einfluss der Infektion selbst (DOG4 bzw. F3 vs. PBS), der Infektionsphase (Score 2 vs. terminal), des Virusstammes zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (terminal vs. F3 8 d. p. i.), der Rolle der Region (CbNcl vs. CbCtx) und der lokalen Virusanwesenheit (RABV IR⁻ vs. RABV IR⁺) für die im Kruskal-Wallis-Test detektierten Unterschiede (*, angepasster p-Wert ≤ 0,05).

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcl, Kleinhirnerne; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

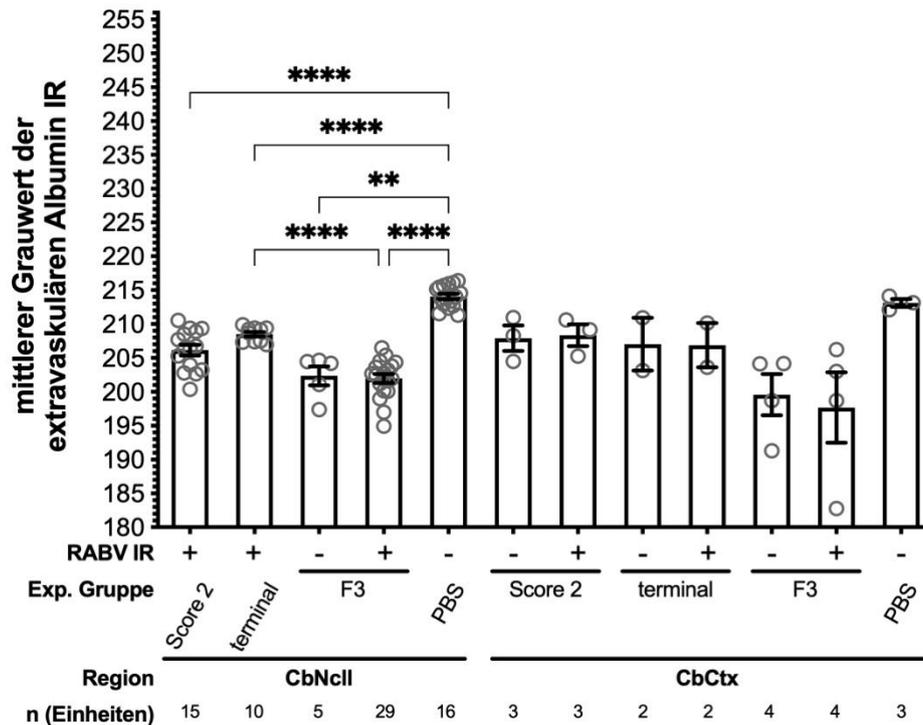


Abb. 25: Mittlerer Grauwert der extravasalen Albumin IR⁺ Fläche in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal; i. m.) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.).

Dargestellt ist der mittlere Grauwert (Werte zwischen 0 (schwarze Färbung) bis 256 (keine Färbung)) des extravasalen Parenchyms nach IHC DAB/Nickel-Färbung gegen Albumin pro Auswertungseinheit (z.B. linker Nucleus lateralis cerebelli), gemittelt aus einem bis vier Bildern (graue Kreise), nach DOG4- (Score 2 und terminal) und F3-Inokulation sowie in Kontrolltieren (PBS). Je Region und Erkrankungsstadium wurde eine Differenzierung in RABV IR⁺ und RABV IR⁻ Bereiche vorgenommen. Die Balken repräsentieren die Gruppenmittelwerte \pm SEM; n, Anzahl der Auswertungseinheiten (2 – 29), z. B. linker Nucleus lateralis cerebelli. Mit der ROUT-Methode ($Q = 1\%$) wurde kein Ausreißer detektiert. Es erfolgte ein Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk und Varianzhomogenität nach Brown-Forsythe. Anschließend wurde eine Welch-ANOVA-Test zum Vergleich der Gruppenmittelwerte ($p < 0,0001$) sowie ein Dunnett T3-Test für multiple Vergleiche zum Test auf Einfluss der Infektion selbst (DOG4 bzw. F3 vs. PBS), der Infektionsphase (Score 2 vs. terminal), des Virusstammes zu einem vergleichbaren Zeitpunkt (terminal vs. F3 8 d. p. i.), der Rolle der Region (CbNcll vs. CbCtx) und der lokalen Viruspräsenz (RABV IR⁻ vs. RABV IR⁺) für die im Welch-ANOVA-Test detektierten Unterschiede durchgeführt (**, angepasster p-Wert $\leq 0,01$; ****, angepasster p-Wert $< 0,0001$).

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

	Score 2	terminal	F3	PBS	
Intravasales Albumin	1,71 % Ø 1,71 %	0,2 % Ø 0,2 %	0,04 % Ø 0,04 %	0,1 % Ø 0,1 %	CbNcll
	1,99 % Ø 1,65 %	0,69 % Ø 0,61 %	0,0 % Ø 0,0 %	1,88 % Ø 1,77 %	CbCtx
Extravasales Albumin	207 Ø 207	209 Ø 209	201 Ø 201	214 Ø 214	CbNcll
	209 Ø 209	207 Ø 207	201 Ø 201	213 Ø 213	CbCtx

Abb. 26: Intra- und extravasales Albumin in Kleinhirnkernen und -rinde nach i. m. DOG4- (Score 2 und terminal) und i. n. CVS-F3-Inokulation (8 d. p. i.) sowie in PBS-inokulierten Kontrolltieren.

Die repräsentativen Bilder der IHC DAB/Nickel-Färbung gegen Albumin stammen aus den Datensätzen von Abb. 24 und 25 und wurden in RABV IR⁺ Regionen (außer PBS) aufgenommen. Werte links oben = exakter Bildwert, Werte rechts oben = Durchschnittswert.

Abkürzungen: CbCtx, Kleinhirnrinde; CbNcll, Kleinhirnkern; d. p. i., dies post infectionem; F3, CVS-F3; IR, Immunreaktivität; RABV, Rabiesvirus; Score 2, Stadium Score 2 (erste spezifische Krankheitszeichen); terminal, terminales Stadium (Erreichen eines Abbruchkriteriums).

Die Ergebnisse aus Abb. 24 verdeutlichen, dass zunächst in gesunden Kontrolltieren in der Kleinhirnrinde 15-mal mehr intravasale Albumin IR⁺ Fläche gemessen wurde als in den Kleinhirnkernen. In allen anderen Gruppen gab es zwischen den beiden Regionen keine relevanten Differenzen. In den Kerngebieten zeigten sich jedoch in RABV IR⁺ Regionen im Score 2 der DOG4-Infektion eine auffallende Zunahme des intravasalen Albumins um das 16-Fache (p-Wert 0,0592). In der Rinde waren die intravasalen Albuminwerte im Score 2 in etwa so hoch wie in den Kontrolltieren. Im terminalen Stadium war dort mit einem Drittel (RABV IR⁺) bzw. einem Viertel der Albumin IR⁺ Fläche (RABV IR⁻) und noch mehr bei der F3-Infektion mit weniger als einem Hundertstel (RABV IR⁺) der Albumin IR⁺ Fläche im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren bzw. keinem Nachweis von IR (RABV IR⁻) deutlich geringere Werte gemessen worden.

In beiden Regionen zeigte sich im zeitlichen Verlauf der DOG4-Infektion eine Abnahme des intravasalen Albumins. Insgesamt fielen während der DOG4-Infektion größere

intravasale Albuminflächen auf als während der F3-Infektion. Insofern war also im Score 2 in beiden Kleinhirnregionen der DOG4-Infektion deutlich mehr intravasales Albumin als bei der F3-Infektion (in den Kleinhirnkernen 62-mal, in der Kleinhirnrinde über 57-mal mehr) zu sehen, darüber hinaus auch ähnlich hohe Werte in der Kleinhirnrinde wie bei den gesunden Kontrolltieren. Die Kleinhirnregion und die direkte Nähe zu RABV IR⁺ Bereichen schienen keinen Einfluss zu haben.

Abb. 25 ist zu entnehmen, dass die höchsten mittleren Grauwerte und somit die geringste extravasale Albuminfärbung in gesunden Kontrolltieren zu beobachten waren (Kerne 214,1; Rinde 213,1). Während der DOG4-Infektion zeigte sich in beiden Kleinhirnregionen im Vergleich zur Kontrollkohorte und insbesondere in den Kerngebieten mit statistischer Signifikanz eine Zunahme an extravasalem Albumin (entspricht einer Abnahme des mittleren Grauwertes). In den Kerngebieten ließ sich im Score 2 ein um 4 % und terminal ein um 3 % geringerer Grauwert messen als in der Kontrollgruppe. In der Rinde war im Score 2 jeweils ein ca. 2 % (RABV IR⁺ und RABV IR⁻), terminal jeweils ein ca. 3 % (RABV IR⁺ und RABV IR⁻) geringerer Grauwert vorhanden. Bei der F3-Infektion zeigten sich mit jeweils 6 % geringerem mittleren Grauwert in den Kerngebieten (RABV IR⁺ und RABV IR⁻) und 7 % (RABV IR⁺) bzw. 6 % (RABV IR⁻) in der Rinde im Vergleich zu PBS-inokulierten Tieren eine noch stärkere Zunahme des extravasalen Albumins.

Der zeitliche Verlauf der DOG4-Infektion, die Nähe zu RABV IR⁺ Regionen sowie die räumliche Differenzierung zwischen Kerngebieten und Kleinhirnrinde schienen dabei keine Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass zwar gerade zu Beginn der symptomatischen DOG4-Infektion im Vergleich zur F3-Infektion vermehrt intravasales Albumin innerhalb des Kleinhirns gemessen wurde, es aber gerade nach F3-Inokulation zu einem deutlich stärkeren Übertritt von Albumin nach extravasal ins RABV-infizierte Hirnparenchym kam. Bei der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus hingegen gelang sowohl zu Beginn als auch im späteren Verlauf der symptomatischen Erkrankungsphase nur verhältnismäßig wenig Albumin über die Blut-Hirn-Schranke ins Hirngewebe.

Insofern zeigen die Ergebnisse insgesamt, dass innerhalb des Kleinhirns ADM in RABV-Nähe und RAMP2 im Rahmen der DOG4-Infektion unabhängig vom Erkrankungsstadium hochreguliert wurden. Gerade innerhalb der Kleinhirnrinde wurde eine weniger starke EC-Aktivierung, festgemacht an der Expression von ICAM1, und im Bereich der Kleinhirnkern im terminalen Erkrankungsstadium weniger Konformationsänderungen von CLDN5 zur durchlässigeren Zig Zag-Struktur gemessen.

Obwohl während der DOG4-Infektion eine ausgeprägte Immunzellinfiltration ins RABV-infizierte Kleinhirn nachgewiesen wurde, konnte jedoch eindrücklich gezeigt werden, dass es nach DOG4-Inokulation zu einem eindeutig geringeren Übertritt des Plasmaproteins Albumin ins infizierte Hirnparenchym kam als nach F3-Inokulation. Somit könnte also ADM vielmehr den Übertritt von Plasmamolekülen wie Antikörpern oder Entzündungsmediatoren ins RABV-infizierte ZNS verringern.

8 Diskussion

8.1 Regulation des Neuropeptids Adrenomedullin im RABV-infizierten Hirn

In dieser Arbeit wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob es überhaupt im Rahmen der RABV-Infektion eine Regulation des Neuropeptids ADM gibt. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von *Adm* und seiner Rezeptorkomponente *Ramp2* während der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus im Maushirn, und dabei am stärksten im Kleinhirn, hochreguliert wurde. *Ramp3* und *Crlr* zeigten hingegen keine relevanten Expressionsveränderungen im Verlauf der DOG4-Infektion und über die verschiedenen Hirnbereiche hinweg. Darüber hinaus konnte im Kleinhirn auch eine Korrelation der *Adm*- und *Ramp2*-Expressionslevel mit der Anzahl viraler RABV-Genome nachgewiesen werden. Nicht nur die *Adm*-Genexpression, sondern auch die ADM-Proteinsekretion war im Kleinhirn sowohl in den Kerngebieten als auch in der Kleinhirnrinde bei der DOG4-Infektion und insbesondere in direkter räumlicher Nähe zu RABV-infizierten Zellen erhöht. Als ADM-sezernierende Zellen wurden hauptsächlich EC und zusätzlich RABV-infizierte Purkinjezellen identifiziert, was dem aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand entspricht [176].

Der weitere Fokus der Analysen wurde also auf die Regulation des Neuropeptids ADM mit seiner Rezeptorkomponente RAMP2 im RABV-infizierten Kleinhirn und seinen möglichen Auswirkungen auf zwei Proteine der Blut-Hirn-Schranke gelegt, die maßgeblich an deren Barrierefunktion beteiligt sind: ICAM1 und CLDN5. Die darüber regulierte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wurde hinsichtlich der Immunzellinvasion und des Übertritts löslicher Stoffe ins infizierte Hirn untersucht.

Aus der bisherigen wissenschaftlichen Literatur ist die Rolle von Neuropeptiden als (Co-) Neurotransmitter generell, sowie auch als Regulatoren von Signalwegen in neurotrophen Virusinfektionen gut bekannt (vgl. 4.4). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch im Rahmen der RABV-Infektion eines dieser Neuropeptide – ADM – hochreguliert wurde. Damit kann also der ADM-Signalweg als weiterer Bestandteil der hocheffizienten Pathogenitätsmechanismen des Virus angesehen werden.

Die Untersuchung der ADM-Rezeptorkomponente RAMP2 ergab, dass die stärkste Hochregulation der *Ramp2*-Genexpression auf das Vier- bis Achtfache in der symptomatischen Phase der DOG4-Infektion im Kleinhirn vorlag. Auf Proteinebene konnte die stärkste Hochregulation insbesondere zu Beginn der symptomatischen Phase in der Kleinhirnrinde gezeigt werden, wesentlich geringer fiel dessen Expression

im terminalen Stadium aus, wo durch fortschreitende Beeinträchtigung des Organismus Dysfunktionalitäten in der Proteinsynthese wahrscheinlich sind. Außerdem konnte während der F3-Infektion sogar eher eine Herunterregulation beobachtet werden. Die Hochregulation von RAMP2 nach der DOG4-Inokulation bestätigte sich also auf Proteinebene, jedoch nicht in dem aus den mRNA-Untersuchungen erwarteten Ausmaß. Diese Beobachtung war gewissermaßen zu erwarten, schließlich liegt dieser wahrscheinlich der Tatsache zugrunde, dass es zum methodischen Nachweis der ADM-Rezeptorkomponente RAMP2 einer konstitutiven Expression und Sekretion von ADM mit seiner nur sehr kurzen Plasmahalbwertszeit bedarf. Letztlich konnte gerade in der Infektionsmodalität des frühen symptomatischen Stadiums der DOG4-Infektion in der Kleinhirnrinde vom stärksten ADM/RAMP2-Signaling für die weiteren Untersuchungen ausgegangen werden.

Hinsichtlich der Versuchsdurchführungen der ADM- und RAMP2-Analysen müssen einige methodischen Limitationen und Herausforderungen angeführt werden:

Zur besseren Analyse der ADM-Wirkungen während der RABV-Infektion wäre der Vergleich zum *Adm*-Knockout interessant, jedoch nicht umsetzbar, da homozygotes *Adm*-Knockout nicht mit dem Leben vereinbar ist [26, 177]. Insofern wurde auf die Expression von ADM und seine Effekte unter unterschiedlichen Infektionsbedingungen (DOG4-Infektion in unterschiedlichen Krankheitsstadien und F3-Infektion) analysiert und mit PBS-inokulierten Tieren verglichen.

Außerdem muss bedacht werden, dass alle Gewebe aus einem drei Jahre zuvor abgeschlossenen Tierversuch stammten, was zum Ausschluss einiger mRNA-Proben aufgrund mangelhafter RNA-Qualität bzw. zu geringer RNA-Menge führte.

