

Untersuchungen zur gastro-intestinalen Infektionsbarriere beim
Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Arne Hübner

Geboren am 06. Juli 1975 in Hannover

2012

Referent: Apl. Prof. Dr. rer. nat. Dieter Steinhagen

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Wilfried Meyer

Tag der Promotion: 07. Mai 2012

ZUSAMMENFASSUNG

Wie bei allen Wirbeltieren, so hat auch bei Fischen das Darmepithel mit seiner aufliegenden Schleimschicht eine wichtige Barrierefunktion gegen das Eindringen von Pathogenen. Seine Integrität wird gewährleistet durch transmembranäre Proteine, welche sowohl für den Kontakt zwischen benachbarten Zellen als auch für Transportprozesse über Zellgrenzen hinweg eine besondere Rolle spielen. Zu solchen Transmembranproteinen zählen die Claudine, welche für Säugetiere bereits umfangreich beschrieben wurden, während für ihre Ausbildung bei Fischen teilweise noch erhebliche Kenntnislücken zu verzeichnen sind. Des weiteren tragen antimikrobielle Peptide, wie β -Defensine oder Lysozym, als von der Mukosa produzierte und in die Schleimauflage sezernierte humorale Substanzen zur Infektionsbarriere im Darm bei.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression der antimikrobiellen Peptide β -Defensin-2 und -3 und Lysozym sowie der Transmembranproteine Claudin-1 und -2 bei gesunden Karpfen und bei Karpfen unter dem Einfluß einer KHV-Infektion zu untersuchen und zu vergleichen. Im Zusammenhang mit parallel dazu erfolgenden Untersuchungen der histopathologischen Entwicklung des Darmgewebes im Krankheitsverlauf sollte überprüft werden, inwiefern auf eine mögliche Beeinträchtigung der Funktionalität der gastrointestinalen Immunbarriere einschließlich der Integrität des epithelialen Zellverbandes des Darmes geschlossen werden kann.

Hierfür wurde ein Infektionsmodell auf zellkulturbasierendem Virus gewählt. Spezifisch-pathogenfreie Karpfen, welche unter Laborbedingungen virusfrei erbrütet und aufgezogen wurden, wurden oral mit im Labor vermehrtem Koi-Herpesvirus infiziert und ihnen nach 2, 5, 8 und 13 Tagen Proben des Mittel- und Enddarmgewebes entnommen. Von diesen Gewebeproben wurden histologische Querschnittspräparate erstellt, welche im Anschluß den histopathologischen Untersuchungen sowie der Detektion der o. a. Peptide zugeführt wurden. Hierfür gelangten immunhistochemische Techniken zur Anwendung. Die Kontrolle des Infektionserfolges erfolgte parallel zu diesen Untersuchungen mittels PCR.

Alle mit dem Koi-Herpesvirus infizierten Karpfen konnten positiv auf KHV getestet werden.

Die histopathologischen Untersuchungen ergaben auffällige klinische Veränderungen des Mittel- und Enddarmgewebes der infizierten Individuen. Einhergehend mit einer deutlichen Verkürzung der Mukosafalten und einer Reduktion der Becherzellen, kam

es im Krankheitsverlauf in beiden Darmsegmenten zu Schädigungen der Enterozyten an den Falten spitzen sowie zu einer starken Proliferation der Lamina submucosa und der Lamina propria. Die Veränderungen der Darmgewebe erschienen bei älteren Individuen optisch geringgradiger, bei diesen waren zudem vereinzelt bereits regenerative Bereiche erkennbar.

Die Antikörper gegen die antimikrobiellen Peptide banden im Falle von β -Defensin-2 und -3 vor allem an Strukturen der Enterozyten einschließlich des Zytosols, bei Lysozym wurden auch die Zellen von Lamina propria und Lamina submucosa markiert. Bei allen Färbungen wies insbesondere die Schleimauflage sehr hohe Bindungsintensitäten auf. Unterschiede zwischen nicht infizierten und KHV-infizierten Individuen sowie im Infektionsverlauf traten nicht in Erscheinung.

Die Antikörper gegen Claudin-1 und -2 banden an Strukturen der Zellwände der Enterozyten, Schleimauflage und sämtliche anderen Gewebe der Darmmukosa blieben ungefärbt. Claudin-1 zeigte nach erfolgter Infektion zunächst einen Rückgang der Bindungsintensitäten, welche gegen Versuchsende zum Teil wieder anstiegen, während Claudin-2 nach erfolgter Infektion besonders im Enddarm zunächst mit einem Anstieg der Expression reagierte, welcher zum Versuchsende hin wieder zurückging. Unabhängig vom Infektionszustand war ein Rückgang der Bindungsintensitäten mit zunehmendem Alter und Gewicht der Individuen zu verzeichnen. Insgesamt waren die Bindungsintensitäten bei den KHV-infizierten Karpfen zumeist schwächer als bei den nicht infizierten Individuen.

Die gefundenen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass es im Verlauf einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus zu einer Beeinträchtigung der gastrointestinalen Immunbarriere kommen kann. Das Aufbrechen des epithelialen Zellverbandes, einhergehend mit der verminderten Expression vor allem von Claudin-1, kann das Auftreten von Sekundärinfektionen infolge des erleichterten Eindringens von potentiellen Pathogenen fördern. Die durchgehend starke Expression der antimikrobiellen Peptide unterstreicht zusammen mit den Befunden für die Transmembranproteine die Bedeutung dieser Verbindungen auch für die unspezifische Immunantwort der Fische.

ABSTRACT

Like in all vertebrates, the epithelium of the fish intestine offers crucial barrier functions against pathogen invasions. Its integrity is guaranteed by transmembrane proteins, playing a major role in the forming of tight junctions and influencing the ion flux via the paracellular pathway. Among these transmembrane proteins, claudins have been extensively described for mammals, while information as to their expression in fishes is still largely missing. In addition to that, antimicrobial peptides like β -defensins and lysozyme, humoral substances produced by the intestinal mucosa and secreted into the mucus layer, contribute to the intestinal immune barrier.

The aim of this study was to investigate and to compare the expression of the antimicrobial peptides β -defensin-2 and -3 and lysozyme, as well as of the transmembrane proteins claudin-1 and -2 in uninfected carp and in carp infected with koi-herpesvirus. Along with checking on histopathological changes during development of the disease, the potential for impairment of the intestinal barrier functions including loss of the epithelial integrity should be investigated.