Eine Herausforderung bei den Untersuchungen auf Proteinebene stellte insbesondere der immunhistochemische Nachweis von ADM und RAMP2 auf den Hirnschnitten dar. Testfärbungen auf Gewebeschnitten ADM- und RAMP2-reicher Organe wie z. B. der Lunge mit den gleichen Antikörpern und unter Verwendung desselben Protokolls gelangen dabei zweifelsfrei und konnten bereits bei niedrigen Vergrößerungen am Mikroskop identifiziert werden. Im Hirngewebe musste auch nach verschiedenen Protokolloptimierungen auf höhere Vergrößerungen zurückgegriffen werden. Bei den ADM-Färbungen zeigten sich so gut abgrenzbare Signale, dass diese für die Auswertungen der Untersuchungen verwendet werden konnten. Bei den RAMP2-Färbungen waren die Bedingungen für die Auswertung erschwert, da trotz Antigendemaskierung mit Proteinase-K-Verdau und Tyramid-Verstärkung im Hirngewebe durchweg eine starke unspezifische Hintergrundfärbung vorhanden war. Es konnte jedoch trotz allem eine valide quantitative Analyse der RAMP2-Proteinlevel

durchgeführt werden. Ein mögliches Hindernis für die Anfärbbarkeit der beiden Antigene mit den verwendeten Antikörpern könnte in der Fixierungsmethode liegen: Wo in Testfärbungen PFA-fixiertes Gewebe verwendet wurde und klare Signale beider Antikörper nachweisbar waren, musste für die finalen Färbungen aufgrund der beschränkten Probenanzahl auf mit Bouin-Hollande-Lösung fixiertes Gewebe zurückgegriffen werden. Während sich RAMP2-Signale in den vorherigen Testfärbungen auf PFA-fixiertem Hirngewebe zwar deutlich schwächer als auf Lungengewebe darstellten, aber dennoch vor allem im Plexus choroideus, der Pia mater und in größeren Gefäßen eindeutig abgrenzbar waren, konnten diese Resultate nicht auf die Gewebeschnitte nach Bouin-Hollande-Fixierung übertragen werden, da das Rausch-Signal-Verhältnis sehr viel höher war. Auch in einer anderen Studie wurde bereits die Verwendung des Bouin-Hollande-Fixativs bei nachfolgender immunhistochemischen Färbemethodik als problematisch postuliert [10]. Möglicherweise könnte auch Paraffin als Einbettmedium die optimale Antigen-Antikörper-Interaktion beeinträchtigen, indem dadurch ggf. auch nach Entparaffinierungs- und Antigendemaskierungsschritten die Antigene für Antikörper schlechter zugänglich waren.

Über generelle Schwierigkeiten für den Nachweis von ADM mit immunhistochemischen Methoden wurde in der wissenschaftlichen Literatur bereits berichtet: Neben seiner mit 22 Minuten sehr kurzen Plasmahalbwertszeit nach Sekretion [137] könnte auch die fehlende intrazelluläre Speicherung die Qualität der Methodik beeinträchtigen [100], beruht doch die IHC auf einer Antikörperbindung an konstant im Gewebe vorhandene Antigene. Insofern bestätigte auch diese Arbeit die Hypothese, dass die IHC nur einen Bruchteil des exprimierten ADM erfassen kann und die so quantifizierte Proteinexpression eher unterschätzt wird.

Dennoch konnte im frühen symptomatischen Stadium der DOG4-Infektion mehr ADM- und RAMP2-Expression im Kleinhirn nachgewiesen werden. Daher wurde der räumliche Fokus für die weiteren Untersuchungen der ADM/RAMP2-Effekte im Kontext einer RABV-Infektion auf das Kleinhirn gelegt.

8.2 Regulation des transzellulären Passagewegs der Blut-Hirn-Schranke über Endothelzellaktivierung durch das ADM/RAMP2-System im RABV-infizierten Kleinhirn

Für die Einwanderung von Zellen ins ZNS ist zunächst eine Aktivierung der die Blut-Hirn-Schranke auskleidenden EC durch die Expression von Adhäsions- und Oberflächenproteinen wie ICAM1 notwendig. Bei dem komplexen Prozess der transzellulären Immunzellmigration interagieren im Blut zirkulierende Immunzellen mit

ICAM1, was das sogenannte Crawling an der EC-Oberfläche und den weiteren Migrationsprozess über die Blut-Hirn-Schranke initiiert [49, 184]. Es ist offensichtlich, dass also eine veränderte ICAM1-Expression Migrationsprozesse über die Blut-Hirn-Schranke beeinflusst [184], so wie das im Rahmen pathophysiologischer Situationen zu beobachten ist. Eine durch die Hochregulation von ICAM1 gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen ist nicht nur bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen, sondern auch bei zerebralen Virusinfektionen, wie zum Beispiel bei der experimentellen Infektion von Mäusen mit dem apathogenen RABV F3 bekannt [18, 157].

Das Neuropeptid ADM beeinflusst die Expression von ICAM1 und weiteren für die transzelluläre Migration spezialisierten Oberflächenproteinen wie VCAM1 und Selectin E, indem es diese supprimiert [93]. Somit kann ADM also eine entscheidende Stelle für Immunzellanhaftung und -diapedese über die Blut-Hirn-Schranke negativ beeinflussen.

Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die im frühen symptomatischen Erkrankungsstadium der DOG4-Infektion beobachtete Regulation des ADM/RAMP2-Systems im Kleinhirn Auswirkungen auf die dortige ICAM1-Expression der EC und damit im Weiteren auf transzelluläre Migrationsprozesse von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke hatte. Die Grundvoraussetzung für einen möglichen Zusammenhang, nämlich die Expression des auto- und parakrin wirkenden Neuropeptids ADM im Kleinhirn durch EC, konnte zunächst als erfüllt bestätigt werden.

Prinzipiell war im Kleinhirn sowohl bei der DOG4- als auch F3-Infektion eine Hochregulation der ICAM1-Proteinexpression im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren zu sehen, was auch von anderen zerebralen Virusinfektionen bekannt ist. Dieser Effekt war in den Kleinhirnkerngebieten deutlich stärker als in der Kleinhirnrinde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in der parakrinen Reichweite von ADM generell nach der RABV-Inokulation eine etwas stärkere ICAM1-Hochregulation erfolgte als außerhalb seiner Reichweite, was zunächst widersprüchlich zum aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand erscheint [93]. Dabei gilt jedoch prinzipiell zu bedenken, dass mehr ADM in RABV IR⁺ Regionen vorhanden war und damit auch innerhalb der parakrinen Reichweite von ADM eine Hochregulation von ICAM1 durch andere hier nicht untersuchte Mechanismen des RABV begünstigt sein könnten.

Betrachtet man die ICAM1-Veränderungen in unmittelbarer ADM-Nähe und in RABV IR⁺ Kleinhirnregionen, so sieht man dort nach DOG4- und F3-Inokulation Veränderungen der ICAM1-Expression. Gerade im terminalen Erkrankungsstadium der DOG4-Infektion war in Regionen mit unmittelbarer Nähe zu RABV-infizierten Zellen tendenziell eine weniger starke Veränderung der ICAM1-Expression festgestellt worden als außerhalb seiner direkten räumlichen Nähe und als in der F3-Infektion. Diese Beobachtung

unterstützt die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen der weniger starken ICAM1-Hochregulation im Wirkradius von ADM und dem hochpathogenen RABV bestehen könnte.

Zusammenfassend war also generell eine erhöhte ICAM1-Expression und damit eine Aktivierung der für die transzellulären Migration nötigen Oberflächenproteine auf EC der Blut-Hirn-Schranke nach RABV-Inokulation nachweisbar. Im Bereich der Kleinhirnrinde, wo nach den bisherigen Ergebnissen vom stärksten ADM/RAMP2-Signaling gerade zu Beginn der symptomatischen Erkrankungsphase nach DOG4-Inokulation auszugehen ist, fielen die ICAM1-Signale schwächer aus und könnten durchaus über diesen Mechanismus negativ beeinflusst worden sein. Außerdem war zu sehen, dass eine weniger starke Hochregulation von ICAM1 in ADM-Nähe von der direkten lokalen Nähe zu DOG4-infizierten Zellen abhängig sein könnte. Damit liegt der Schluss nahe, dass das RABV also durchaus über den ADM/RAMP2-Signalweg die EC-Aktivierung hemmen und somit die transzelluläre Migration von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke verhindern könnte.

8.3 Regulation der parazellulären Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke über Claudin 5 durch das ADM/RAMP2-System im RABV-infizierten Kleinhirn

Die parazelluläre Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke wird in erheblichem Maße durch TJ-Moleküle, allen voran CLDN5 [67], bestimmt. Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie beispielsweise entzündlichen ZNS-Erkrankungen oder neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen, ist hauptsächlich eine verringerte *Cldn5*-Genexpression für die erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich [5, 20, 27, 62, 82, 139, 140]. Eine gesteigerte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke eröffnet dann neben dem Übertritt von löslichen Stoffen auch Viren und Immunzellen ihren Weg ins Hirnparenchym [79, 82]. Bei der RABV-Infektion ist bekannt, dass lediglich die im Labor attenuierten oder apathogenen RABV-Stämme zu einer vermehrten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch Herunterregulation der TJ über inflammatorische Chemo- und Zytokine führen, wohingegen dieser Effekt bei hochpathogenen RABV-Stämmen so nicht beobachtet wird [27]. In unserem Kontext stellte sich die Frage, ob nach Inokulation mit dem hochpathogenen RABV neben dessen Einfluss auf eine chemo- und zytokininduzierte verringerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke [27, 157], dieser Effekt auch durch das Neuropeptid ADM verursacht und damit das Virus vor einer effektiven Immunantwort im Hirn geschützt wird.

Auf die Beziehung von ADM auf CLDN5 wurde in der bisherigen Forschung bereits große Aufmerksamkeit gelenkt. ADM verringert die parazelluläre Permeabilität und erhöht damit die TEER, indem es die Expression von *Cldn5* hochreguliert. Außerdem steigert es die Translokation von CLDN5 vom Zytoplasma in die Zellmembran und seine Konformationsänderung von einer Zig Zag- in eine linearere Form [72]. RAMP2 verbessert ebenfalls die Funktionalität der TJ und damit die endotheliale Barriere [84].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass während der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus die Genexpression von *Cldn5* im Krankheitsverlauf nach anfänglichem Anstieg in der Inkubationsphase prinzipiell eher abnahm, ehe sie im terminalen Erkrankungsstadium im Kleinhirn und Hirnstamm wieder anstieg. Zur Expression von *Adm* und *Ramp2* konnte jedoch keine Korrelation hergestellt werden, insbesondere nicht im Kleinhirn, wo die stärkste Expression von ADM und RAMP2 nachgewiesen wurde. Dahingegen ließ sich eine leichte Korrelation zu *Ramp3* im Cortex und Diencephalon/Telencephalon ohne Cortex nachweisen. Entsprechend der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse könnte das also darauf hinweisen, dass im Verlauf der letalen DOG4-Infektion die Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke im Kleinhirn und Hirnstamm zunehmen könnte. Da die Veränderungen in der Genexpression von *Cldn5* aber entgegen der Erwartungen keine Korrelation mit *Adm* und *Ramp2* im Kleinhirn aufwies, muss davon ausgegangen werden, dass hier andere Faktoren ursächlich sind, was aber noch nicht einen möglichen Einfluss des ADM/RAMP2-Signalwegs auf molekulare Veränderungen des CLDN5 ausschloss. Schließlich sind für die Funktionalität der TJ und vor allem von CLDN5 nicht ausschließlich dessen Expressionslevel entscheidend, sondern vielmehr flexible posttranslationale Modifikationen. Dazu zählen neben dynamischen Konformationsänderungen ihre cis- und trans-Interaktionen mit benachbarten Claudinen sowie die Reorganisation ihrer räumlichen Anordnung und Interaktionen zueinander [60, 69, 113, 143, 187, 196, 197]. Gerade dies ist Grundvoraussetzung für die komplexe Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke, bei der TJ unter gegenseitigem Einfluss ständiger Veränderungen das Öffnen und Schließen regulieren [190, 212]. Diese dynamischen Veränderungen begründen sich darauf, dass TJ ihr Erscheinungsbild von einer zumeist linearen Konformation zu einer Zig Zag-Form, auch beschrieben als ‚gekräuselt‘, ‚gezackt‘ oder ‚wellenförmig‘, überführen können, was teilweise auch als Vorstufe ihrer Endozytose und eines darauffolgenden Abbaus angesehen wird [127, 143, 167, 190, 226]. Mehrheitlich wird beim Vorliegen der Zig Zag-Form von einer erhöhten Permeabilität der TJ ausgegangen [95, 127]. Um die Linearität der TJ messen zu können, wurde der Zig Zag-Index etabliert, der die TJ-Länge zwischen zwei Verbindungspunkten durch die Länge des kürzesten Weges zwischen diesen beiden Punkten (Euklidische Distanz) dividiert. Ein Zig Zag-

Index von 1,0 entspricht einem komplett linearen TJ, signifikant höhere Werte gelten als Zig Zag-Konformation [190].

Im Hinblick auf die Rolle von ADM bei CLDN5-Konformationsänderungen ist bekannt, dass ADM bei kultivierten zerebralen mikrovaskulären EC dosisabhängig eine CLDN5-Umwandlung von einer Zig Zag- zu einer linearen Form bewirkt [72]. Es beeinflusst darüber hinaus den Grad der Claudin-Phosphorylierung [87], worüber die Funktionalität, Interaktion und Umlagerung der TJ reguliert werden kann [66, 181, 182].

In Bezug auf die CLDN5-Konformation konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei der RABV-Infektion innerhalb der Kleinhirnkerne in den Bereichen, bei denen die EC keine ICAM1 IR aufwiesen, also nicht aktiviert waren, auch eine leichte Abnahme des durchschnittlichen Zig Zag-Indexes im Vergleich zu Bereichen mit aktiviertem Endothel und damit eher die linearere Form von CLDN5 vorlag. Dies deutet darauf hin, dass dort neben der Restriktion der transzellulären Migration auch die Möglichkeit zur parazellulären Passage reduziert ist. Bereiche, in denen EC ICAM1 exprimierten und damit aktiviert waren, zeigten auch im Durchschnitt einen höheren Zig Zag-Index. Tendenziell war die ausgeprägtere Zig Zag-Form von CLDN5 im frühen symptomatischen Stadium der DOG4-Infektion, was die Infektionsmodalität mit der stärksten Expression von ADM und RAMP2 war, am geringsten. Der ADM/RAMP2-Signalweg könnte somit durchaus ein Faktor sein, der sowohl die CLDN5-Konformationsänderungen als auch die ICAM1-Hochregulation negativ beeinflusst.

Ein Zusammenhang der beiden für den Transport über die Blut-Hirn-Schranke entscheidenden Oberflächen- und Transmembranproteine ICAM1 und CLDN5 konnte des Weiteren dadurch gezeigt werden, dass die nachgewiesenen CLDN5-Konformationsänderungen sogar von der Nähe aktivierter EC abhängig zu sein schienen: In ihrer Nähe nahm CLDN5 nämlich im Mittel eine ausgeprägtere Zig Zag-Form an als außerhalb der Bereiche aktivierter EC, mit Ausnahme vom terminalen Stadium der DOG4-Infektion, wo keine Abhängigkeit beobachtet werden konnte.

Zu berücksichtigen wären im Kontext der durch CLDN5 induzierten Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke neben der Proteinkonformation auch seine Interaktionen zueinander und mit anderen Molekülen [17, 60, 69, 113, 143, 187, 196, 197]. Eine Untersuchung dieser Aspekte sowie die zusätzliche Einflussnahme weiterer Faktoren auf die CLDN5-Veränderungen waren jedoch nicht Gegenstand dieses Projektes.

Für die Bewertung der CLDN5-Analyse müssen ebenfalls methodische Limitationen bedacht werden. Die Analyse von Konformationsänderungen eines Moleküls auf Nanometerebene mittels Immunfluoreszenz sowie die Auswertung mit konfokalem Laser

Scanning Mikroskop ist aufgrund der mit dieser Technik erreichbaren Auflösung eher als suboptimale Methodik anzusehen. Zur adäquaten Darstellung von Molekülveränderungen im Bereich von 20 – 200 nm wäre sicherlich die Superresolution-Mikroskopie ein geeigneteres Verfahren [127, 170].