For that, an infection model based on cell-culture bred koi-herpesvirus was chosen. Specific pathogen free carp, raised under virus-free laboratory conditions, were infected orally with the virus, and samples of their midgut and hindgut tissues were taken on day 2, 5, 8, and 13 post infection. These samples have been prepared for further histopathological and immunohistochemical investigations. Successful infection of each carp was confirmed by PCR.

Histopathological investigations revealed huge changes in the tissues of both gut segments, including shortening of the mucosal folds, reduction of goblet cell number, severe damage of enterocytes and proliferation of the lamina propria and lamina submucosa. Older individuals showed less damage and signs of recovery.

Antibodies directed against β -defensin-2 and -3 mainly attached to structures within the enterocytes including the cytosol, in the case of lysozyme also the cells of the lamina propria and lamina submucosa have been stained. The mucus layer showed extremely strong binding intensities in all staining procedures. No differences were found between uninfected and infected individuals nor during the course of the infection.

Antibodies directed against claudin-1 and -2 bound exclusively to structures of the enterocyte cell walls. The mucus layer as well as all other mucosal tissues remained

unstained. Claudin-1 decreased directly after infection, recovering towards the end of the test phase, while claudin-2 responded to infection by a strong increase of expression mainly in the hindgut, decreasing to control level towards the end of the test phase. Overall findings displayed weaker staining in infected carp compared to control individuals as well as decreasing staining intensities with increasing size and weight of the carp.

As a conclusion, the results of this study indicate a considerable potential of impairment of the gastro-intestinal immune barrier in the wake of a KHV-infection. Epithelial disruption along with reduced expression of claudin-1 may facilitate the invasion of potential pathogens and thus give rise to secondary infections. In combination with the continuous strong expression of the antimicrobial peptides, these findings emphasize the importance of these molecules for the innate immune system of fishes.

Immune barrier – intestine – carp

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	3
ABSTRACT	5
INHALTSVERZEICHNIS	7
LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN.....	9
TABELLENVERZEICHNIS	11
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	13
1. EINLEITUNG	14
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. Herkunft der Versuchstiere	22
2.2. Virus.....	22
2.2.1 Herkunft.....	22
2.2.2 Zellkultur	23
2.2.3 Virusvermehrung	23
2.2.4 Virustitration	24
2.2.5 Virusnachweis	24
2.2.5.1 Immunfluoreszenz.....	24
2.2.5.2 Molekularbiologischer Nachweis einer Infektion von Zellen mit dem Koi-Herpesvirus	26
2.2.5.2.1 DNA-Extraktion aus Kulturzellen und Geweben	26
2.2.5.2.2 PCR.....	27
2.2.5.2.3 Gelelektrophorese	29
2.3 Infektionsversuche mit Karpfen.....	30
2.3.1 Versuchstiere und Hälterung	30
2.3.2 Infektion.....	31
2.3.3 Narkose	31
2.4 Probengewinnung	31
2.4.1 Tötung und Sektion	31
2.4.2 Probennahme	32
2.5 Histologie	33
2.5.1 Gewebefixierung.....	33
2.5.2 Paraffineinbettung	33
2.5.3 Schneiden	33
2.6 Immunhistochemie.....	34
2.6.1 Primäre Antikörper.....	34
2.6.2 Detektionssystem	35
2.6.3 Ablauf der immunhistologischen Färbung	35

2.6.4 Kontrollen	38
2.7 Mikroskopische Auswertung	38
2.7.1 Histopathologische Veränderungen der Darmmukosa	38
2.7.2 Immunhistochemische Befunde	39
2.7.3 Western Blotting	39
3 ERGEBNISSE	40
3.1 Infektionserfolg und Krankheitsverlauf nach experimenteller Infektion mit KHV	40
3.2 Vermehrungskinetik des Koi-Herpesvirus in der Zellkultur	41
3.3 Veränderungen im infizierten Darmgewebe	43
3.4 Immunhistochemische Befunde	48
3.4.1 Claudin 1	48
3.4.1.1 Bindung des für humanes Claudin-1 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm	48
3.4.1.2 Befunde an nicht infizierten Karpfen (Kontrollen)	48
3.4.1.3 Befunde an Karpfen unter KHV-Infektion	51
3.4.2 Claudin-2	57
3.4.2.1 Bindung des für humanes Claudin-2 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm	57
3.4.2.2 Befunde an nicht infizierten Karpfen (Kontrollen)	57
3.4.2.3 Befunde an Karpfen unter KHV-Infektion	60
3.4.3 Beta-Defensin-2	66
3.4.3.1 Bindung des für humanes Beta-Defensin-2 (hBD-2) spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm	66
3.4.4 Beta-Defensin-3	70
3.4.4.1 Bindung des für humanes Beta-Defensin-3 (hBD-3) spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm	70
3.4.5 Lysozym	74
3.4.5.1 Bindung des Antikörpers spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm	74
4 DISKUSSION	78
LITERATURVERZEICHNIS	96
CURRICULUM VITAE	110
DANKSAGUNG	113

LISTE DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
bp	base pairs/Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CCB	Common Carp Brain Zelllinie
cm	Zentimeter
CPE	cytopathologischer Effekt
CyHV-3	Cyprinides Herpesvirus 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	double distilled water/Aqua bidestillata
DNA	Desoxyribonucleic-acid
dNTP	Dinukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	lat. <i>et alii</i> (m), <i>et aliae</i> (f), <i>et alia</i> (n), und andere
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
hBD	humanes Beta-Defensin
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunglobulin G (Gammaglobulin)
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
KHV	Koi-Herpesvirus
KID	Zellkulturinfektiöse Dosis
l	Liter
M	Molar
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mMol	Millimol
MS 222	Metaaminobenzoessäureethylester
NGS	Normal goat serum

o.a.	obenstehend angegeben
PBS	Phosphate Buffered Saline (gepufferte Phosphatlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction
p.I.	post infection/ <i>post infectionem</i> (nach erfolgter Infektion)
s.	siehe
sec.	Sekunde(n)
SPF	spezifisch pathogenfrei
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TKf	Thymidinkinaseprimer forward
TKr	Thymidinkinaseprimer reverse
Tris	Trishydroxymethylaminomethanpuffer
U	international Units
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol

TABELLENVERZEICHNIS

Titel	Seite
<i>Tabelle 1: Übersicht über den in der vorliegenden Studie verwendeten Pipettieransatz, die verwendeten Primer und das PCR-Programm</i>	28
<i>Tabelle 2: Alter und Gewicht der in den Versuchen verwendeten SPF-Karpfen</i>	30
<i>Tabelle 3: Eigenschaften und eingesetzte Konzentrationen der in der Studie verwendeten primären Antikörper)</i>	34
<i>Tabelle 4: Protokoll einer immunhistochemischen Färbung</i>	37
<i>Tabelle 5: Vermehrungskinetik des Koi-Herpesvirus in Zellrasen von Karpfenhirnzellen, Ansatz 1</i>	42
<i>Tabelle 6: Vermehrungskinetik des Koi-Herpesvirus in Zellrasen von Karpfenhirnzellen, Ansatz 2</i>	43
<i>Tabelle 7: Histopathologische Veränderungen im Darm von 3 Monate alten Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus</i>	45
<i>Tabelle 8: Histopathologische Veränderungen im Darm von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus</i>	45
<i>Tabelle 9: Histopathologische Veränderungen im Darm von 15 Monate alten Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus</i>	46
<i>Tabelle 10: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische</i>	50
<i>Tabelle 11: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1</i>	53
<i>Tabelle 12: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2</i>	53
<i>Tabelle 13: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3</i>	54
<i>Tabelle 14: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische</i>	59
<i>Tabelle 15: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1</i>	62
<i>Tabelle 16: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2</i>	62

Titel	Seite
<i>Tabelle 17: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3</i>	63
<i>Tabelle 18: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische</i>	68
<i>Tabelle 19: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1</i>	68
<i>Tabelle 20: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2</i>	69
<i>Tabelle 21: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3</i>	69
<i>Tabelle 22: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische</i>	72
<i>Tabelle 23: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1</i>	72
<i>Tabelle 24: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2</i>	73
<i>Tabelle 25: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3</i>	73
<i>Tabelle 26: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische</i>	75
<i>Tabelle 27: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym3 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1</i>	75
<i>Tabelle 28: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2</i>	76
<i>Tabelle 29: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3</i>	76

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Titel	Seite
Abbildung 1-4: Darstellung der histopathologischen Veränderungen im Darm von 10 Monate alten <i>Cyprinus carpio</i> unter dem Einfluß einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus: Verkürzung der Falten, Proliferation von Lamina propria und Lamina submucosa, Verringerung der Schleimzellanzahl	47
Abbildung 5-8: Bindungen des für humanes Claudin-1 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Mitteldarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV	55
Abbildung 9-12: Bindungen des für humanes Claudin-1 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Enddarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV	56
Abbildung 13-15: Darstellung der altersabhängigen Abnahme der Bindungsintensitäten des Antikörpers gegen humanes Claudin-2 an Strukturen im Enddarmgewebe von <i>Cyprinus carpio</i> bei nicht infizierten Individuen.	59
Abbildung 16-19: Bindungen des für humanes Claudin-2 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Mitteldarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV	64
Abbildung 20-23: Bindungen des für humanes Claudin-2 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Enddarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV	65
Abbildung 24-29: Bindungen der für humanes hBD-2, hBD-3 und Lysozym spezifischen Antikörper an Strukturen im Mitteldarmsegment von 10 Monate alten Karpfen	77

1. EINLEITUNG

Fische leben in einer aquatischen Umwelt, die wesentlich reicher an potentiellen Pathogenen ist als die Luftumgebung terrestrischer Tiere (PASTORET et al., 1998; RAKERS et al., 2010). Das aquatische Medium erhält solche Pathogene auch unabhängig von ihren Wirtstieren zumindest für gewisse Zeiträume am Leben. Somit können diese hohe Dichten um das Tier herum erreichen (ELLIS, 2001) und werden über Atemwasser und Nahrung auch permanent mit aufgenommen (VERSCHUERE et al., 2000). Unter normalen Bedingungen hält der Fisch jedoch seinen Gesundheitszustand aufrecht, indem er sich mit einem komplexen System von Abwehrmechanismen gegen diese potentiellen Invasoren verteidigt.

Das Immunsystem der Vertebraten besteht aus zwei großem Untereinheiten, der unspezifischen und der spezifischen Immunabwehr. Die unspezifische Immunabwehr stellt die erste Abwehrreihe gegen externe Pathogene, die spezifische Immunabwehr fungiert als eine zweite Verteidigung und liefert darüber hinaus Schutz für den Fall eines erneuten Aufeinandertreffens mit demselben Erreger (NAM et al., 2010). Die spezifische Komponente ist jedoch stark temperaturabhängig und benötigt eine erhebliche Zeit für ihre Antwort, weshalb der unspezifischen Immunabwehr gerade bei wechselwarmen Vertebraten wie den Fischen eine im Verhältnis größere Bedeutung zukommt als bei endothermen wie Säugern oder Vögeln. Ihre Funktionsmechanismen arbeiten schnell und effektiv, denn sie bedürfen keiner Erkennung einer charakteristischen molekularen Struktur auf der Oberfläche des invasiven Erregers, sie kann ohne wesentliche zeitliche Verzögerung reagieren und gibt den Pathogenen damit kaum Zeit, sich zu etablieren. Darüber hinaus ist die unspezifische Immunantwort relativ temperaturunabhängig (ELLIS, 2001).