Zudem muss bedacht werden, dass die Untersuchung des CLDN5-Zig Zag-Indexes im Bereich der Kleinhirnkerngebiete und des angrenzenden Marklagers durchgeführt wurde. Dort waren zunächst die meisten Veränderungen der zuvor analysierten Parameter zu sehen und es gelang eine klarere Abgrenzung von RABV IR⁺ zu RABV IR⁻ Bereichen als in der Kleinhirnrinde. Aufgrund der stärkeren Expression von ADM und RAMP2 in letzterem Bereich sind dort jedoch wahrscheinlich deutlichere Veränderungen des Zig Zag-Indexes zu erwarten. Außerdem ist die Vergleichbarkeit der generierten Daten zu früher publizierten Beobachtungen schwierig, da diese Arbeit auf einem *in vivo*-Experiment beruht, wohingegen die meisten wissenschaftlichen Erkenntnisse über die CLDN5-Funktionalität an Zelllinien gewonnen worden sind [141, 170, 196].

Nichtsdestoweniger konnten eindeutige Konformationsänderungen von CLDN5 im Rahmen der RABV-Infektion nachgewiesen werden, die in Bereichen ohne EC-Aktivierung auch geringer ausfielen als im Bereich aktivierter EC und die durchaus von ADM beeinflussbar sein könnten. Haben also die möglicherweise über das ADM/RAMP2-System beeinflussbaren und nachgewiesenen Regulationen von CLDN5 und ICAM1 Konsequenzen für die Permeabilität von Immunzellen und löslichen Stoffen, wie etwa VNA, über die Blut-Hirn-Schranke?

8.4 Immunzelldiapedese über die Blut-Hirn-Schranke im RABV-infizierten Kleinhirn

Immunzellen können prinzipiell sowohl trans- als auch parazellulär das Gefäßbett verlassen und ins Gewebe eindringen. Während ihre Diapedese in peripheren Geweben parazellulär erfolgt, überqueren sie die Blut-Hirn-Schranke im entzündeten ZNS vorwiegend transzellulär [50]. Bei der transzellulären Diapedese spielt das Oberflächenprotein ICAM1 eine entscheidende Rolle [49], bei der parazellulären Passage ist die Funktionalität von CLDN5 der Schlüsselfaktor, denn Immunzellen können die Architektur der Claudine durchbrechen [215]. Letztlich ist der Transportweg von Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke in der bisherigen wissenschaftlichen Literatur jedoch noch nicht vollends geklärt und sehr wahrscheinlich stark abhängig vom jeweiligen Szenario.

Zunächst einmal konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass allgemein im Kleinhirn und insbesondere innerhalb der Kleinhirnkerngebiete nach RABV-Inokulation eine für die transzelluläre Immunzellmigration nötige ICAM1-Hochregulation vorlag. Dort, wo die stärksten ADM/RAMP2-Signale gemessen werden konnten (frühe symptomatische Erkrankungsphase der DOG4-Infektion in der Kleinhirnrinde), fiel die Hochregulation am geringsten aus. Ergänzend dazu konnte in Bereichen, in denen keine EC-Aktivierung über ICAM1 vorhanden war, auch nur ein geringerer Übergang der CLDN5-Konformation in seine durchlässigere Zig Zag-Form beobachtet und eine räumliche Abhängigkeit dieser zwei Faktoren festgestellt werden.

Hinsichtlich der Auswirkungen dieser durch ADM beeinflussten Expressionsmuster von ICAM1 und CLDN5 konnte gezeigt werden, dass generell während der Infektion mit dem hochpathogenen DOG4-Virus weniger CD3⁺ T-Zellen als bei Infektion mit dem apathogenen F3-Virus im Kleinhirn vorhanden waren. Während nach F3-Inokulation die meisten RABV-Signale innerhalb der Kleinhirnrinde registriert wurden, waren die meisten Immunzellen eher im Randbereich der Kerngebiete lokalisiert.

Darüber hinaus fällt interessanterweise auf, dass Immunzellen vor allem bei der DOG4-Infektion im Bereich der Kerngebiete auf einen gewissen Abstand zu RABV-infizierten Zellen gehalten wurden. Bei genauerer Betrachtung der lokalen Lagebeziehung zu ICAM1-aktivierten EC-Zellen fiel dann jedoch auf, dass zum einen die meisten Immunzellen im Bereich des Stratum granulosum der Kleinhirnrinde lokalisiert waren, und zum anderen die meisten Immunzellen dennoch bei der DOG4-Infektion zu Beginn der symptomatischen Erkrankungsphase ihren Weg aus dem Gefäßbett ins Hirnparenchym fanden, wo insgesamt nur eine sehr geringe DOG4-Viruslast vorlag und bekanntermaßen die Expression von ADM und RAMP2 am stärksten war. Folglich muss festgehalten werden, dass der Übertritt von Immunzellen ins infizierte Kleinhirn trotz der für das Virus günstigen Veränderungen von ICAM1 und CLDN5 nach DOG4-Inokulation offensichtlich entgegen der Erwartungen nicht verhindert werden konnte. Vielmehr zeigte sich paradoxerweise sogar der stärkste Immunzellübertritt ins ZNS im Bereich der stärksten ADM/RAMP2-Expression zu Beginn der symptomatischen DOG4-Infektion in der Rinde. Unklar bleibt, ob die Immunzellmigration nun über den trans- oder aber den parazellulären Weg ablief. Darüber hinaus erwies sich diesbezüglich vor allem die Tatsache als interessant, dass neben einer durchaus differenzierten räumlichen Verteilung von RABV- und CD3-Signalen über die verschiedenen Regionen des Kleinhirns hinweg, Immunzellen auf Abstand zu RABV-infizierten Neuronen gehalten wurden. Ob das ADM/RAMP2-System eventuell Effekte auf die räumliche Distanzwahrung hatte, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt noch völlig offen.

Die Beurteilung der räumlichen Nähe von T-Zellen zu RABV-infizierten Neuronen sowie der Lokalisation der CD3⁺-Immunzellen im Bezug zur ICAM1⁺-Gefäßwand (intravasal/extravasal) wurde nur an einer relativ kleinen Stichprobe durchgeführt, so dass die Ergebnisse daraus höchstens als Tendenz gewertet werden sollten.

Fakt ist, dass auch nach DOG4-Inokulation eine Immunzelldiapedese ins RABV-infizierte Kleinhirn stattfand und das Unterdrücken einer Immunzellinvasion also nicht der entscheidende Faktor für die hohe Pathogenität des Wildtyp RABV zu sein scheint. Die Beobachtung der Distanz zwischen Immunzellen und RABV IR⁺ Neuronen wäre es aber durchaus wert, näher beleuchtet zu werden.

8.5 Übertritt von löslichen Stoffen über die Blut-Hirn-Schranke

Nicht nur während einer RABV-Infektion, sondern generell auch bei allen anderen zerebralen Viruserkrankungen, ist für eine effektive Immunabwehr das Zusammenspiel von Immunzellen sowie löslichen Faktoren wie z. B. VNA von wesentlicher Bedeutung [76, 157]. Prinzipiell kann eine Immunantwort für den Organismus auch schädigender sein als die eigentliche Virusinfektion selbst, und die Blut-Hirn-Schranke einen Schutzfaktor darstellen [102, 157].

Zum Nachweis des Übertritts löslicher Stoffe wurde als Marker für den parazellulären Transport über die Blut-Hirn-Schranke das ubiquitäre Plasmaprotein Albumin gewählt [32, 33]. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt es dort einer streng regulierten Transzytose über die EC [4], kann aber im Falle einer erhöhten parazellulären Durchlässigkeit ebenso wie lösliche Stoffe und Immunzellen über den parazellulären Weg ins ZNS gelangen [183].

In dieser Arbeit wurde zu Beginn der symptomatischen DOG4-Infektion mehr intravasales Albumin im Kleinhirn nachgewiesen als bei der F3-Infektion. Jedoch gab es während der Infektion mit dem apathogenen F3-Virus einen deutlich stärkeren Übertritt von Albumin aus dem Gefäßsystem ins Hirnparenchym. Beim hochpathogenen DOG4-Virus dagegen trat unabhängig vom Stadium der Infektion deutlich weniger Albumin ins ZNS über, was auf eine geringere Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für lösliche Stoffe hindeutet.

Die Ergebnisse decken sich mit den vorherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen einer gesteigerten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bei der Infektion mit dem apathogenen F3-Virus und auch bei anderen Virusinfektionen, wie beispielsweise der West-Nil-Virus- oder der Venezolanischen Pferdeenzephalomyelitis-Virus-Infektion [27, 62, 171, 205, 206]. Eine Abschottung des ZNS durch die erhöhte Dichtigkeit der Blut-

Hirn-Schranke bei der hochpathogenen DOG4-Infektion, wie hier durch geringere Albuminpassage nach extravasal gezeigt, wurde ebenfalls in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben [114, 208].

Mit Bezug auf die Rolle von ADM für die Passage des löslichen Albumins über die Blut-Hirn-Schranke konnte beobachtet werden, dass unabhängig vom Stadium der DOG4-Infektion weniger Albumin das Gefäßbett nach extravasal verließ und daher die mögliche Einflussnahme des ADM/RAMP2-Systems insbesondere im frühen Erkrankungsstadium der DOG4-Infektion durch weniger EC-Aktivierung und tendenziell mehr linearem CLDN5 anzunehmen war. Die Zuordnung des Albumineffekts zum trans- oder parazellulären Passageweg war methodisch nicht möglich. Zur besseren Differenzierung müssten beispielsweise Farbstoffe wie Fluorescein-Natrium bereits beim noch lebenden Tier eingesetzt werden [72].

Dennoch konnte eine Regulation des Übertritts löslicher Stoffe durch Veränderungen von ICAM1 und CLDN5 als wichtige Faktoren für die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke unter dem möglichen Einfluss des ADM/RAMP2-Systems in der RABV-Infektion nachgewiesen werden. Da jedoch die gesteigerte Dichtigkeit der Blut-Hirn-Schranke im Bereich der Kleinhirnrinde im frühen symptomatischen Stadium der DOG4-Infektion kein Alleinstellungsmerkmal war, sondern eine ähnlich niedrige Albuminpassage auch in den Kernen und im fortgeschrittenen Stadium der Infektion vorlagen, sind wahrscheinlich noch weitere Einflussfaktoren vorhanden, die es zu identifizieren gilt.

8.6 Die besondere Rolle des Kleinhirns im RABV-infizierten Hirn

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass *Adm* und *Ramp2* während der hochpathogenen RABV-Infektion am stärksten im Kleinhirn hochreguliert wurden. Mögliche Effekte des ADM/RAMP2-Signalings könnten in einem negativen Einfluss auf die Hochregulation von ICAM1 und in einem geringeren Übergang der linearen in die Zig Zag-Konformation von CLDN5 bestehen. Sowohl in der Kleinhirnrinde als auch den Kerngebieten zeigten sich letztlich eine verringerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für lösliche Stoffe. Dahingegen fand entgegen der Erwartungen kein Ausbleiben einer Immunzellinvasion ins infizierte Kleinhirn statt. Interessanterweise konnte zum einen sogar gerade im Stratum granulosum der Rinde nach hochpathogener RABV-Inokulation die stärkste Immunzellinvasion und zum anderen im Kleinhirn generell die Wahrung eines räumlichen Abstands zwischen invadierten Immunzellen und RABV-infizierten Neuronen beobachtet werden. Insofern scheint also die Hochregulation von ADM und

RAMP2 im RABV-infizierten Kleinhirn also das Ausbleiben einer Immunzellinvasion nicht zu verhindern.

Den Ergebnissen dieser Arbeit entsprechend wurde auch in der bisherigen wissenschaftlichen Literatur von der Ausbreitung des RABV in verschiedenen Hirnregionen wie Cortex und Kleinhirn berichtet [157]. Im Vergleich zu den anderen Hirnregionen ist aber gerade das Kleinhirn als die Hirnregion mit den stärksten Regulationen hinsichtlich der Permeabilitätsveränderungen der Blut-Hirn-Schranke bekannt. Außerdem ist im Kleinhirn eine verstärkte Immunzelldiapedese über Hochregulation der ICAM1-Expression nach F3-Inokulation beschrieben worden [114, 157], während dort eine Immunzellinvasion aufgrund der fehlenden Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bei einer Infektion mit einem hochpathogenen RABV ausblieb. Das Kleinhirn stellt also gerade bei letzterer einen bedeutenden und geschützten Ort für die Virusreplikation und -ausbreitung dar [165]. Dass aber gerade auch das Kleinhirn diejenige Hirnregion ist, in der nach Inokulation mit dem RABV Immunantworten registriert werden, so wie bereits vorbeschrieben bei der F3-Infektion und in dieser Arbeit auch bei der DOG4-Infektion, könnte darin begründet sein, dass durch Immunreaktionen verursachte Schädigungen neuronaler Strukturen im Kleinhirn vermeintlich geringere negative Konsequenzen für den Wirt gegenüber Schädigungen von etwa unmittelbar überlebenswichtigen Regionen des ZNS haben könnten. Ein neuroprotektiver Mechanismus des RABV könnte also darin bestehen, selektiv eine ausgeprägte Diapedese von Immunzellen und löslichen Faktoren für eine Immunabwehr im Kleinhirn zuzulassen [157].

Vor diesem Hintergrund konnte also auch durch diese Arbeit die Rolle des Kleinhirns als eine für das ADM/RAMP2-System und letztlich für Immunantworten im Verlauf der RABV-Infektion durch Veränderungen wichtiger Faktoren der Blut-Hirn-Schranke als beeinflussbare Hirnregion herausgestellt werden. Neben einer verringerten Permeabilität für lösliche Stoffe, wie in etwa für die Virusabwehr unabdingbaren VNA, konnte eine Immunzelldiapedese nach DOG4-Infektion interessanterweise und entgegen bisheriger wissenschaftlicher Erkenntnisse zwar nicht verhindert werden, jedoch besteht vielleicht ein entscheidender Pathomechanismus hinsichtlich der zellulären Virusabwehr vielmehr darin, die invadierten Immunzellen vor dem RABV auf Abstand zu halten. Die möglicherweise durch ADM regulierten Veränderungen der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke sowie die selektive räumliche Diapedese von Immunzellen im Kleinhirn könnten also nichtsdestotrotz einen neuroprotektiven Faktor in der RABV-Infektion darstellen.

8.7 Ausblick

Erstmals konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass das ADM/RAMP2-System ein möglicher Einflussfaktor für die verringerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der hochpathogenen RABV-Infektion durch Hemmung der ICAM1-Hochregulation und CLDN5-Konformationsänderung im infizierten Kleinhirn sein könnte. Daraus könnte einerseits eine verringerte Durchlässigkeit für lösliche Stoffe wie VNA resultieren, die für eine effektive Virusabwehr in Kombination mit der zellulären Immunantwort unabdingbar sind, andererseits der Übertritt von Immunzellen ins infizierte Kleinhirn zwar nicht verhindert, aber durchaus diese vor RABV-infizierten Zellen auf Abstand gehalten werden.

Diese neuen Erkenntnisse geben Anlass für weiterführende Fragestellungen. Gibt es etwa andere an der Blut-Hirn-Schranke beteiligte Faktoren, die für den Übertritt von Immunzellen ins infizierte ZNS essentiell sind und die durch ADM reguliert werden können? Ein vielversprechender Ansatz liegt bei genauerer Betrachtung auf der Glia limitans vascularis, in der beispielsweise unter physiologischen Bedingungen in den perivaskulären Raum übergetretene Immunzellen vor einem weiteren Eindringen ins Hirnparenchym zurückgehalten werden [49], unter pathophysiologischen inflammatorischen Bedingungen jedoch gerade nicht [15]. Auf die Funktionalität der Glia limitans vascularis haben verschiedene Komponenten Einfluss, von denen einige auch unter einer ADM-Regulation zu stehen scheinen.

Die MMP9 die im perivaskulären Raum von Makrophagen exprimiert wird, kann den Oberflächenrezeptor β -Dystroglycan zwischen Astrozytenfortsätzen und der Basalmembran spalten und damit zur Öffnung der Glia limitans vascularis beitragen [5]. Darüber hinaus sind die MMP auch im Rahmen entzündlicher ZNS-Prozesse am Abbau der TJ beteiligt [125]. Im Rahmen der RABV-Infektion erhöhen attenuierte RABV-Stämme die Expression von MMP9 im perivaskulären Raum und schaffen damit eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke, was Effektoren des Immunsystems Eintritt in das infizierte ZNS gewährt [122]. Im Zentrum der Glia limitans vascularis befindet sich im Übrigen auch ADM. An der Glia limitans vascularis beteiligte Astrozyten stimulieren EC zur ADM-Sekretion [100], was einen hemmenden Einfluss auf die MMP9 hat [83] und in einer verminderten Öffnung der Glia limitans vascularis resultiert.