Die erste Interaktion zwischen eindringenden Keimen und ihrem angehenden Wirt findet auf der Hautoberfläche (SHEPARD, 1994) oder den Epithelien des gastrointestinalen Trakts, der Luftwege, der Geschlechtsgänge oder der Harnwege statt (PRESS & EVENSEN, 1998; LINDE et al., 2008). Aus diesem Grund ist die epitheliale Integrität lebensnotwendig für die Abwehr, da ubiquitäre Pathogene offene Wunden schnell besiedeln können (RAKERS et al., 2010). Bei Fischen ist die Schleimaufgabe von Haut, Kiemen und Darmtrakt die primäre Schaltstelle zwischen dem Individuum und seiner Umgebung. Um eindringen zu können, müssen die Keime an die Schleimaufgabe binden und diese durchdringen können (VAN DER MAREL et al., 2010). Dabei ist insbesondere die intestinale Tunica mucosa mit all ihren Anteilen

der dauerhaften, nicht unerheblichen Herausforderung ausgesetzt, den Austausch von Nährstoffen, Ionen und Flüssigkeiten über das intestinale Epithel hinweg in ständiger Gegenwart einer enormen Dichte an potentiell schädlichen luminalen Antigenen und Mikroorganismen zu bewerkstelligen. Um das Funktionieren eines solch hoch organisierten und störungsempfindlichen Systems zu gewährleisten, bedient sich das intestinale Epithel mehrerer Strategien gleichzeitig. Zum einen ist die Aufrechterhaltung der Integrität und gleichzeitige Regulierung der Permeabilität eine essentielle Funktion des Epithels, was auf der koordinierten Expression und Interaktion von Proteinen der Zell-Zell-Verbindungen, einschließlich der Tight junctions, Zonulae adherentes und Desmosomen beruht (PRASAD et al., 2005). Diese verschließen die interzellulären Zwischenräume und sind zur selektiven Regulierung des Durchtrittes von Substanzen befähigt. Hier spielen die Claudine, transmembranäre Proteine, die an Aufbau und Funktion der Tight junctions maßgeblich beteiligt sind, eine ausschlaggebende Rolle. Zum anderen verhindert ein komplexes Zusammenspiel zwischen hoch-adaptierten Effektorzellen sowie Mechanismen der unspezifischen und spezifischen Immunabwehr beim gesunden Fisch ein Eindringen der luminalen Mikroflora in die intestinale Lamina mucosa und deren systemische Ausbreitung (GÓMEZ & BALCÁZAR, 2008; VAN DER MAREL et al., 2010). An vorderster Front der unspezifischen Abwehrmechanismen steht die Sezernierung antimikrobieller Peptide durch spezialisierte Epithelzellen in die Schleimauflage. Die Liste natürlicher Verbindungen mit antimikrobieller Aktivität ist groß, enthält jedoch im Wesentlichen 3 Gruppen: 1. Verdauungsenzyme, welche mikrobielle Strukturen ansteuern (z.B. Lysozym), 2. Peptide, die an essentielle Elemente wie Zink oder Eisen binden (wie Calprotectin und Lactoferrin) und 3. Peptide, die mikrobielle Zellmembranen angreifen und zerstören (z.B. Defensine, Lysozym und Cathelicidin) (LINDE et al., 2008).

Antimikrobielle Peptide im Allgemeinen sind eine wesentliche Komponente der unspezifischen Abwehr und wurden aus Organismengruppen des gesamten phylogenetischen Spektrums isoliert (FALCO et al., 2008). Generell weisen diese Moleküle einige Gemeinsamkeiten auf, darunter eine geringe Molekülgröße, positive Ladung und eine umfassende Spezifität gegen Pathogene in Form von Aktivitäten gegen Bakterien, Pilze, behüllte Viren und sogar einige Parasiten (CASADEI et al., 2009). Klassische Defensinmoleküle im Speziellen umfassen eine Gruppe von kleinen amphipatischen, unterschiedlich argininhaltigen kationischen Peptiden (mit einer Länge von typischerweise 30-40 Aminosäureeinheiten), die durch sechs über

Disulfidbrücken miteinander verbundene Cysteine charakterisiert werden, welche hoch konserviert und für Wirbeltiere kennzeichnend sind (ZHAO et al., 2009). Aufgrund von Unterschieden in der Verteilung dieser Disulfidbrücken zwischen den sechs Cysteinmolekülen werden Defensine in drei Unterfamilien klassifiziert: α -Defensine, β -Defensine und θ -Defensine. β -Defensine, welche die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 1+5, 2+4 und 3+6 aufweisen (LINDE et al., 2008), neigen zu breiten Expressionsmustern. Sie werden in diversen Zelltypen wie Lymphocyten, Monocyten, Macrophagen, Neutrophilen, Epithelzellen, Keratinocyten etc. als Präpropeptide synthetisiert und in Granula im Zytoplasma gespeichert, was bei mikrobieller Infektion eine rasche Ausschüttung aktiver Peptide in Phagosomen oder ins extrazelluläre Milieu erlaubt. Beträchtliche Quellen für Defensine stellen dabei die Schleimhäute dar (ZOU et al., 2007; CASADEI et al., 2009).

β -Defensine sind kationische Enzyme mit einem Molekulargewicht von 2 – 6 kDa und werden entweder konstitutiv exprimiert oder als Reaktion auf bestimmte Stressoren wie Infektionen oder Entzündungen induziert. Ihr funktionelles Potential umfasst dabei ein breites Spektrum antimikrobieller Aktivitäten gegen gram-positive und gram-negative Bakterien, Mycobakterien, Pilze, intrazelluläre Parasiten und bestimmte Viren (QUINONES-MATEU et al., 2003; LINDE et al., 2008). In ihrer Wirkungsweise zielen sie auf die Achillesferse der mikrobiellen Membran ab, nämlich das Fehlen von Cholesterol und negativ geladene Phospholipide auf der Außenseite der zytoplasmatischen Membran. Die positive Nettoladung ermöglicht die Bindung einer stetig steigenden Anzahl (1-10 Milliarden Moleküle) von Defensinen an die Phospholipide auf der Bakterienoberfläche bis zu deren vollkommenem Zusammenbruch. Für Säugerdefensine wurde darüber hinaus eine Beteiligung bei der Initialisierung von spezifischen Immunantworten beobachtet, da diese als direkte Chemoattraktoren für noch unausgereifte dendritische Zellen agieren (LINDE et al., 2008. GUANI-GUERRA et al., 2009). Es wird angenommen, dass Defensine einen frühen evolutiven Ursprung haben, mit einer weiten Verbreitung innerhalb der Pflanzen, Tiere und Pilze. Neuere Studien lassen das Vorkommen Defensin-ähnlicher Peptide auch in Myxobakterien vermuten (CASADEI et al, 2009). Verglichen mit den Verhältnissen bei Säugetieren befindet sich die Erforschung von Fisch-Defensinen allerdings erst an ihrem Anfang. Verschiedene β -Defensin-homologe Sequenzen wurden erst in jüngerer Vergangenheit bei Zebraabärbling, Fugu, Forelle und Zackenbarsch detektiert (ZOU et al, 2007), doch nur bei einem β -Defensin-ähnlichen

Peptid der Regenbogenforelle wurde bisher auch antivirale Aktivität nachgewiesen. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die antimikrobiellen Aktivitäten, Transkriptionsregulation und Immunmodulation von Fisch- β -Defensinen noch weitgehend unbekannt (ZHAO et al., 2009).

Im Gegensatz dazu ist **Lysozym** (Muramidase), eines der am besten untersuchten Enzyme überhaupt, auch im Fischgewebe bereits seit geraumer Zeit nachgewiesen (FLETCHER & GRANT, 1968; VLADIMIROV, 1968). Sein Molekulargewicht, seine Aminosäuresequenz, Konformation, Nucleotidsequenz und seine Funktionen sind überaus gut erforscht und es wurde in Pflanzen, Bakterien, Insekten und allen Wirbeltieren gefunden (JOLLES & JOLLES, 1984; ALEXANDER & INGRAM, 1992 SAURABH & SAHOO, 2008). Bei diesem Peptid handelt es sich um ein kationisches Enzym, welches bei den meisten daraufhin untersuchten Organismen an der Abwehr von Viren, Bakterien, Neoplasmen und mitunter Pilzen beteiligt ist. Seine Wirkungsweise basiert darauf, dass es die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetyl-D-Muraminsäure und 2-Acetylamino-2-Desoxy-D-Glucose (= N-Acetyl-D-Glucosamin) in den Zuckerketten des Peptidoglycangerüsts, welches Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien ist, spaltet und dadurch die Zellwände auflöst (PAULSEN et al., 2001; ELLIS, 1999 & 2001). In begrenztem Umfang ist auch ein Effekt auf Chitin nachgewiesen worden, worauf mit großer Wahrscheinlichkeit seine partiell fungizide Wirkung zurückzuführen ist (ALEXANDER & INGRAM, 1992). Das Enzym selbst besteht aus einer einfachen Polypeptidkette von etwa 120 Aminosäuren, dessen isoelektrischer Punkt zwischen pH 9 und 11 und dessen Aktivitätsoptimum zwischen pH 5 und 7 liegt. Das Molekulargewicht beträgt durchschnittlich 14,4 kDa (GRINDE et al., 1988) und bewegt sich bei Fischen in einem Bereich von 12.5 bis 15 kDa (ALEXANDER & INGRAM, 1992). Wie bei Säugetieren, so kommt Lysozym auch bei Fischen hauptsächlich in Neutrophilen, Monocyten und in kleinen Mengen in Makrophagen vor allem an solchen Stellen vor, an denen das Risiko mikrobieller Invasion groß ist, wie auf den Kiemen, der Haut (OURTH, 1980) oder im Gastrointestinaltrakt, was seine Rolle in der Immunbarriere hervorhebt. Ferner tritt es in hoher Konzentration in den Kopfnieren und Nieren, daneben im Hautschleim, in Leber, Milz und Muskulatur sowie in den Eiern auf (LIE et al., 1989; ALEXANDER & INGRAM, 1992; SVEINBJORNSSON et al., 1996; ELLIS, 2001; SAURABH & SAHOO, 2008; WANG & ZHANG, 2010). Ebenso wie die zuvor beschriebenen β -Defensine, kann auch Lysozym sowohl konstitutiv exprimiert sein als auch durch Pathogenkontakt

induziert werden, wobei es bei Fischen offenbar in zwei verschiedenen Formen auftritt, von denen eine wesentlich bakterizider zu sein scheint als das Lysozym der höheren Vertebraten (ELLIS, 2001).

Wie obenstehend bereits angedeutet, kommt den **Claudinen** eine bedeutende Aufgabe bei der Herstellung und Aufrechterhaltung des epithelialen Zellverbandes und seiner Funktionen zu. Einfache epitheliale und endotheliale Zellschichten (Monolayer) kleiden die Körperhöhlen aller Metazoen aus (KOLLMAR et al., 2001) und formen Barrieren, um Organe in funktionelle Subkompartimente zu separieren und ein Eindringen von potentiellen Pathogenen zu unterbinden. Diese distinkte Kompartimentierung und Isolation von der äußeren Umgebung ist ausschlaggebend für das Funktionieren von Organsystemen in vielzelligen Organismen. Die Zellen kontrollieren diese Barrieren selektiv, indem sie den Austausch von Wasser, Ionen und Proteinen über das Monolayer-System hinweg regulieren, wobei sie eine strukturelle und physiologische Polarität erzeugen (SCHNEEBERGER & LYNCH, 2004; FINDLEY & KOVAL, 2009). Zwei Möglichkeiten des Stofftransportes sind hierbei gegeben und werden auch umgesetzt. Zum einen der Weg direkt durch die Zellen hindurch, der transzelluläre Transport. Zum anderen die Bewegung von Ionen und Molekülen durch Zellzwischenräume hindurch, welche als parazelluläre Permeabilität bezeichnet und an speziellen, als Tight junctions bezeichneten Kontaktstellen zwischen den Zellen reguliert wird. Hierbei handelt es sich um Komplexe aus transmembranären und peripheren Proteinen, welche ihrerseits Verbindung zum Zytoskelett haben. Die koordinierte Regulierung der Permeabilitätseigenschaften geht dabei auf jene als Claudine bezeichneten Transmembranproteine zurück, deren Name sich vom lateinischen ‚*claudere*‘ (= schließen) ableitet. Ihre übergeordneten Aufgaben bestehen im Aufbau der Zell-Zell-Kontakte und in der selektiven Regulierung des parazellulären Transportes. Claudine wurden 1998 von FURUSE et al. zum ersten Mal als die wesentlichen, am Aufbau von Tight junctions strukturell und funktionell beteiligten Proteine identifiziert. Sie können den interzellulären Spalt fast vollständig verschließen oder parazelluläre Poren formen (KRAUSE et al., 2008; TIPSMARCK et al., 2008b). Mit einem Molekulargewicht von 22 bis 27 kDa (VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006; CLELLAND et al., 2010) sind sie verhältnismäßig klein und ihr charakteristischer Aufbau ist dadurch gekennzeichnet, dass ihre Polypeptidkette vier Mal die Zellmembran durchspannt („tetraspan protein“) und dabei zwei extrazelluläre, aufgrund ihrer räumlichen Struktur als Schleifen bezeichnete Domänen ausbildet (COLEGIO et