Des Weiteren spielt der Decoy-Rezeptor CXCR7 für den Übertritt von Immunzellen aus dem perivaskulären Raum ins Hirnparenchym eine entscheidende Rolle [49], indem er von EC auf der abluminalen Seite verstärkt exprimiert werden kann. Unter physiologischen Bedingungen werden in den perivaskulären Raum vordringende Immunzellen über die Bindung ihres Transmembranrezeptorproteins CXCR4 an dem

von EC und Astrozyten in den perivaskulären Raum sezernierten Liganden CXCL12 festgehalten. CXCR7 kann kompetitiv CXCL12 abfangen und damit eine weitere Passage der Immunzellen ermöglichen [49]. Interessanterweise dient der CXCR7 auch für ADM als Decoy-Rezeptor [106]. Daraus ergibt sich also die Frage, ob ADM CXCR7 abfängt, damit eine verlängerte Bindung der Immunzellen an CXCL12 im perivaskulären Raum induziert und somit einen negativen Einfluss auf ihr Vordringen ins RABV-infizierte ZNS haben könnte.

Zudem könnte das Chemokin CXCL10 einen weiteren Ansatzpunkt für die Regulation der Immunzellmigration über die Glia limitans vascularis durch ADM im Zusammenhang mit einer RABV-Infektion darstellen. CXCL10 fördert die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke, indem es zentral am Anlocken von Immunzellen und an der Initiierung ihrer Migration über die Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist [27, 28]. Im Rahmen der apathogenen RABV-Infektion bindet das Oberflächenprotein als eines der am frühesten exprimierten Chemokine den auf aktivierten T-Zellen befindlichen CXCR3-Rezeptor [27, 78] und bewirkt unter anderem die Herunterregulation der TJ und damit eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke [28]. Auch CXCL10 wird durch ADM beeinflusst, indem es dessen Produktion unterdrückt [78]. Seine Expression wirkt somit letztlich einer zerebralen Inflammation entgegen [156]. Es eröffnet sich also Spielraum für die Erforschung eines möglichen Zusammenhangs dieser durch ADM regulierbaren Faktoren im Rahmen der RABV-Infektion, womit schließlich die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Immunzellen und lösliche Bestandteile wie den VNA beeinflusst werden könnten.

Zum Schluss darf nicht vergessen werden, dass das ADM/RAMP2-System mit seiner möglichen Regulation der Blut-Hirn-Schranke über ICAM1 und CLDN5 in der RABV-Infektion durchaus ein Ansatzpunkt für therapeutische Entwicklungen darstellen könnte. Zwar gilt nicht zu Unrecht, dass die Gabe von ADM selbst durch seine kurze Plasmahalbwertszeit für die klinische Umsetzung unpraktikabel erscheint [84], jedoch steht die Erforschung einer möglichen klinischen Anwendbarkeit im Rahmen von Sepsis, der COVID-19-Pandemie und onkologischen Tumorerkrankungen bereits im Fokus zahlreicher Studien. Dabei wurden nicht nur vielversprechende Ansätze von ADM als diagnostischer Marker für Prognose und Patientenoutcome, sondern auch Antikörpertherapien gegen ADM erforscht, die dessen Plasmahalbwertszeit verlängern und damit zu einer verbesserten Endothelfunktion oder antiangiogenetischen Effekten beitragen [57, 102, 199].

Im Falle der RABV-Infektion muss berücksichtigt werden, dass der Einfluss von ADM spezifisch in der Blut-Hirn-Schranke gehemmt werden müsste, um eine verbesserte

Immunabwehr im ZNS zuzulassen. Eine darüberhinausgehende Dysfunktion des Endothels durch eine ubiquitär verringerte ADM-Funktion erscheint kontraproduktiv. Ein alternativer therapeutischer Ansatzpunkt könnte auch im ADM-Rezeptorsystem liegen [85]. Interessant für weitere Therapieoptionen für die RABV-Infektion im Kontext beeinflussbarer Mechanismen der Blut-Hirn-Schranke wäre auch CLDN5 als Zielstruktur [69]. In der aktuellen Forschung wird sich dabei neben der Entwicklung erster monoklonaler CLDN5-Antikörper und mit CLDN5-interferierenden Stoffen [19, 68] auch mit der weiteren Erforschung des Zusammenspiels mit Immunzellen beschäftigt. Es soll möglich sein, dass Immunzellen für einen leichteren Zugang zum ZNS selbst CLDN5 exprimieren und über einen Zipper-Mechanismus mit den CLDN5-Molekülen der Blut-Hirn-Schranke interagieren [112]. An den für die Immunzelldiapedese benötigten Oberflächenproteinen der Blut-Hirn-Schranke gibt es bereits etablierte Therapien, wie z. B. der für die Multiple Sklerose zugelassene und am Rezeptor α 4-Integrin ansetzende Antikörper Natalizumab, der die Immunzellbindung an VCAM1 stört [48, 148].

Die Erforschung dieser neuen Fragestellungen könnte dazu beitragen, ein besseres Verständnis für die Pathogenitätsmechanismen des RABV zu erlangen, mit denen das Virus das Immunsystem unterwandern und damit einer effektiven Virusabwehr entgehen kann. Die Beeinflussung der Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke stellt in jedem Fall einen entscheidenden Faktor für den letalen Ausgang der RABV-Infektion dar.

9 Zusammenfassung

Die Tollwut ist immer noch eine weltweit gefürchtete und fast ausnahmslos tödlich verlaufende Infektionskrankheit, für die es keine erfolgreichen Therapieoptionen gibt.

Für deren Entwicklung ist das Verständnis zugrundeliegender Pathogenitätsmechanismen essentiell.

Bislang ist eine Vielzahl hocheffizienter Strategien des Rabiesvirus (RABV) bekannt, mit dem es die Immunantwort des Wirts zu seinen Gunsten beeinflusst.

Im Rahmen zerebraler Virusinfektionen werden Neuropeptide, wichtige Mediatoren für die Kommunikation zwischen Nerven- und Immunsystem, hochreguliert. Eines davon ist Adrenomedullin (ADM), das antiinflammatorische Effekte und positiven Einfluss auf die endotheliale Barrierefunktion bei bakteriellen Infektionen und Inflammation zeigt. Zudem beeinflusst es die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke.

Vor diesem Hintergrund könnte also die Regulation von ADM durch das RABV eine weitere immunevasive Strategie des Virus darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern ADM bei der RABV-Infektion die Immunevasion des Virus und die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beeinflusst.

Dazu wurden Mäuse mit dem hochpathogenen RABV-Stamm DOG4 i. m. sowie dem apathogenen RABV-Stamm CVS-F3 i. n. inokuliert. Mit RNA aus dem zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung gewonnenen Hirngewebe wurde mittels quantitativer Echtzeit PCR eine Genexpressionsanalyse von *Adm* und seinen Rezeptorkomponenten durchgeführt. Außerdem wurde die Proteinexpression von ADM und seiner Rezeptorkomponente Receptor activity-modifying protein (RAMP) 2 sowie die am restriktiven Transport über die Blut-Hirn-Schranke beteiligten Komponenten Intercellular adhesion molecule (ICAM) 1 und Claudin (CLDN) 5 mit immunhistochemischer und Doppelimmunfluoreszenzfärbung dargestellt. Zusätzlich wurde der Übertritt von CD3-markierten T-Zellen und dem Plasmaprotein Albumin ins RABV-infizierte Kleinhirn untersucht.

Nach der Inokulation des hochpathogenen DOG4 zeigte sich im Kleinhirn eine Hochregulation von ADM und seiner Rezeptorkomponente RAMP2. Außerdem fanden sich Hinweise für einen möglichen hemmenden Einfluss von ADM auf die Hochregulation von ICAM1 sowie für einen verringerten Übergang der CLDN5-Konformation in seine durchlässigere Zig Zag-Form. Während es nach DOG4-Inokulation zu eindeutig weniger Plasmaproteinübertritt ins infizierte Kleinhirn kam, blieb eine Invasion von Immunzellen

nicht aus. Jedoch fanden sich diese interessanterweise nur in einer gewissen räumlichen Distanz und nie im direkten Kontakt zu RABV-infizierten Neuronen.

Zusammenfassend könnte ADM also durchaus eine Rolle hinsichtlich einer unterdrückten bzw. verminderten Immunantwort spielen. Neben dem verringerten Übertritt von Plasmaproteinen ins ZNS erscheint vor allem der Effekt der Distanzwahrung vor eingewanderten Immunzellen interessant und bedarf weiterer Erforschung.

10 Summary

Rabies still is a fatal virus infection that is feared worldwide, especially since successful treatment options are lacking.

Understanding its underlying pathogenic mechanisms is essential for the development of effective therapeutics.

So far, numerous highly efficient strategies of the rabies virus (RABV) are known, with which it influences the immune response of the host in its favor.

In the context of cerebral viral infections, neuropeptides, important mediators for the communication between the nervous and immune systems, are upregulated. One of them is adrenomedullin (ADM), which shows anti-inflammatory effects and a positive influence on the endothelial barrier function in bacterial infections and inflammation. It also favors the maintenance of the blood-brain barrier.

In this context, the regulation of ADM by RABV could represent a yet unknown immune evasive strategy of the virus.

The present study investigated if RABV-induced ADM exerts influence on immune evasion and the permeability of the blood-brain barrier in RABV infection.

For this purpose, mice were inoculated i. m. with the highly pathogenic RABV strain DOG4 or i. n. with the apathogenic RABV strain CVS-F3. Brain tissue was harvested at different time points after inoculation and real-time qPCR was performed for gene expression analysis of ADM and its receptor components. Furthermore, the protein expression of ADM and its receptor component receptor activity-modifying protein (RAMP) 2, as well as intercellular adhesion molecule (ICAM) 1 and claudin (CLDN) 5, components involved in the restrictive transport across the blood-brain barrier, was analyzed with immunohistochemical and double immunofluorescence staining. In addition, the transfer of T cells and the plasmaprotein albumin into the RABV-infected cerebellum was examined.

After inoculation of the highly pathogenic DOG4 ADM and RAMP2 were upregulated in the cerebellum. Moreover, evidence was found for a possible inhibitory influence of ADM on the upregulation of ICAM1, as well as for a reduced transition of CLDN5 into its more permeable zig zag conformation. While there was significantly less leakage of plasmaprotein into the infected cerebellum after DOG4 inoculation than after F3 inoculation, invasion of immune cells was present in both settings. Interestingly, however, the T cells were found only at a certain spatial distance from RABV-infected neurons and not in direct contact to them.

In summary, the regulation of ADM in RABV infection could well favor the absence of an immune response. In addition to the reduced transfer of plasmaproteins into the CNS,

the effect of maintaining a distance from invading immune cells is particularly of interest and requires further research.

11 Literaturverzeichnis

1. Abbott NJ (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20:131–147
2. Abbott NJ (2005) Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25:5–23. doi: 10.1007/s10571-004-1374-y
3. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41–53. doi: 10.1038/nrn1824
4. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM et al. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
5. Agrawal S, Anderson P, Durbeek M et al. (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1007–1019. doi: 10.1084/jem.20051342
6. Ahmed Z (2010) Dipolar cortico-muscular electrical stimulation: a novel method that enhances motor function in both - normal and spinal cord injured mice. *J Neuroeng Rehabil* 7:46. doi: 10.1186/1743-0003-7-46
7. Albertini AAV, Wernimont AK, Muziol T et al. (2006) Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313:360–363. doi: 10.1126/science.1125280
8. Albertini AAV, Ruigrok RWH, Blondel D (2011) Rabies virus transcription and replication. *Adv Virus Res* 79:1–22. doi: 10.1016/B978-0-12-387040-7.00001-9
9. Aldrich C, Leroux-Roels I, Huang KB et al. (2021) Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase 1 trial. *Vaccine* 39:1310–1318. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.12.070
10. Ananthanarayanan V, Pins MR, Meyer RE et al. (2005) Immunohistochemical assays in prostatic biopsies processed in Bouin's fixative. *J Clin Pathol* 58:322–324. doi: 10.1136/jcp.2004.019299
11. Angelow S, Ahlstrom R, Yu ASL (2008) Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F867-76. doi: 10.1152/ajprenal.90264.2008
12. Annunziata P, Cioni C, Toneatto S et al. (1998) HIV-1 gp120 increases the permeability of rat brain endothelium cultures by a mechanism involving substance P. *AIDS* 12:2377–2385. doi: 10.1097/00002030-199818000-00006
13. Annunziata P, Cioni C, Santonini R et al. (2002) Substance P antagonist blocks leakage and reduces activation of cytokine-stimulated rat brain endothelium. *Journal of Neuroimmunology* 131:41–49. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00262-X
14. Baloul L, Camelo S, Lafon M (2004) Up-regulation of Fas ligand (FasL) in the central nervous system: a mechanism of immune evasion by rabies virus. *J Neurovirol* 10:372–382. doi: 10.1080/13550280490521122
15. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F et al. (2009) Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 462:94–98. doi: 10.1038/nature08478
16. Bello S, Lasier AB, Mincholé E et al. (2012) Prognostic power of proadrenomedullin in community-acquired pneumonia is independent of aetiology. *Eur Respir J* 39:1144–1155. doi: 10.1183/09031936.00080411
17. Berselli A, Alberini G, Benfenati F et al. (2022) Computational Assessment of Different Structural Models for Claudin-5 Complexes in Blood-Brain Barrier Tight Junctions. *ACS Chem Neurosci* 13:2140–2153. doi: 10.1021/acscchemneuro.2c00139
18. Bö L, Peterson JW, Mørk S et al. (1996) Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1060–1072
19. Breitzkreuz-Korff O, Tschek C, Del Vecchio G et al. (2021) M01 as a novel drug enhancer for specifically targeting the blood-brain barrier. *J Control Release* 338:137–148. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.014
20. Broekaart DWM, Anink JJ, Baayen JC et al. (2018) Activation of the innate immune system is evident throughout epileptogenesis and is associated with blood-brain barrier dysfunction and seizure progression. *Epilepsia* 59:1931–1944. doi: 10.1111/epi.14550
21. Brzózka K, Finke S, Conzelmann K-K (2005) Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 79:7673–7681. doi: 10.1128/JVI.79.12.7673-7681.2005
22. Brzózka K, Finke S, Conzelmann K-K (2006) Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J Virol* 80:2675–2683. doi: 10.1128/JVI.80.6.2675-2683.2006
23. Bulloch K, McEwen BS, Nordberg J et al. (1998) Selective regulation of T-cell development and function by calcitonin gene-related peptide in thymus and spleen. An example of differential regional regulation of immunity by the neuroendocrine system. *Ann N Y Acad Sci* 840:551–562. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09594.x
24. Butt AM, Jones HC (1992) Effect of histamine and antagonists on electrical resistance across the blood-brain barrier in rat brain-surface microvessels. *Brain Res* 569:100–105. doi: 10.1016/0006-8993(92)90374-I
25. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol* 429:47–62. doi: 10.1113/jphysiol.1990.sp018243
26. Caron KM, Smithies O (2001) Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:615–619. doi: 10.1073/pnas.021548898
27. Chai Q, He WQ, Zhou M et al. (2014) Enhancement of blood-brain barrier permeability and reduction of tight junction protein expression are modulated by chemokines/cytokines induced by rabies virus infection. *J Virol* 88:4698–4710. doi: 10.1128/JVI.03149-13