al., 2002 LAL-NAG & MORIN, 2009). Die erste Schleife stellt dabei nach derzeitigem Kenntnisstand die Ladungsselektivität bei der Regulierung des parazellulären Transportes her, während die zweite Schleife für die Herstellung der Zell-Zell-Verbindungen über Kontaktaufnahme mit Claudinen gegenüberliegender Zellmembranen einerseits und Verbindung mit zytoplasmatischen Strukturproteinen andererseits zuständig ist (VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006; KRAUSE et al., 2008; ANGELOW et al., 2008). Die Expression der Claudine in den verschiedenen Zell- und Gewebetypen ist variabel. So sind einige ubiquitär exprimiert, während andere nur in bestimmten Zelltypen oder nur zu bestimmten Zeitpunkten exprimiert werden (NUSRAT et al., 2000; TURKSEN & TROY, 2001; VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006; TIPSMARK et al., 2009). Zum ubiquitären Typ zählt Claudin-1, welches eine wichtige Rolle für den Zusammenhalt von Epithelien spielt (FURUSE et al., 2002; VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006), während das andere in der vorliegenden Arbeit untersuchte Claudin, Claudin-2, parazelluläre Poren für monovalente Kationen formt und nur zeitweise und in wenigen Geweben exprimiert wird (ESCAFFIT et al., 2005; KRAUSE et al., 2008). Die verschiedenen Epithelien weisen jedoch stets spezifische Claudinkombinationen auf (COLEGIO et al., 2002), deren Expressionsmuster in ihrer Gesamtheit die Polaritäts- und Transporteigenschaften der jeweiligen Gewebe entscheidend charakterisieren (COLEGIO et al., 2003; GONZALEZ-MARSICAL et al., 2003; ESCAFFIT et al., 2005). Claudine wurden bisher vor allem bei Säugetieren untersucht, von denen zurzeit 24 verschiedene Formen bekannt sind (TSUKITA & FURUSE, 2000; COLEGIO et al., 2002; ESCAFFIT et al., 2005). Auch bei Fischen wurden Claudine nachgewiesen, deren Anzahl sich durch extensive Genexpansion auf 56 beim Kugelfisch (*Fugu rubripes*) beläuft (LOH et al., 2004).

Das Zusammenwirken von Eigenschaften des Gewebeverbandes in Form von Zell-Zell-Verbindungen auf der einen und von Abwehrmechanismen des Immunsystems auf der anderen Seite führt so zu der Ausbildung einer Frontlinie zur Verteidigung gegen Pathogene an den Oberflächen der Epithelien, der epithelialen Immunbarriere. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Immunbarriere des Mittel- und Enddarmepithels von Karpfen, deren Reaktionen im Hinblick auf mögliche Veränderungen von Funktionalität und Integrität unter dem Einfluß einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus (KHV) untersucht werden sollen. Hierfür wurde ein Infektionsmodell auf zellkulturbasiertem Virus gewählt.

Beim **Koi-Herpesvirus**, das 1998 in Israel zum ersten Mal diagnostiziert und in den USA im selben Jahr isoliert wurde (HEDRICK et al., 2000), handelt es sich um ein behülltes DNA-Virus, dessen Erbsubstanz von einem ikosaedrischen Nukleokapsid umschlossen wird. Ein proteinreiches Tegument umgibt das Viruscore, welches insgesamt von einer Lipiddoppelmembran umschlossen wird (MINSON et al. 2000). Seine systematische Bezeichnung lautet Cyprinides Herpesvirus 3 (CyHV-3), in Anlehnung an die von ihm hervorgerufenen Krankheitserscheinungen auch als „carp nephritis and gill necrosis virus“ bezeichnet. Das 277 bp doppelsträngiger DNA umfassende Virion wird der Familie Herpesviridae zugerechnet (WALTZEK et al., 2005). Als DNA-Virus erfolgt die Vermehrung im Zellkern der Zielzelle. Nachdem zunächst vor allem Kiemen und Darm als mögliche Eintrittsgewebe des Virus in den Fischkörper diskutiert wurden, wird heute die Haut als das wahrscheinlichste Eintrittsorgan betrachtet (COSTES et al., 2009). Das Virus ist bereits nach wenigen Stunden in allen Organen des betroffenen Tieres nachweisbar (GILAD et al., 2004). Erkrankte Tiere werden häufig apathisch, sondern sich ab oder halten sich regungslos in Bodennähe auf. Flossenklemmen und verminderte Reaktionsfähigkeit, im fortgeschrittenen Stadium auch umfangreiche Koordinationsverluste, stellen weitere symptomatische Verhaltensänderungen dar. Im akuten Krankheitsverlauf kommt es zu massiven Hautveränderungen und Schädigungen der Kiemenepithelien bis hin zu Nekrosen. Die Schleimproduktion der Haut nimmt im Krankheitsverlauf ab (was zum so genannten „Sandpapiereffekt“ führt), während die Kiemennekrosen häufig von verstärkten Schleimabsonderungen begleitet werden. Obwohl die inneren Organe makroskopisch zumeist ohne Befund sind, offenbaren histopathologische Untersuchungen in der Regel umfangreiche Degenerationen von Zellverbänden, Nekrosen und unspezifische Entzündungsreaktionen (PIKARSKY et al., 2004). Im Intestinum wurden nekrotische Herde sowie submuköse Infiltrate festgestellt (HOFFMANN et al., 2000). Darüber hinaus führt die Erkrankung zu einer Immunsuppression mit erhöhter Empfänglichkeit für Sekundärinfektionen (BLOOM, 1998; MEYER, 2007; NEGENBORN, 2009). Damit ist die Möglichkeit des Eindringens von weiteren Pathogenen über die vorgeschädigten Epithelien in besonderem Maße gegeben. Der Ausbruch der Krankheit hängt wesentlich von der Wassertemperatur ab (GILAD et al., 2003), wobei der empfängliche Temperaturbereich zwischen 15 und 28°C liegt (WALSTER 1999). Sowohl bei tieferen als auch bei höheren Temperaturen kommt es trotz bestehender Infektion nicht zum Ausbruch der Erkrankung, was

vermutlich auf eine unterdrückte Virusreplikation zurückzuführen ist. Dennoch bleiben solche Fische Träger des Virus, welches über große Zeiträume vermehrungsfähig bleibt und von seinen Wirten nach Eintritt günstiger Temperaturverhältnisse wieder ausgeschieden werden und weitere Individuen infizieren kann (MEYER, 2007). Typisch für viele Herpesviren ist das eng begrenzte Wirtsspektrum. Dies trifft auch für das Koi-Herpesvirus zu, welches nur beim Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) zur Ausbildung von Morbiditäten und Mortalitäten führt (ARIAV et al., 1999), wobei Individuen jeder Altersstufe erkranken können. In betroffenen Beständen sind die Ansteckungsgefahr und die Verluste in der Regel sehr hoch, es erkranken durchschnittlich 80-100% der Individuen, die Sterblichkeitsrate liegt bei 70-80% (BRETZINGER et al., 1999; WALSTER, 1999). Andere Fischarten können zwar als Träger und Überträger des Virus fungieren, erkranken jedoch nicht (BRETZINGER et al., 1999; HOFFMANN et al., 2000; MEYER, 2007). Wie andere Herpesviren besitzt auch das Koi-Herpesvirus die Fähigkeit, seine Genexpression herunter zu regeln und ein Latenzstadium im infizierten Fisch zu etablieren. Solche Karpfen tragen das Virus in sich, ohne zu erkranken. Bei diesen als „Carrier“ bezeichneten Individuen können Stresssituationen allerdings eine erneute Aktivierung und Ausschüttung des Virus auslösen (NEUKIRCH, 2003; MEYER, 2007). Insbesondere solche Carrierfische haben in Verbindung mit einem intensiven und unkontrollierten Handel zur rapiden und mittlerweile weltweiten Verbreitung des Koi-Herpesvirus beigetragen. Der Nachweis des Virus in der Labordiagnostik kann entweder indirekt mittels molekularbiologischer Methoden (PCR, ELISA) oder aber direkt anhand von histopathologischen Techniken (z.B. Elektronenmikroskopie, Immunfluoreszenz, Anzucht auf Zellkulturen) erfolgen, wobei erhebliche Unterschiede in Aufwand und Zuverlässigkeit bestehen. In der Routinediagnostik stellt die PCR die derzeit verbreitetste und zuverlässigste Nachweismethode dar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen einer solchen KHV-Infektion auf die epitheliale Immunbarriere im Darm des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.) untersucht und anhand des Verhaltens der antimikrobiellen Peptide β -Defensin-2 und -3 und Lysozym, sowie der Transmembranproteine Claudin-1 und-2 beschrieben werden. Die Befunde werden ferner im Zusammenhang mit potentiellen klinischen Veränderungen des Darmgewebes diskutiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Herkunft der Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden junge Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio* L.) eingesetzt. Diese wurden als befruchtete Eier der Zuchtlinie R8S8 x R3S8 von der Agricultural University Wageningen bezogen und in der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover unter parasiten- und virusfreien Bedingungen (SPF) aufgezogen. Die Erbrütung der Eier geschah bei einer Temperatur von 20 °C in einem 500 Liter fassenden Glasaquarium und mit einer Filterung über ein Lufthebersystem. Im selben Becken erfolgte auch die erste Anfütterung der freischwimmenden, fressfähigen Brut mit frisch geschlüpften Nauplien des Branchiopoden *Artemia salina*. In den folgenden Wochen wurde dann eine schrittweise Umstellung der Karpfenbrut auf handelsübliches Karpfenaufzuchtfutter in Pelletform vorgenommen. Nach Erreichen von etwa 2 cm Körperlänge erfolgte eine Umsiedlung der Jungfische zur weiteren Aufzucht und dauerhaften Hälterung in eine Kreislaufanlage mit vier angeschlossenen Rundbecken und einem Gesamtvolumen von 6000 Litern, welche über ein Mattensystem gefiltert wurden.

2.2. Virus

2.2.1 Herkunft

Um eine KHV-Infektion sowohl in ihrem gesamten pathologischen Verlauf im Allgemeinen als auch die betreffenden Reaktionen der Darmmucosa im Speziellen verfolgen zu können, war eine experimentelle Infektion der Karpfen unter kontrollierten Bedingungen im Labor erforderlich. Das hierfür verwendete Koi-Herpesvirus-Isolat ist das von Hedrick und Mitarbeitern im Jahr 2002 in den USA isolierte KHV-I-Isolat (HEDRICK et. al., 2002), welches vom Friedrich-Löffler-Institut, Bundesinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems, bezogen und unter der Nummer KHV 182 gelistet wurde. Bei dem dort in Zellkultur erhaltenen Virus handelt es sich um den intern bezeichneten Pool GI, bezogen wurde die 6. Passage auf CCB (**Cyprinus Carpio Brain**)-Zellen mit einem Titer von 5000 KID₅₀/ml.

2.2.2 Zellkultur

Für Erhalt und Vermehrung des KH-Virus wurden Zellkulturen der von Neukirch und Mitarbeitern 1999 in der Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der Tierärztlichen Hochschule Hannover etablierten Zelllinie von Karpfenhirnzellen (CCB) verwendet. Die Kultur der CCB-Zellen erfolgte bei einer eingestellten Umgebungstemperatur von 20°C in einer 75 cm² Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) und in einem Kulturmedium auf der Grundlage des „Minimum Essential Mediums“ (MEM) mit „Earl`s“ Salzen, supplementiert mit 2 mMol L-Glutamin (PAA, Pasching), 3,5 g D(+)-Glukose/l (Applichem, Darmstadt), 10% fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) und 79,6 mg/l nichtessentiellen Aminosäuren (PAA, Pasching), 200000 U/l Penicillin und 200 mg/l Streptomycin (PAA, Pasching). Im Abstand von vier bis fünf Tagen wurden die Zellen subkultiviert. Hierfür wurde der Zellrasen vom Flaschenboden nach Entfernen des Kulturmediums mittels einer Überschichtung mit einer Lösung aus „Dulbecco`s“ PBS (PAA, Pasching), 0,05 % Trypsin (PAA, Pasching) und 0,02 % EDTA (PAA, Pasching) gelöst. Die so erhaltene Zellsuspension wurde anschließend mit 5 ml Kulturmedium zur Aufhebung der zellwandschädigenden Wirkung des Trypsins neutralisiert, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und im Verhältnis 1:2 in neue, bereits mit 10 ml Kulturmedium vorbereitete Kulturflaschen überführt.