28. Chai Q, She R, Huang Y et al. (2015) Expression of neuronal CXCL10 induced by rabies virus infection initiates infiltration of inflammatory cells, production of chemokines and cytokines, and enhancement of blood-brain barrier permeability. *J Virol* 89:870–876. doi: 10.1128/JVI.02154-14
29. Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ (2017) Mechanisms and Therapeutic Relevance of Neuro-immune Communication. *Immunity* 46:927–942. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.008
30. Chelbi-Alix MK, Vidy A, El Bougrini J et al. (2006) Rabies viral mechanisms to escape the IFN system: the viral protein P interferes with IRF-3, Stat1, and PML nuclear bodies. *J Interferon Cytokine Res* 26:271–280. doi: 10.1089/jir.2006.26.271
31. Chen Y-X, Li C-S (2013) The predictive value of adrenomedullin for development of severe sepsis and septic shock in emergency department. *Biomed Res Int* 2013:960101. doi: 10.1155/2013/960101
32. Clayburgh DR, Barrett TA, Tang Y et al. (2005) Epithelial myosin light chain kinase-dependent barrier dysfunction mediates T cell activation-induced diarrhea in vivo. *J Clin Invest* 115:2702–2715. doi: 10.1172/JCI24970
33. Clayburgh DR, Musch MW, Leitges M et al. (2006) Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea in vivo. *J Clin Invest* 116:2682–2694. doi: 10.1172/JCI29218
34. Conner AC, Simms J, Hay DL et al. (2004) Heterodimers and family-B GPCRs: RAMPs, CGRP and adrenomedullin. *Biochem Soc Trans* 32:843–846. doi: 10.1042/BST0320843
35. Consonni A, Morara S, Codazzi F et al. (2011) Inhibition of lipopolysaccharide-induced microglia activation by calcitonin gene related peptide and adrenomedullin. *Mol Cell Neurosci* 48:151–160. doi: 10.1016/j.mcn.2011.07.006
36. Cox JH, Dietzschold B, Schneider LG (1977) Rabies virus glycoprotein. II. Biological and serological characterization. *Infect Immun* 16:754–759
37. Dackor R, Fritz-Six K, Smithies O et al. (2007) Receptor activity-modifying proteins 2 and 3 have distinct physiological functions from embryogenesis to old age. *J Biol Chem* 282:18094–18099. doi: 10.1074/jbc.M703544200
38. Daneman R (2012) The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 72:648–672. doi: 10.1002/ana.23648
39. Daniels BP, Klein RS (2015) Viral sensing at the blood-brain barrier: new roles for innate immunity at the CNS vasculature. *Clin Pharmacol Ther* 97:372–379. doi: 10.1002/cpt.75
40. Delgado M, Ganea D (2008) Anti-inflammatory neuropeptides: a new class of endogenous immunoregulatory agents. *Brain Behav Immun* 22:1146–1151. doi: 10.1016/j.bbi.2008.06.001
41. Dietzschold B, Morimoto K, Hooper DC et al. (2000) Genotypic and phenotypic diversity of rabies virus variants involved in human rabies: implications for postexposure prophylaxis. *J Hum Virol* 3:50–57
42. Dietzschold B, Li J, Faber M et al. (2008) Concepts in the pathogenesis of rabies. *Future Virol* 3:481–490. doi: 10.2217/17460794.3.5.481
43. Du M, Butchi NB, Woods T et al. (2010) Neuropeptide Y has a protective role during murine retrovirus-induced neurological disease. *J Virol* 84:11076–11088. doi: 10.1128/JVI.01022-10
44. Du Pont V, Plemper RK, Schnell MJ (2019) Status of antiviral therapeutics against rabies virus and related emerging lyssaviruses. *Curr Opin Virol* 35:1–13. doi: 10.1016/j.coviro.2018.12.009
45. Ebara T, Miura K, Okumura M et al. (1994) Effect of adrenomedullin on renal hemodynamics and functions in dogs. *Eur J Pharmacol* 263:69–73. doi: 10.1016/0014-2999(94)90524-x
46. Eljaafari A, Li Y-P, Miossec P (2009) IFN-gamma, as secreted during an alloresponse, induces differentiation of monocytes into tolerogenic dendritic cells, resulting in FoxP3+ regulatory T cell promotion. *J Immunol* 183:2932–2945. doi: 10.4049/jimmunol.0804352
47. Elke G, Bloos F, Wilson DC et al. (2018) The use of mid-regional proadrenomedullin to identify disease severity and treatment response to sepsis - a secondary analysis of a large randomised controlled trial. *Crit Care* 22:79. doi: 10.1186/s13054-018-2001-5
48. Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M et al. (1998) The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *J Clin Invest* 102:2096–2105. doi: 10.1172/JCI4271
49. Engelhardt B, Ransohoff RM (2012) Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33:579–589. doi: 10.1016/j.it.2012.07.004
50. Engelhardt B, Wolburg H (2004) Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol* 34:2955–2963. doi: 10.1002/eji.200425327
51. Fabis MJ, Scott GS, Kean RB et al. (2007) Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5656–5661. doi: 10.1073/pnas.0701252104
52. Figueira L, Israel A (2015) Cerebellar adrenomedullin: A new target for blood pressure regulation. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases* 4. doi: 10.14800/ttnd.1039
53. Fritz-Six KL, Dunworth WP, Li M et al. (2008) Adrenomedullin signaling is necessary for murine lymphatic vascular development. *J Clin Invest* 118:40–50. doi: 10.1172/JCI33302
54. Fu ZF, Jackson AC (2005) Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. *J Neurovirol* 11:101–106. doi: 10.1080/13550280590900445
55. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T et al. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539–1550. doi: 10.1083/jcb.141.7.1539
56. García-Unzueta MT, Montalbán C, Pesquera C et al. (1998) Plasma Adrenomedullin Levels in Type 1 Diabetes: Relationship with clinical parameters. *Diabetes Care* 21:999–1003. doi: 10.2337/diacare.21.6.999

57. Geven C, Kox M, Pickkers P (2018) Adrenomedullin and Adrenomedullin-Targeted Therapy As Treatment Strategies Relevant for Sepsis. *Front Immunol* 9:292. doi: 10.3389/fimmu.2018.00292
58. Gholami A, Alamdary A (2020) The World Rabies Day 2020: Collaborate and Vaccinate. *Iran Biomed J* 24:264–268. doi: 10.29252/ibj.24.5.263
59. Gluska S, Zahavi EE, Chein M et al. (2014) Rabies Virus Hijacks and accelerates the p75NTR retrograde axonal transport machinery. *PLoS Pathog* 10:e1004348. doi: 10.1371/journal.ppat.1004348
60. Gong Y, Renigunta V, Zhou Y et al. (2015) Biochemical and biophysical analyses of tight junction permeability made of claudin-16 and claudin-19 dimerization. *Mol Biol Cell* 26:4333–4346. doi: 10.1091/mbc.E15-06-0422
61. Gonzalez-Rey E, Chorny A, O'Valle F et al. (2007) Adrenomedullin protects from experimental arthritis by down-regulating inflammation and Th1 response and inducing regulatory T cells. *Am J Pathol* 170:263–271. doi: 10.2353/ajpath.2007.060596
62. Gralinski LE, Ashley SL, Dixon SD et al. (2009) Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier. *J Virol* 83:9398–9410. doi: 10.1128/JVI.00954-09
63. Greene C, Campbell M (2016) Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. *Tissue Barriers* 4. doi: 10.1080/21688370.2015.1138017
64. Guo Y, Duan M, Wang X et al. (2019) Early events in rabies virus infection-Attachment, entry, and intracellular trafficking. *Virus Res* 263:217–225. doi: 10.1016/j.virusres.2019.02.006
65. Hallmann R, Horn N, Selg M et al. (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 85:979–1000. doi: 10.1152/physrev.00014.2004
66. Haorah J, Ramirez SH, Schall K et al. (2007) Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction. *J Neurochem* 101:566–576. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04393.x
67. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L et al. (2015) Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol* 38:16–25. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.004
68. Hashimoto Y, Zhou W, Hamauchi K et al. (2018) Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5. *Sci Rep* 8:8383. doi: 10.1038/s41598-018-26560-9
69. Hashimoto Y, Campbell M, Tachibana K et al. (2021) Claudin-5: A Pharmacological Target to Modify the Permeability of the Blood-Brain Barrier. *Biol Pharm Bull* 44:1380–1390. doi: 10.1248/bpb.b21-00408
70. Hinson JP, Kapas S, Smith DM (2000) Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev* 21:138–167. doi: 10.1210/edrv.21.2.0396
71. Hirose T, Totsune K, Mori N et al. (2010) Expression of adrenomedullin 2/intermedin, a possible reno-protective peptide, is decreased in the kidneys of rats with hypertension or renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 299:F128–34. doi: 10.1152/ajprenal.00679.2009
72. Honda M, Nakagawa S, Hayashi K et al. (2006) Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5. *Cell Mol Neurobiol* 26:109–118. doi: 10.1007/s10571-006-9028-x
73. Hooper DC, Scott GS, Zborek A et al. (2000) Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 14:691–698. doi: 10.1096/fasebj.14.5.691
74. Hooper DC, Kean RB, Scott GS et al. (2001) The central nervous system inflammatory response to neurotropic virus infection is peroxynitrite dependent. *J Immunol* 167:3470–3477. doi: 10.4049/jimmunol.167.6.3470
75. Hooper DC, Morimoto K, Bette M et al. (1998) Collaboration of Antibody and Inflammation in Clearance of Rabies Virus from the Central Nervous System. *J Virol* 72:3711–3719
76. Hooper DC, Phares TW, Fabis MJ et al. (2009) The Production of Antibody by Invading B Cells Is Required for the Clearance of Rabies Virus from the Central Nervous System. *PLoS Negl Trop Dis* 3. doi: 10.1371/journal.pntd.0000535
77. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL et al. (1993) Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363:159–163. doi: 10.1038/363159a0
78. Hosokawa I, Hosokawa Y, Ozaki K et al. (2008) Adrenomedullin suppresses tumour necrosis factor alpha-induced CXC chemokine ligand 10 production by human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol* 152:568–575. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03647.x
79. Hou J, Baker LA, Zhou L et al. (2016) Viral interactions with the blood-brain barrier: old dog, new tricks. *Tissue Barriers* 4. doi: 10.1080/21688370.2016.1142492
80. Huang J, Stohl LL, Zhou X et al. (2011) Calcitonin gene-related peptide inhibits chemokine production by human dermal microvascular endothelial cells. *Brain Behav Immun* 25:787–799. doi: 10.1016/j.bbi.2011.02.007
81. Hupf J, Mustroph J, Hanses F et al. (2020) RNA-expression of adrenomedullin is increased in patients with severe COVID-19. *Crit Care* 24:527. doi: 10.1186/s13054-020-03246-1
82. Huppert J, Closhen D, Croxford A et al. (2010) Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* 24:1023–1034. doi: 10.1096/fj.09-141978
83. Hurtado O, Serrano J, Sobrado M et al. (2010) Lack of adrenomedullin, but not complement factor H, results in larger infarct size and more extensive brain damage in a focal ischemia model. *Neuroscience* 171:885–892. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.021
84. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A et al. (2008) The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest* 118:29–39. doi: 10.1172/JCI33022
85. Igarashi K, Sakurai T, Kamiyoshi A et al. (2014) Pathophysiological roles of adrenomedullin-RAMP2 system in acute and chronic cerebral ischemia. *Peptides* 62:21–31. doi: 10.1016/j.peptides.2014.08.013

86. Irudayanathan FJ, Wang N, Wang X et al. (2017) Architecture of the paracellular channels formed by claudins of the blood-brain barrier tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 1405:131–146. doi: 10.1111/nyas.13378
87. Ishizaki T, Chiba H, Kojima T et al. (2003) Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Exp Cell Res* 290:275–288. doi: 10.1016/s0014-4827(03)00354-9
88. Isumi Y, Shoji H, Sugo S et al. (1998) Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology* 139:838–846. doi: 10.1210/endo.139.3.5789
89. Ito A, Ishida T (2020) Diagnostic markers for community-acquired pneumonia. *Ann Transl Med* 8:609. doi: 10.21037/atm.2020.02.182
90. Jackson AC (2016) Diabolical effects of rabies encephalitis. *J Neurovirol* 22:8–13. doi: 10.1007/s13365-015-0351-1
91. Jackson AC (2016) Human Rabies: a 2016 Update. *Curr Infect Dis Rep* 18:38. doi: 10.1007/s11908-016-0540-y
92. Jafari M, Ansari-Pour N (2019) Why, When and How to Adjust Your P Values? *Cell J* 20:604–607. doi: 10.22074/cellj.2019.5992
93. Jin D, Otani K, Yamahara K et al. (2011) Adrenomedullin reduces expression of adhesion molecules on lymphatic endothelial cells. *Regul Pept* 166:21–27. doi: 10.1016/j.regpep.2010.08.003
94. Jin Y, Blikslager AT (2016) Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier dysfunction via occludin endocytosis during anoxia/reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 311:C996-C1004. doi: 10.1152/ajpcell.00113.2016
95. Kam KR, Walsh LA, Bock SM et al. (2013) Nanostructure-mediated transport of biologics across epithelial tissue: enhancing permeability via nanotopography. *Nano Lett* 13:164–171. doi: 10.1021/nl3037799
96. Katz ISS, Guedes F, Fernandes ER et al. (2017) Immunological aspects of rabies: a literature review. *Arch Virol* 162:3251–3268. doi: 10.1007/s00705-017-3484-0
97. Kelly RM, Strick PL (2000) Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Methods* 103:63–71. doi: 10.1016/S0165-0270(00)00296-X
98. Kis B, Abrahám CS, Deli MA et al. (2001) Adrenomedullin in the cerebral circulation. *Peptides* 22:1825–1834. doi: 10.1016/s0196-9781(01)00533-2
99. Kis B, Deli MA, Kobayashi H et al. (2001) Adrenomedullin regulates blood-brain barrier functions in vitro. *Neuroreport* 12:4139–4142. doi: 10.1097/00001756-200112210-00055
100. Kis B, Kaiya H, Nishi R et al. (2002) Cerebral endothelial cells are a major source of adrenomedullin. *J Neuroendocrinol* 14:283–293
101. Kis B, Snipes JA, Deli MA et al. (2003) Chronic adrenomedullin treatment improves blood-brain barrier function but has no effects on expression of tight junction proteins. In: Steiger H-J, Kuroiwa T, Baethmann A et al. (eds) *Brain Edema XII*, vol 86. Springer Vienna, Vienna, pp 565–568
102. Kita T, Kitamura K (2022) Adrenomedullin Therapy in Moderate to Severe COVID-19. *Biomedicines* 10. doi: 10.3390/biomedicines10030533
103. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M et al. (1993) Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun* 192:553–560. doi: 10.1006/bbrc.1993.1451
104. Kitamura K, Sakata J, Kangawa K et al. (1993) Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 194:720–725. doi: 10.1006/bbrc.1993.1881
105. Kitamura K, Kangawa K, Eto T (2002) Adrenomedullin and PAMP: discovery, structures, and cardiovascular functions. *Microsc Res Tech* 57:3–13. doi: 10.1002/jemt.10052
106. Klein KR, Karpnich NO, Espenschied ST et al. (2014) Decoy receptor CXCR7 modulates adrenomedullin-mediated cardiac and lymphatic vascular development. *Dev Cell* 30:528–540. doi: 10.1016/j.devcel.2014.07.012
107. Kniesel U, Wolburg H (2000) Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20:57–76. doi: 10.1023/a:1006995910836
108. Kobayashi H, Minami S, Yamamoto R et al. (2000) Adrenomedullin receptors in rat cerebral microvessels. *Molecular Brain Research* 81:1–6. doi: 10.1016/s0169-328x(00)00148-0
109. Kohno M, Hanehira T, Kano H et al. (1996) Plasma adrenomedullin concentrations in essential hypertension. *Hypertension* 27:102–107. doi: 10.1161/01.hyp.27.1.102
110. Kohno M, Yokokawa K, Kano H et al. (1997) Adrenomedullin is a potent inhibitor of angiotensin II-induced migration of human coronary artery smooth muscle cells. *Hypertension* 29:1309–1313. doi: 10.1161/01.hyp.29.6.1309
111. Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T et al. (2013) Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation* 127:842–853. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000756
112. Krajewski D, Paul D, Ge S et al. (2021) Appearance of claudin-5+ leukocyte subtypes in the blood and CNS during progression of EAE. *J Neuroinflammation* 18:296. doi: 10.1186/s12974-021-02328-3
113. Krause G, Protze J, Piontek J (2015) Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol* 42:3–12. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.04.010
114. Kuang Y, Lackay SN, Zhao L et al. (2009) Role of chemokines in the enhancement of BBB permeability and inflammatory infiltration after rabies virus infection. *Virus Res* 144:18–26. doi: 10.1016/j.virusres.2009.03.014
115. Kubo A, Minamino N, Isumi Y et al. (1998) Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J Biol Chem* 273:16730–16738. doi: 10.1074/jbc.273.27.16730
116. Lafon M (2005) Modulation of the immune response in the nervous system by rabies virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 289:239–258. doi: 10.1007/3-540-27320-4_11

117. Lafon M, Mégret F, Meuth SG et al. (2008) Detrimental contribution of the immuno-inhibitor B7-H1 to rabies virus encephalitis. *J Immunol* 180:7506–7515. doi: 10.4049/jimmunol.180.11.7506
118. Lafon M (2008) Immune evasion, a critical strategy for rabies virus. *Dev Biol (Basel)* 131:413–419
119. Lai NY, Mills K, Chiu IM (2017) Sensory neuron regulation of gastrointestinal inflammation and bacterial host defence. *J Intern Med* 282:5–23. doi: 10.1111/joim.12591
120. Le Shen, Black ED, Witkowski ED et al. (2006) Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure. *J Cell Sci* 119:2095–2106. doi: 10.1242/jcs.02915
121. Lentz TL, Burrage TG, Smith AL et al. (1982) Is the acetylcholine receptor a rabies virus receptor? *Science* 215:182–184. doi: 10.1126/science.7053569
122. Li C, Wang Y, Liu H et al. (2020) Change in the Single Amino Acid Site 83 in Rabies Virus Glycoprotein Enhances the BBB Permeability and Reduces Viral Pathogenicity. *Front Cell Dev Biol* 8:632957. doi: 10.3389/fcell.2020.632957
123. Li CX, Waters RS (1991) Organization of the mouse motor cortex studied by retrograde tracing and intracortical microstimulation (ICMS) mapping. *Can J Neurol Sci* 18:28–38. doi: 10.1017/s0317167100031267
124. Looi YH, Kane KA, McPhaden AR et al. (2006) Adrenomedullin acts via nitric oxide and peroxynitrite to protect against myocardial ischaemia-induced arrhythmias in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol* 148:599–609. doi: 10.1038/sj.bjp.0706771
125. Louboutin J-P, Agrawal L, Reyes BAS et al. (2010) HIV-1 gp120-induced injury to the blood-brain barrier: role of metalloproteinases 2 and 9 and relationship to oxidative stress. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:801–816. doi: 10.1097/NEN.0b013e3181e8c96f
126. Lundberg OHM, Lengquist M, Spångfors M et al. (2020) Circulating bioactive adrenomedullin as a marker of sepsis, septic shock and critical illness. *Crit Care* 24. doi: 10.1186/s13054-020-03351-1
127. Lynn KS, Peterson RJ, Koval M (2020) Ruffles and spikes: Control of tight junction morphology and permeability by claudins. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862:183339. doi: 10.1016/j.bbmem.2020.183339.
128. Madhu BP, Singh KP, Saminathan M et al. (2016) Role of nitric oxide in the regulation of immune responses during rabies virus infection in mice. *Virusdisease* 27:387–399. doi: 10.1007/s13337-016-0343-7
129. Malessa R, Heimbach M, Brockmeyer NH et al. (1996) Increased neuropeptide Y-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid and plasma of human immunodeficiency virus-infected patients: relationship to HIV encephalopathy. *J Neurol Sci* 136:154–158. doi: 10.1016/0022-510X(95)00305-L
130. Marinoni E, Di Iorio R, Letizia C et al. (1998) Immunoreactive adrenomedullin in human fetoplacental tissues. *Am J Obstet Gynecol* 179:784–787. doi: 10.1016/s0002-9378(98)70083-3
131. Martínez A, Vos M, Guédez L et al. (2002) The effects of adrenomedullin overexpression in breast tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 94:1226–1237. doi: 10.1093/jnci/94.16.1226
132. Martínez A, Oh H-R, Unsworth EJ et al. (2004) Matrix metalloproteinase-2 cleavage of adrenomedullin produces a vasoconstrictor out of a vasodilator. *Biochem J* 383:413–418. doi: 10.1042/BJ20040920
133. Martínez-Herrero S, Martínez A (2016) Adrenomedullin regulates intestinal physiology and pathophysiology. *Domest Anim Endocrinol* 56 Suppl:S66-83. doi: 10.1016/j.domaniend.2016.02.004
134. Marutsuka K, Hatakeyama K, Sato Y et al. (2003) Immunohistological localization and possible functions of adrenomedullin. *Hypertens Res* 26 Suppl:S33-40
135. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ et al. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333–339. doi: 10.1038/30666
136. Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann K-K (1999) Matrix Protein of Rabies Virus Is Responsible for the Assembly and Budding of Bullet-Shaped Particles and Interacts with the Transmembrane Spike Glycoprotein G. *J Virol* 73:242–250
137. Meeran K, O'Shea D, Upton PD et al. (1997) Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. *J Clin Endocrinol Metab* 82:95–100. doi: 10.1210/jcem.82.1.3656
138. Mégret F, Prehaud C, Lafage M et al. (2007) Modulation of HLA-G and HLA-E expression in human neuronal cells after rabies virus or herpes virus simplex type 1 infections. *Hum Immunol* 68:294–302. doi: 10.1016/j.humimm.2006.12.003
139. Menard C, Pfau ML, Hodes GE et al. (2017) Social stress induces neurovascular pathology promoting depression. *Nat Neurosci* 20:1752–1760. doi: 10.1038/s41593-017-0010-3
140. Minagar A, Maghzi AH, McGee JC et al. (2012) Emerging roles of endothelial cells in multiple sclerosis pathophysiology and therapy. *Neurol Res* 34:738–745. doi: 10.1179/1743132812Y.0000000072
141. Mitic LL, Unger VM, Anderson JM (2003) Expression, solubilization, and biochemical characterization of the tight junction transmembrane protein claudin-4. *Protein Sci* 12:218–227. doi: 10.1110/ps.0233903
142. Molina F, Rus A, Peinado MA et al. (2013) Short-term hypoxia/reoxygenation activates the angiogenic pathway in rat caudate putamen. *Journal of Biosciences* 38:363–371. doi: 10.1007/s12038-013-9327-6
143. Monaco A, Ovrjn B, Axis J et al. (2021) The Epithelial Cell Leak Pathway. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/ijms22147677
144. Morita K, Sasaki H, Furuse M et al. (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185–194. doi: 10.1083/jcb.147.1.185
145. Motulsky HJ, Brown RE (2006) Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression - a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 7:123. doi: 10.1186/1471-2105-7-123

146. Nakamura M, Han B, Nunobiki O et al. (2006) Adrenomedullin: a tumor progression factor via angiogenic control. *Curr Cancer Drug Targets* 6:635–643
147. Nakayama M, Takahashi K, Murakami O et al. (1998) Induction of adrenomedullin by hypoxia and cobalt chloride in human colorectal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 243:514–517. doi: 10.1006/bbrc.1998.8131
148. Niino M, Bodner C, Simard M-L et al. (2006) Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 59:748–754. doi: 10.1002/ana.20859
149. Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S et al. (2006) Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 94:1–7. doi: 10.1038/sj.bjc.6602832
150. Nishikimi T, Kuwahara K, Nakagawa Y et al. (2013) Adrenomedullin in cardiovascular disease: a useful biomarker, its pathological roles and therapeutic application. *Curr Protein Pept Sci* 14:256–267
151. Nishio K, Akai Y, Murao Y et al. (1997) Increased plasma concentrations of adrenomedullin correlate with relaxation of vascular tone in patients with septic shock. *Crit Care Med* 25:953–957. doi: 10.1097/00003246-199706000-00010
152. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19:1584–1596. doi: 10.1038/nm.3407
153. Oehler MK, Norbury C, Hague S et al. (2001) Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth. *Oncogene* 20:2937–2945. doi: 10.1038/sj.onc.1204422
154. Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F et al. (2002) Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo. *Am J Pathol* 160:1279–1292. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62555-2
155. Paxinos G, Franklin KBJ (2001) *The Mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd edn. Academic Press
156. Pedreño M, Morell M, Robledo G et al. (2014) Adrenomedullin protects from experimental autoimmune encephalomyelitis at multiple levels. *Brain Behav Immun* 37:152–163. doi: 10.1016/j.bbi.2013.11.021
157. Phares TW, Kean RB, Mikheeva T et al. (2006) Regional differences in blood-brain barrier permeability changes and inflammation in the apathogenic clearance of virus from the central nervous system. *J Immunol* 176:7666–7675. doi: 10.4049/jimmunol.176.12.7666
158. Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Chiu IM (2017) Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol* 38:5–19. doi: 10.1016/j.it.2016.10.001
159. Plata-Salamán CR, Ilyin SE, Gayle D et al. (1999) Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of mRNAs for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides. *Brain Research Bulletin* 49:441–451. doi: 10.1016/S0361-9230(99)00081-7
160. Ramachandran V, Arumugam T, Hwang RF et al. (2007) Adrenomedullin is expressed in pancreatic cancer and stimulates cell proliferation and invasion in an autocrine manner via the adrenomedullin receptor, ADMR. *Cancer Res* 67:2666–2675. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3362
161. Ramachandran V, Arumugam T, Langley R et al. (2009) The ADMR receptor mediates the effects of adrenomedullin on pancreatic cancer cells and on cells of the tumor microenvironment. *PLoS ONE* 4:e7502. doi: 10.1371/journal.pone.0007502
162. Reiss Y, Engelhardt B (1999) T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int Immunol* 11:1527–1539. doi: 10.1093/intimm/11.9.1527
163. Röhrenbeck AM, Bette M, Hooper DC et al. (1999) Upregulation of COX-2 and CGRP expression in resident cells of the Borna disease virus-infected brain is dependent upon inflammation. *Neurobiol Dis* 6:15–34. doi: 10.1006/nbdi.1998.0225
164. Roy A, Hooper DC (2008) Immune evasion by rabies viruses through the maintenance of blood-brain barrier integrity. *J Neurovirol* 14:401–411. doi: 10.1080/13550280802235924
165. Roy A, Phares TW, Koprowski H et al. (2007) Failure to open the blood-brain barrier and deliver immune effectors to central nervous system tissues leads to the lethal outcome of silver-haired bat rabies virus infection. *J Virol* 81:1110–1118. doi: 10.1128/JVI.01964-06
166. Rullé S, Ah Kioon M-D, Asensio C et al. (2012) Adrenomedullin, a neuropeptide with immunoregulatory properties induces semi-mature tolerogenic dendritic cells. *Immunology* 136:252–264. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03577.x
167. Samak G, Gangwar R, Crosby LM et al. (2014) Cyclic stretch disrupts apical junctional complexes in Caco-2 cell monolayers by a JNK-2-, c-Src-, and MLCK-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306:G947–58. doi: 10.1152/ajpgi.00396.2013
168. Samson WK, Murphy TC (1997) Adrenomedullin inhibits salt appetite. *Endocrinology* 138:613–616. doi: 10.1210/endo.138.2.4943
169. Samson WK, Murphy T, Schell DA (1995) A novel vasoactive peptide, adrenomedullin, inhibits pituitary adrenocorticotropin release. *Endocrinology* 136:2349–2352. doi: 10.1210/endo.136.5.7720684
170. Sasson E, Anzi S, Bell B et al. (2021) Nano-scale architecture of blood-brain barrier tight-junctions. *Elife* 10. doi: 10.7554/eLife.63253
171. Schäfer A, Brooke CB, Whitmore AC et al. (2011) The role of the blood-brain barrier during Venezuelan equine encephalitis virus infection. *J Virol* 85:10682–10690. doi: 10.1128/JVI.05032-11
172. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019
173. Schnell MJ, McGettigan JP, Wirblich C et al. (2010) The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. *Nat Rev Microbiol* 8:51–61. doi: 10.1038/nrmicro2260

174. Scott TP, Nel LH (2016) Subversion of the Immune Response by Rabies Virus. *Viruses* 8. doi: 10.3390/v8080231
175. Senba K, Matsumoto T, Yamada K et al. (2013) Passive carriage of rabies virus by dendritic cells. *Springerplus* 2:419. doi: 10.1186/2193-1801-2-419
176. Serrano J, Alonso D, Fernández AP et al. (2002) Adrenomedullin in the central nervous system. *Microsc Res Tech* 57:76–90. doi: 10.1002/jemt.10053
177. Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H et al. (2001) Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. *Circulation* 104:1964–1971. doi: 10.1161/hc4101.097111
178. Silva AP, Pinheiro PS, Carvalho AP et al. (2003) Activation of neuropeptide Y receptors is neuroprotective against excitotoxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *FASEB J* 17:1118–1120. doi: 10.1096/fj.02-0885fje
179. Sixt M, Engelhardt B, Pausch F et al. (2001) Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* 153:933–946. doi: 10.1083/jcb.153.5.933
180. Smith DM, Coppock HA, Withers DJ et al. (2002) Adrenomedullin: receptor and signal transduction. *Biochem Soc Trans* 30:432–437. doi: 10.1042/bst0300432
181. Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y et al. (2004) Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP. *Exp Cell Res* 300:202–212. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.07.012
182. Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF et al. (2006) Protein kinase C α -RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. *J Biol Chem* 281:8379–8388. doi: 10.1074/jbc.M513122200
183. Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV (2008) Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol* 6:179–192. doi: 10.2174/157015908785777210
184. Steiner O, Coisne C, Cecchelli R et al. (2010) Differential roles for endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in shear-resistant T cell arrest, polarization, and directed crawling on blood-brain barrier endothelium. *J Immunol* 185:4846–4855. doi: 10.4049/jimmunol.0903732
185. Sugo S, Minamino N, Kangawa K et al. (1994) Endothelial cells actively synthesize and secrete adrenomedullin. *Biochem Biophys Res Commun* 201:1160–1166. doi: 10.1006/bbrc.1994.1827
186. Sugo S, Minamino N, Shoji H et al. (1995) Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 207:25–32. doi: 10.1006/bbrc.1995.1148
187. Suzuki H, Tani K, Tamura A et al. (2015) Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J Mol Biol* 427:291–297. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.020
188. Talbot S, Abdunour R-EE, Burkett PR et al. (2015) Silencing Nociceptor Neurons Reduces Allergic Airway Inflammation. *Neuron* 87:341–354. doi: 10.1016/j.neuron.2015.06.007
189. Talbot S, Foster SL, Woolf CJ (2016) Neuroimmunity: Physiology and Pathology. *Annu Rev Immunol* 34:421–447. doi: 10.1146/annurev-immunol-041015-055340
190. Tokuda S, Higashi T, Furuse M (2014) ZO-1 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape. *PLoS ONE* 9:e104994. doi: 10.1371/journal.pone.0104994
191. Tomoda Y, Isumi Y, Katafuchi T et al. (2001) Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells. *Peptides* 22:1783–1794. doi: 10.1016/S0196-9781(01)00519-8
192. Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T et al. (2007) Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:16702–16707. doi: 10.1073/pnas.0705974104
193. Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285–293. doi: 10.1038/35067088
194. Ueda S, Nishio K, Minamino N et al. (1999) Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 160:132–136. doi: 10.1164/ajrccm.160.1.9810006
195. Ueda T, Ugawa S, Saishin Y et al. (2001) Expression of receptor-activity modifying protein (RAMP) mRNAs in the mouse brain. *Molecular Brain Research* 93:36–45. doi: 10.1016/S0169-328X(01)00179-6
196. van Itallie CM, Tietgens AJ, Anderson JM (2017) Visualizing the dynamic coupling of claudin strands to the actin cytoskeleton through ZO-1. *Mol Biol Cell* 28:524–534. doi: 10.1091/mbc.E16-10-0698
197. van Itallie CM, Lidman KF, Tietgens AJ et al. (2019) Newly synthesized claudins but not occludin are added to the basal side of the tight junction. *Mol Biol Cell* 30:1406–1424. doi: 10.1091/mbc.E19-01-0008
198. Vandesompele J, Preter K de, Pattyn F et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034
199. Vázquez R, Riveiro ME, Berenguer-Daizé C et al. (2020) Targeting Adrenomedullin in Oncology: A Feasible Strategy With Potential as Much More Than an Alternative Anti-Angiogenic Therapy. *Front Oncol* 10:589218. doi: 10.3389/fonc.2020.589218
200. Velandia-Romero ML, Castellanos JE, Martínez-Gutiérrez M (2013) In vivo differential susceptibility of sensory neurons to rabies virus infection. *J Neurovirol*:367–375. doi: 10.1007/s13365-013-0179-5
201. Velasco-Villa A, Escobar LE, Sanchez A et al. (2017) Successful strategies implemented towards the elimination of canine rabies in the Western Hemisphere. *Antiviral Res* 413:1–12. doi: 10.1016/j.antiviral.2017.03.023
202. Vidy A, Chelbi-Alix M, Blondel D (2005) Rabies virus P protein interacts with STAT1 and inhibits interferon signal transduction pathways. *J Virol* 79:14411–14420. doi: 10.1128/JVI.79.22.14411-14420.2005

203. Vidy A, El Bougrini J, Chelbi-Alix MK et al. (2007) The nucleocytoplasmic rabies virus P protein counteracts interferon signaling by inhibiting both nuclear accumulation and DNA binding of STAT1. *J Virol* 81:4255–4263. doi: 10.1128/JVI.01930-06
204. Wang F, Millet I, Bottomly K et al. (1992) Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin 2 production by murine T lymphocytes. *J Biol Chem* 267:21052–21057
205. Wang S, Welte T, McGargill M et al. (2008) Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis. *J Immunol* 181:2084–2091. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2084
206. Wang H, Zhang G, Wen Y et al. (2011) Intracerebral Administration of Recombinant Rabies Virus Expressing GM-CSF Prevents the Development of Rabies after Infection with Street Virus. *PLoS ONE* 6. doi: 10.1371/journal.pone.0025414
207. Wang X, Wen Z, Cao H et al. (2023) Transferrin Receptor Protein 1 Is an Entry Factor for Rabies Virus. *J Virol* 97:e0161222. doi: 10.1128/jvi.01612-22
208. Wang ZW, Sarmiento L, Wang Y et al. (2005) Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system. *J Virol* 79:12554–12565. doi: 10.1128/JVI.79.19.12554-12565.2005
209. Warrell DA (1976) The clinical picture of rabies in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 70:188–195. doi: 10.1016/0035-9203(76)90037-7
210. Warrell DA, Davidson NM, Pope HM et al. (1976) Pathophysiologic studies in human rabies. *The American Journal of Medicine* 60:180–190. doi: 10.1016/0002-9343(76)90427-7
211. Washimine H, Asada Y, Kitamura K et al. (1995) Immunohistochemical identification of adrenomedullin in human, rat, and porcine tissue. *Histochem Cell Biol* 103:251–254. doi: 10.1007/BF01457408
212. Weber CR (2012) Dynamic properties of the tight junction barrier. *Ann N Y Acad Sci* 1257:77–84. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06528.x
213. Weihe E, Bette M, Preuss MAR et al. (2008) Role of virus-induced neuropeptides in the brain in the pathogenesis of rabies. *Dev Biol (Basel)* 131:73–81
214. Willoughby RE, Tieves KS, Hoffman GM et al. (2005) Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N Engl J Med* 352:2508–2514. doi: 10.1056/NEJMoa050382
215. Winger RC, Koblinski JE, Kanda T et al. (2014) Rapid remodeling of tight junctions during paracellular diapedesis in a human model of the blood-brain barrier. *J Immunol* 193:2427–2437. doi: 10.4049/jimmunol.1400700
216. Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38:323–337. doi: 10.1016/s1537-1891(02)00200-8
217. Wong LYF, Cheung BMY, Li Y-Y et al. (2005) Adrenomedullin is both proinflammatory and antiinflammatory: its effects on gene expression and secretion of cytokines and macrophage migration inhibitory factor in NR8383 macrophage cell line. *Endocrinology* 146:1321–1327. doi: 10.1210/en.2004-1080
218. World Health Organization (2023) Rabies. <https://www.who.int/health-topics/rabies>. Accessed 06 Mar 2023
219. Wu X, Smith TG, Rupprecht CE (2011) From brain passage to cell adaptation: the road of human rabies vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 10:1597–1608
220. Xia C-F, Yin H, Borlongan CV et al. (2004) Adrenomedullin gene delivery protects against cerebral ischemic injury by promoting astrocyte migration and survival. *Hum Gene Ther* 15:1243–1254. doi: 10.1089/hum.2004.15.1243
221. Xian X, Sakurai T, Kamiyoshi A et al. (2017) Vasoprotective Activities of the Adrenomedullin-RAMP2 System in Endothelial Cells. *Endocrinology* 158:1359–1372. doi: 10.1210/en.2016-1531
222. Yamaguchi T, Baba K, Doi Y et al. (1996) Inhibition of aldosterone production by adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the rat. *Hypertension* 28:308–314. doi: 10.1161/01.hyp.28.2.308
223. Yang Y, Huang Y, Gnanadurai CW et al. (2015) The inability of wild-type rabies virus to activate dendritic cells is dependent on the glycoprotein and correlates with its low level of the de novo-synthesized leader RNA. *J Virol* 89:2157–2169. doi: 10.1128/JVI.02092-14
224. Zaks-Zilberman M, Salkowski CA, Elsasser T et al. (1998) Induction of Adrenomedullin mRNA and Protein by Lipopolysaccharide and Paclitaxel (Taxol) in Murine Macrophages. *Infect Immun* 66:4669–4675
225. Zhao L, Brown LA, Owji AA et al. (1996) Adrenomedullin activity in chronically hypoxic rat lungs. *Am J Physiol* 271:H622-9. doi: 10.1152/ajpheart.1996.271.2.H622
226. Zhao J, Krystofiak ES, Ballesteros A et al. (2018) Multiple claudin-claudin cis interfaces are required for tight junction strand formation and inherent flexibility. *Commun Biol* 1:50. doi: 10.1038/s42003-018-0051-5
227. Zhu S, Guo C (2016) Rabies Control and Treatment: From Prophylaxis to Strategies with Curative Potential. *Viruses* 8. doi: 10.3390/v8110279

12 Anhang

12.1 Macros

12.1.1 Anzahl immunreaktiver ADM-Signale

```

#@ File(label="Choose ND2", style="file") file
from ij import IJ
from loci.plugins import BF
from loci.plugins.in import ImporterOptions
from ij.io import FileSaver
from ij.process import ImageConverter
from ij import IJ, WindowManager
from ij.plugin.frame import RoiManager
from ij.gui import OvalRoi
from ij.measure import ResultsTable
from java.io import File
file = file.getAbsolutePath()
# file = "/E6590b_62_4 Adm ICAM-1 Med re.nd2"
imagetitles = WindowManager.getImageTitles()
for imagetitle in imagetitles:
    img = WindowManager.getImage(imagetitle)
    img.close()
rm = RoiManager.getInstance()
if not rm:
    rm = RoiManager()
rm.reset()
options = ImporterOptions()
options.setColorMode(ImporterOptions.COLOR_MOD
E_GRAYSCALE)
options.setSplitChannels(True)
options.setIid(file)
imps = BF.openImagePlus(options)
c0 = imps[0].getTitle()
c1 = imps[1].getTitle()
for imp in imps:
    imp.show()
IJ.run("Merge Channels...", "c1=[%s] c2=[%s] create
keep" % (c1, c0))
merge = IJ.getImage()
IJ.run("Flatten")
flatten = IJ.getImage()
IJ.run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use
keep")
stack = IJ.getImage()
IJ.run("Make Montage...", "columns=3 rows=1
scale=0.25")
montage = IJ.getImage()
montagefile = file.replace(".nd2", "_montage.tif")
fs = FileSaver(montage)
fs.saveAsTiff(montagefile)
merge.close()
flatten.close()
stack.close()
montage.close()
for imp in imps:
    conv = ImageConverter(imp)
    conv.convertToGray8()
    conv.setDoScaling(True)
IJ.selectWindow(c0)
IJ.setAutoThreshold(imps[0], "Yen dark")
### ROI Adm Yen in C=0 - Measure)
IJ.run("Analyze Particles...", "size=0.003-Infinity
show=Masks display summarize in_situ");
IJ.run("Create Selection");
IJ.run("Make Inverse");
rm.runCommand("Add")
roi = rm.rename(0, "Adm Yen")
IJ.run("Find Maxima...", "prominence=10 output=List");
maximafile = file.replace(".nd2", "_maxima.csv")
results = ResultsTable.getResultsTable()
results.save(maximafile)

```

```

# IJ.saveAs("Results", maximafile)
rm.runCommand("Show All");
x = results.getColumn(0)
y = results.getColumn(1)
for idx, (x, y) in enumerate(zip(x, y)):
    if x<112 or x+112>2048 or y<112 or
y+112>2048:
        continue
    roi = OvalRoi(x-112.5, y-112.5, 225, 225)
    rm.addRoi(roi)
    rm.rename(rm.getCount()-1, "%d - %d" % (x,
y))
rm.runCommand("Combine")
rm.runCommand("Add")
rm.rename(rm.getCount()-1, "Adm ROIs combined")
rm.select(rm.getCount()-1)
IJ.run("Make Inverse");
rm.runCommand("Add")
rm.rename(rm.getCount()-1, "Adm ROIs inverse")
IJ.selectWindow(c1)
IJ.run("Select All");
IJ.run("Measure");
for idx in range(1, rm.getCount()):
    rm.select(idx)
    IJ.run("Measure")
##C=1 image Signale als ROI anlegen und messen
IJ.run("Select None");
IJ.setAutoThreshold(imps[1], "Triangle dark")
IJ.run("Create Selection")
rm.runCommand("Add")
rm.rename(rm.getCount()-1, "Icam1 Triangle")
rm.runCommand("Measure")
# //C=1 image Signale freistellen und alle Maxima-
ROIs einzeln, kombiniert und invertiert messen
IJ.setAutoThreshold(imps[1], "Triangle dark")
IJ.run("Convert to Mask", "background=Dark");
IJ.run("Select All")
IJ.run("Measure")
for idx in range(1, rm.getCount()):
    rm.select(idx)
    IJ.run("Measure")
# //IJ.selectWindow(c0)
# //rm.select(0)
# //IJ.run("Measure");
# //Results Table speichern
resultsfile = file.replace(".nd2", "_results.csv")
results = ResultsTable.getResultsTable()
results.save(resultsfile)
roifile = file.replace(".nd2", "_RoiSet.zip")
rm.runCommand("Save", roifile)
# //Adm Yen rot, Maxima-ROIs gelb,
roiManager("Show All"), Icam1 Yen durch Auswaehlen
hellblau)

```

12.1.2 Immunreaktive Fläche von ADM

```

// "Montagen" - adjust directory ("path = "..."")
open();
// In the Open UI select/check the following: View
Stack with Hyperstack; Color Mode Default; Split
channels
fileName = File.nameWithoutExtension;
path = "Pfad einfügen";
// Generating green-red-merge panel from green-red
channel images:
selectImage(1);
rename("C2");
selectImage(2);

```

```

rename("C1");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] keep");
run("Merge Channels...", "c1=[C1] c2=[C2] keep");
selectWindow("Stack");
close();
selectWindow("RGB");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] keep");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Original.tif");
close();
selectWindow("Stack");
close();
selectImage("C1");
close();
selectImage("C2");
close();
// Preparing settings for the following measurements:
run("Set Measurements...", "area area_fraction limit
display redirect=None decimal=2");
run("Colors...", "foreground=white background=black
selection=magenta");
run("Smooth", "stack");
run("Split Channels");
selectImage(1);
rename("C2");
selectImage(2);
rename("C1");
selectImage(3);
close();
// Generating a Channel 1 image (Adm) with
subtracted background:
selectImage("C1");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
run("Make Inverse");
getStatistics(area, mean);
C1bg=mean;
print("C1-background: ", C1bg);
run("Select None");
run("Subtract...", "value="+C1bg);
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear Outside");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 equalize");
run("Duplicate...", "title=Adm");
// Generating a Channel 2 image (RNMAS) with
subtracted background:
selectImage("C2");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
run("Make Inverse");
getStatistics(area, mean);
C2bg=mean;
print("C2-background: ", C2bg);
run("Select None");
run("Subtract...", "value="+C2bg);
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
setBackground(0, 0, 0); run("Clear Outside");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 equalize");
run("Duplicate...", "title=RNMAS");
// Generating a Montage with the images without
background
run("Concatenate...", " title=merge image1=RNMAS
image2=Adm");
run("Make Composite", "display=Composite");
run("Flatten");
selectWindow("C1");
selectWindow("C2");
selectWindow("merge (RGB)");
rename("merge");
run("Images to Stack",
"name=Subtracted_Background title=[] keep");

```

```

run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Substracted_Background.tif");
close();
selectWindow("Substracted_Background");
close();
selectWindow("merge");
close();
// Segmentation of C1 (Adm)
selectWindow("C1");
run("Select None");
run("Duplicate...", "title=thresholded1");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Duplicate...", "title=Adm");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=0.003-25
circularity=0.00-1.00 show=Masks summarize");
rename("Mask_Adm");
selectWindow("thresholded1");
close();
selectWindow("Adm");
close();
// Segmentation of C2 (RNMAS)
selectWindow("C2");
run("Select None");
run("Duplicate...", "title=thresholded2");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Duplicate...", "title=RNMAS");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Convert to Mask");
run("Measure");
rename("Mask_RNMAS");
run("Invert");
selectWindow("thresholded2");
close();
selectWindow("C1");
close();
selectWindow("C2");
close();
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] ");
run("Make Montage...", "columns=2 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Masked.tif");
run("Close All");

```

12.1.3 Immunreaktive Fläche von RAMP2

```

// "Montagen" - adjust directory ("path = "...")
open();
// In the Open UI select/check the following: View
Stack with Hyperstack; Color Mode Default; Split
channels
fileName = File.nameWithoutExtension;
// Generating green-red-merge panel from green-red
channel images:
selectImage(1);
rename("C2");
selectImage(2);
rename("C1");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] keep");
run("Merge Channels...", "c1=[C1] c2=[C2] keep");
selectWindow("Stack");
close();
selectWindow("RGB");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] keep");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Original.tif");

```

```

close();
selectWindow("Stack");
close();
selectImage("C1");
close();
selectImage("C2");
close();
// Preparing settings for the following measurements:
run("Set Measurements...", "area mean min
area_fraction display redirect=None decimal=2");
run("Colors...", "foreground=white background=black
selection=magenta");
run("Smooth", "stack");
run("Split Channels");
selectImage(1);
rename("C2");
selectImage(2);
rename("C1");
selectImage(3);
close();
selectImage("C2");
run("Duplicate...", "title=Icam1");
// Generating a Channel 1 image (RAMP2) with
subtracted background:
selectImage("C1");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
run("Make Inverse");
getStatistics(area, mean);
C1bg=mean;
print("C1-background: ", C1bg);
run("Select None");
run("Subtract...", "value="+C1bg);
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear Outside");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 equalize");
run("Duplicate...", "title=RAMP2");
// Generating a Montage with the images without
background
run("Concatenate...", " title=merge image1=RAMP2
image2=Icam1");
run("Make Composite", "display=Composite");
run("Flatten");
selectWindow("C1");
selectWindow("C2");
selectWindow("merge (RGB)");
rename("merge");
run("Images to Stack",
"name=Subtracted_Background title=[] keep");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Subtracted_Background.tif");
close();
selectWindow("Subtracted_Background");
close();
selectWindow("merge");
close();
// Segmentation of C1 (RAMP2)
selectWindow("C1");
run("Select None");
run("Duplicate...", "title=thresholded1");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Duplicate...", "title=RAMP2");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=0.003-25
circularity=0.00-1.00 show=Masks summarize");
rename("Mask_RAMP2");
saveAs("tiff", path + "Mask_RAMP2.tif");
close();
selectWindow("thresholded1");
close();

selectWindow("RAMP2");
close();
// Segmentation of C2 (ICAM1)
selectWindow("C2");
run("Select None");
run("Duplicate...", "title=thresholded2");
setAutoThreshold("Triangle dark");
run("Duplicate...", "title=ICAM1");
setAutoThreshold("Triangle dark");
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=0.3-infinity
circularity=0.00-1.00 show=Masks summarize");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "ICAM1+ Vessels");
run("Make Inverse");
roiManager("Update");
rename("Mask_ICAM1");
saveAs("tiff", path + "Mask_ICAM1.tif");
close();
selectWindow("thresholded2");
close();
selectWindow("ICAM1");
close();
selectWindow("C2");
roiManager("Deselect");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
// Finishing up
selectWindow("C1");
close();
selectWindow("C2");
close();
run("Close All");
open(path + "Mask_RAMP2.tif");
open(path + "Mask_ICAM1.tif");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[]");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Masks+ROIs.tif");
close();
selectWindow("Stack");
close();
run("Close All");

```

12.1.4 Anzahl immunreaktiver RAMP2-Signale

```

// "Montagen" - adjust directory ("path = "...")
open();
// In the Open UI select/check the following: View
Stack with Hyperstack; Color Mode Default; Split
channels
fileName = File.nameWithoutExtension;
// Generating green-red-merge panel from green-red
channel images:
selectImage(1);
rename("C2");
selectImage(2);
rename("C1");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] keep");
run("Merge Channels...", "c1=[C1] c2=[C2] keep");
selectWindow("Stack");
close();
selectWindow("RGB");
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] keep");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Original.tif");

```

```

close();
selectWindow("Stack");
close();
selectImage("C1");
close();
selectImage("C2");
close();
// Preparing settings for the following measurements:
run("Set Measurements...", "area area_fraction limit
display redirect=None decimal=2");
run("Colors...", "foreground=white background=black
selection=magenta");
run("Smooth", "stack");
run("Split Channels");
selectImage(1);
rename("C2");
selectImage(2);
rename("C1");
selectImage(3);
close();
// Generating a Channel 1 image (RAMP2) with
subtracted background:
selectImage("C1");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
run("Make Inverse");
getStatistics(area, mean);
C1bg=mean;
print("C1-background: ", C1bg);
run("Select None");
run("Subtract...", "value="+C1bg);
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear Outside");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 equalize");
run("Duplicate...", "title=RAMP2");
// Generating a Channel 2 image (RNMAS) with
subtracted background:
selectImage("C2");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
run("Make Inverse");
getStatistics(area, mean);
C2bg=mean;
print("C2-background: ", C2bg);
run("Select None");
run("Subtract...", "value="+C2bg);
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Create Selection");
setBackground(0, 0, 0);
run("Clear Outside");
run("Enhance Contrast...", "saturated=0.1 equalize");
run("Duplicate...", "title=RNMAS");
// Generating a Montage with the images without
background
run("Concatenate...", " title=merge image1=RNMAS
image2=RAMP2");
run("Make Composite", "display=Composite");
run("Flatten");
selectWindow("C1");
selectWindow("C2");
selectWindow("merge (RGB)");
rename("merge");
run("Images to Stack",
"name=Subtracted_Background title=[] keep");
run("Make Montage...", "columns=3 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Subtracted_Background.tif");
close();
selectWindow("Subtracted_Background");
close();
selectWindow("merge");
close();
// Segmentation of C1 (RAMP2)

```

```

selectWindow("C1");
run("Select None");
run("Duplicate...", "title=thresholded1");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Duplicate...", "title=RAMP2");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=0.003-25
circularity=0.00-1.00 show=Masks summarize");
rename("Mask_RAMP2");
selectWindow("thresholded1");
close();
selectWindow("RAMP2");
close();
// Segmentation of C2 (RNMAS)
selectWindow("C2");
run("Select None");
run("Duplicate...", "title=thresholded2");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Duplicate...", "title=RNMAS");
setAutoThreshold("Yen dark");
run("Convert to Mask");
run("Measure");
rename("Mask_RNMAS");
run("Invert");
selectWindow("thresholded2");
close();
selectWindow("C1");
close();
selectWindow("C2");
close();
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] ");
run("Make Montage...", "columns=2 rows=1 scale=1
border=5");
saveAs("tiff", path + fileName +
"_Montage_Masked.tif");
run("Close All");

```

12.1.5 Intravasales Albumin in der Kleinhirnrinde

```

//Stratum moleculare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
// Stratum granulare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
//jetzt Skript laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", " ");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Mol");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "Gran");
roiManager("Select", 1);
run("Measure");
run("Select None");
run("Duplicate...", " ");
// Triangle-Threshold Maske zur Selektion der
positiven Gefäße
setAutoThreshold("Triangle");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
// Entfernen aller Segmente mit einer Fläche kleiner 20
qum

```

```

run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity um
show=Masks in_situ");
run("Convert to Mask");
// In den Roi-Manager als "Positive Vessels"
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "Positive Vessels");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,2));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Rename", "Positive Vessels in Mol");
roiManager("Select", 3);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(1,2));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 4);
roiManager("Rename", "Positive Vessels in Gran");
roiManager("Select", 4);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,3));
roiManager("XOR");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 5);
roiManager("Rename", "Mol w/o positive vessels");
roiManager("Select", 5);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(1,4));
roiManager("XOR");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 6);
roiManager("Rename", "Gran w/o positive vessels");
roiManager("Select", 6);
run("Measure");
run("Select None");
run("Select None");
roiManager("Select", 6);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 5);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 4);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.6 Intravasales Albumin in Kleinhirnrinde und -kernen

```

//Gewebe selektieren und mit "t" zum ROI Manager
hinzufügen
// Block des Skripts laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", "");
roiManager("Select", 0);

```

```

roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Duplicate...", "");
// Triangle-Threshold Maske zur Selektion der
positiven Gefäße
setAutoThreshold("Triangle");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
// Entfernen aller Segmente mit einer Fläche kleiner 20
qum
run("Analyze Particles...", "size=20-Infinity um
show=Masks in_situ");
run("Convert to Mask");
// In den Roi-Manager als "Positive Vessels"
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "Positive Vessels");
//müssen falsch-positive Gefäße ausgeschlossen
werden?
//Maske und ROI evtl nacharbeiten, dann zweiten
Block des Skripts ablaufen lassen
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "Positive Vessels in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,2));
roiManager("XOR");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Rename", "Tissue w/o positive vessels");
roiManager("Select", 3);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.7 ICAM1-Fläche in der Kleinhirnrinde: Schema 1

```

//Stratum moleculare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
// Stratum granulare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
// Skript laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", "");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Select None");
run("Duplicate...", "");
//Selektion der Icam1 ir-positiven Fläche

```

```

setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "Icam1 ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "Icam1 ir+ Fläche in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.8 ICAM1-Fläche in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 1

```

//Gewebe selektieren und mit "t" zum ROI Manager
hinzufügen
// ersten Block des Skripts laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", " ");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Duplicate...", " ");
//Selektion der Icam1 ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "Icam1 ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "Icam1 ir+ in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.9 ICAM1-Fläche in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 2

```

//Gewebe selektieren und mit "t" zum ROI Manager
hinzufügen
//jetzt ersten Block des Skripts laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(-190, 325);
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", " ");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Duplicate...", " ");
//Selektion der Icam1 ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "Icam1 ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "Icam1 ir+ in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.10 RNP in der Kleinhirnrinde: Schema 1

```

//Stratum moleculare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
// Stratum granulare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
// Skript laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", " ");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Mol");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "Gran");
roiManager("Select", 1);
run("Measure");

```

```

run("Select None");
run("Duplicate...", "");
//Selektion der RNP ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,2));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche in Mol");
roiManager("Select", 3);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(1,2));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 4);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche in Gran");
roiManager("Select", 4);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 4);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.11 RNP in der Kleinhirnrinde: Schema 2

```

//Stratum moleculare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
// Stratum granulare selektieren, zum ROI Manager
hinzufügen
// Skript laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", "");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Mol");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "Gran");
roiManager("Select", 1);
run("Measure");
run("Select None");
run("Duplicate...", "");
//Selektion der RNP ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,2));

```

```

roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche in Mol");
roiManager("Select", 3);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(1,2));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 4);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche in Gran");
roiManager("Select", 4);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 4);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 3);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.12 RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 1

```

//Gewebe selektieren und mit "t" zum ROI Manager
hinzufügen
// ersten Block des Skripts laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(-220, 325);
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", "");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Duplicate...", "");
//Selektion der RNP ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "RNP ir+ in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")

```

12.1.13 RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 2

```
//Gewebe selektieren und mit "t" zum ROI Manager
hinzufügen
// ersten Block des Skripts laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", " ");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Duplicate...", " ");
//Selektion der RNP ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "RNP ir+ in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")
```

12.1.14 RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 3

```
//Gewebe selektieren und mit "t" zum ROI Manager
hinzufügen
// ersten Block des Skripts laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(-190, 325);
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
run("Duplicate...", " ");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Duplicate...", " ");
//Selektion der RNP ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
```

```
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche");
run("Select None");
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "RNP ir+ in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")
```

12.1.15 RNP in Kleinhirnrinde und -kernen: Schema 4

```
//Gewebe selektieren und mit "t" zum ROI Manager
hinzufügen
// ersten Block des Skripts laufen lassen
// in 8-Bit Schwarzweiß-Bild konvertieren
run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(-220, 325);
run("Select None");
run("8-bit");
// Maßstab anpassen und Messparameter festlegen
run("Set Scale...", "distance=215 known=20 pixel=1
unit=um");
run("Set Measurements...", "area mean standard min
display redirect=None decimal=3");
//Arbeitskopie...
run("Duplicate...", " ");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "Tissue");
roiManager("Select", 0);
run("Measure");
run("Duplicate...", " ");
//Selektion der RNP ir-positiven Fläche
setThreshold(0, 170);
run("Convert to Mask");
run("Create Selection");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Rename", "RNP ir+ Fläche");
run("Select None");
// close();
roiManager("Select", newArray(0,1));
roiManager("AND");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "RNP ir+ in Tissue");
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Select None");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 1);
roiManager("Delete");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Delete");
run("Close All")
```

12.2 Workflow der Signal-Quantifizierung von RABV RNP und ICAM1

1. Bild skalieren
 2. Gewebe als ROI definieren und Fläche messen
 3. Threshold-Signal festlegen (Grauwerte zwischen 0 – 170)
 4. Signal als ROI definieren
 5. Fläche des überlagerten Signals im ROI Gewebe messen
 6. Daten prozessieren: Fläche des Signals im ROI Gewebe/Fläche des Gewebes [%]

Label	Area μm^2
1 2 E6606a_6_2 li M1-1.tif-Tissue	79297.973
2 5 E6606a_6_2 li M1-1.tif-RNP ir+ in Tissue	4154.072

6 = $4154.072/79297.973 = 5.239\%$

Label	Area μm^2
1 2 M3811b_95_3 li Med-1.tif-Tissue	79297.973
2 5 M3811b_95_3 li Med-1.tif-ICAM1 ir+ in Tissue	11746.310

6 = $11746.310/79297.973 = 14.813\%$

12.3 Workflow der Signal-Quantifizierung von intra- und extravasalem Albumin

1. Bild skalieren
 2. Gewebe als ROI definieren und Fläche messen
 3. Threshold-Signal festlegen (hier: Triangle Algorithmus)
 4. Ausschluss von Signalbereichen kleiner $20 \mu\text{m}^2$
 5. Maske als ROI definieren = Albumin IR+ Gefäße
 6. Überlagerte Fläche der ROI-Gefäße im ROI-Gewebe messen
 7. Grauwerte im ROI-Gewebe ohne ROI-Gefäße messen = extravasale Albumin IR
 8. Daten prozessieren [%]

Label	Area μm^2	Mean	StdDev	Min	Max
1 E6606b_47_2 re Med-1.tif-Tissue	79297.973	198.731	11.469	98	227
2 E6606b_47_2 re Med-1.tif-Positive Vessels in Tissue	2071.442	151.243	26.106	98	184
3 E6606b_47_2 re Med-1.tif-Tissue w/o positive vessels	77226.531	200.005	7.395	110	227

8 = $2071.442/79297.973 = 2.61\%$

12.4 Workflow Claudin 5-Auswertung

Icam1-Cy3 Cld5-A488Cldn5 A488 C=0

Process/SmoothAnalyze/Histogram

erste Ebene, bei der der Peak des Histogramms in der Peak-Range lag

letzte Ebene, bei der der Peak des Histogramms in der Peak-Range lag

Maximum und Peak-Range identifizieren

Close Histogram

Analyze/Histogram... Live: bei welchen Ebenen ist der Peak in der gerade identifizierten Peak-Range?

Image/Stack/Tools/Slice Keeper... stabile Ebenen eingeben, Increment 1

Dateiname und first slice/last slice in Exceldata1 eintragen

Original C=0 schließen, reduzierten Stack speichern, dann schließen

Icam-1 C=1: (Cy3)

ICAM1-positive ROI definieren

Process/Smooth

Image/Stack/Tools/Slice Keeper... gleiche Ebenen eingeben wie bei Cldn5,

Increment 1

Original C=1 schließen, reduzierten Stack speichern, dann schließen

reduzierten Icam1-Stack öffnen

Image/Adjust/Threshold... Apply...OK

Binary-Stack Ebene für Ebene durchgehen

Claudin-5 skeletonisieren

Ebene 1 auswählen, "

0" = create selection

"t" = Add to Manager

Image/Stacks/Next slice,

"0" = create selection "t" = Add to Manager

...wiederholen bis zur letzten Ebene

ROIs sichern

alles schließen

reduzierten Cldn5-Stack öffnen

Image/Adjust/Threshold... Apply...Apply...OK

Plugins/Skeleton/Skeleton 2D/3D

ICAM-1 positive ROI analysieren

Analyze/Skeleton/Analyze Skeleton 2D/3D

Sichern: "Branch information" mit Bilddateiname und "Cldn5 gesamt"

Skeleton-Stack speichern

alles schließen

Skeleton-Stack öffnen

gespeicherte ROI öffnen

Stack-Ebenen nacheinander durchgehen und im ROI Manager auf die dazugehörige ROI klicken, dann jeweils

Edit/Clear outside, dabei nicht Stack prozessieren

Ebene 1 auswählen, auf ROI 0001-... klicken, "6" = clear outside

Image/Stacks/Next slice,

auf ROI 0001-... klicken, "6" = clear outside

ICAM-1 negative ROI analysieren

...wiederholen bis zur letzten Ebene

Edit/Selection/Select None

Analyze/Skeleton/Analyze Skeleton (2D/3D)

Sichern: "Branch information" mit Bilddateiname und "Cldn5 Icam1+"

alles schließen (bearbeiteten Skeleton-Stack nicht speichern)

Skeleton-Stack öffnen

gespeicherte ROI öffnen

Stack-Ebenen nacheinander durchgehen und im ROI Manager auf die dazugehörige ROI klicken, dann jeweils

Edit/Clear, dabei nicht Stack prozessieren

Ebene 1 auswählen,

auf ROI 0001-... klicken, "8" = clear

Image/Stacks/Next slice,

auf ROI 0001-... klicken, "8" = clear

...wiederholen bis zur letzten Ebene

Edit/Selection/Select None

Analyze/Skeleton/Analyze Skeleton (2D/3D)

Sichern: "Branch information" mit Bilddateiname und "Cldn5 Icam1-"

alles schließen (bearbeiteten Skeleton-Stack nicht speichern)

12.5 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

12.6 Liste akademischer LehrerInnen

Meine akademischen LehrerInnen in Marburg waren:

Adamkiewicz, Aigner, Baranovski, Bartsch, Bauer, Becker, Becker, Bertoune, Bette, Bien, Birk, Bliemel, Bonaterra, Bösner, Brandt, Brehm, Cetin, Decher, Del Rey, Denkert, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Eggers, Engenhardt-Cabillic, Ermisch, Feuser, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Greulich, Günther, Halaszovich, Hertl, Hildebrandt, Hofmann, Hoyer, Jansen, Kalder, Kann, Kinscherf, Kirschbaum, Kircher, Koehler, Köhler, Kühnert, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Luster, Mahnken, Maier, Maisner, Meißner, Mirow, Moll, Mutters, Nenadić, Neubauer, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Pagenstecher, Parahuleva, Plant, Preisig-Müller, Pfützner, Rastan, Reese, Renigunta, Renke, Renz, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schratt, Schröder, Schütz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stahl, Steiniger, Stiewe, Stuck, Tackenberg, Thieme, Timmermann, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Westermann, Wiesmann, Wilhelm, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Ziller.

12.7 Danksagung

Ich möchte mich herzlich für die hervorragende Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei Dr. Mirjam Bertoune bedanken, ohne die die Erstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Deine Expertise, Präzision und Strukturierung waren die Grundlage für das Gelingen dieser Arbeit. Danke für die vertrauensvolle und einfach fantastische Zusammenarbeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Ralf Kinscherf und allen MitarbeiterInnen der AG Medizinische Zellbiologie sowie der AG Molekulare Neurowissenschaften aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie, die mir bei so einigen Schwierigkeiten und Herausforderungen in der Durchführung der molekularbiologischen und immunhistologischen Methoden mit ihrer praktischen Erfahrung zur Seite gestanden haben.

Abschließend möchte ich meiner Familie, meiner Mutter Anja, meiner Schwester Eva und meinen Großeltern danken, die mich immer bedingungslos in Allem unterstützt und gefördert haben. Euch verdanke ich alles.

12.8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Rolle des Neuropeptids Adrenomedullin im Rabiesvirus-infizierten Maushirn“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie unter Leitung von Prof. Dr. Ralf Kinscherf mit Unterstützung durch Dr. Mirjam Bertoune ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.“*2

Ort, Datum, Unterschrift Referent