2.2.3 Virusvermehrung

Zur Vervielfältigung des KH-Virus wurden 5 ml eines virushaltigen Zellkulturmediums auf einem höchstens zwei Tage alten konfluenten Zellrasen in einer 75 cm² Zellkulturflasche gegeben und der Zellrasen gleichmäßig überschichtet. Regelmäßiges leichtes Schwenken während der folgenden 60 Minuten Inkubationszeit bei 25°C sorgte darüber hinaus für eine gleichmäßige Verteilung der Virussuspension. Nach Ablauf einer Stunde wurden 10 ml Kulturmedium zugegeben und die Kultur in der Folgezeit bei weiterhin 25°C inkubiert. Der Zellrasen wurde täglich auf zytopathologische Effekte als Folge einer erfolgreichen Infektion hin überprüft und die Befunde dokumentiert. Eventuell mit Bakterien oder Pilzen kontaminierte Kulturen wurden verworfen. Nach sechs Tagen wurde bei der Mehrzahl der Kulturen der Höhepunkt des Infektionsverlaufes, sichtbar durch Zerstörung des Zellrasens, erreicht und das Virus durch Einfrieren der Kulturflasche bei -80°C aus den Zellen freigesetzt. Anschließend wurde die virushaltige Zellsuspension zu Volumina von je 1 ml in Reaktionsgefäße aliquotiert und ebenfalls

bei -80°C aufbewahrt. Zur weiteren Virusanreicherung, zur Bestimmung der Infektiosität des Virus sowie zur Anwendung in den Infektionsversuchen wurde die zellhaltige Viruslösung bei Raumtemperatur aufgetaut und unmittelbar verwendet.

2.2.4 Virustitration

Zur Bestimmung der Infektiosität des vermehrten Virus wurde eine Titration mit logarithmischer Endpunktverdünnung auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) mit 96 Vertiefungen mit CCB-Zellen aus einer homogenen Zellsuspension beimpft. Nachdem sich nach 24 Stunden ein konfluenter Zellrasen ausgebildet hatte, wurden in die Vertiefungen jeweils 0,2 ml einer zehnfachen Verdünnungsreihe der Viruslösung hinzugegeben. Es wurden jeweils vier Vertiefungen pro Verdünnungsstufe beimpft. Zudem wurde als Kontrollansätze Zellrasen in vier Vertiefungen mit 0,2 ml Zellkulturmedium inokuliert. Anschließend erfolgte die Kultur der Mikrotiterplatte für 14 Tage bei 25°C und in einer Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 2%, wobei der Zellrasen täglich mikroskopisch auf Veränderungen untersucht wurde. Diese schlossen Verfärbungen des Zellkulturüberstandes, abgelöste Zellen, Riesenzellbildung und zytopathologische Effekte ein und wurden protokolliert. Anschließend wurde die Infektiosität anhand der nach BONIN (1973) zitierten, modifizierten Methode nach KÄRBER (1931) kalkuliert.

Für die verwendete Viruslösung ergab dieses Verfahren einen Titer von 1000 KID50 pro 0,2 ml bzw. 5000 KID50 pro Milliliter.

2.2.5 Virusnachweis

2.2.5.1 Immunfluoreszenz

Zur Veranschaulichung der Wachstumskinetik des Virus *in vitro* wurden Zellkulturversuche mit Karpfenhirnzellen durchgeführt. In diesen Versuchsreihen wurde das bereits im Zuge der Virusvermehrung beobachtete Viruswachstum zusätzlich mit Hilfe der Immunfluoreszenz überprüft, welche eine optische Darstellung der Expression von Virusproteinen in Zellen der Zellkultur ermöglichte.

Hierzu wurden zunächst 10 CCB-Zellkulturen in Kulturflaschen, wie bereits im Abschnitt 2.2.3 beschrieben, mit Virussuspension infiziert und anschließend inkubiert. Darauf folgte eine tägliche Überprüfung der Zellrasen in den Flaschen auf Veränderungen oder zytopathogene Effekte, sowie eine Probennahme für die Immunfluoreszenz. Hierfür wurden die Zellrasen nach Verwerfen des Kulturmediums

mit Hilfe von 1 ml Trypsin (PAA, Pasching) von ihrer Unterlage gelöst und zusammen mit 1 ml frischem Kulturmedium in Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten lang bei 680 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in 5 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Von dieser Suspension wurde ein Aliquot von 200 µl für die PCR zurückgestellt. Die verbleibenden 4,8 ml wurden für die sich anschließende Immunfluoreszenz auf Objektträger (Menzel, Braunschweig) aufgetropft. Die Immunfluoreszenz wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Mit Fettstift (DaKo-Pen) auf Objektträger 2 Kreise (jew. etwa 1 cm²) als Umrandung auftragen
- Zellsuspension in Kreise tropfen (ca. 20 µl/Kreis), bei 4°C lufttrocknen
- Fixieren durch Einstellen in Aceton für 10 min. bei Raumtemperatur
- Trocknen bei Raumtemperatur
- Blocken mit bovinem Serumalbumin (BSA) für 30 min. in feuchter Kammer bei Raumtemperatur
(BSA: Albumin Fraktion V (Roth, Karlsruhe), 1g Pulver lösen in 100 ml RPMI (Sigma-Aldrich, München))
- Waschen (3 x 3 min in RPMI)
- Flüssigkeit abschlagen, Trocknen um die Umrandung
- Aufbringen des Primärantikörpers (KHV/10A9, Insel Riems), ca. 50 µl/Kreis, Verdünnung 1:10 in RPMI, Inkubation in feuchter Kammer für 1 Stunde
- Waschen (3 x 3 min. in RPMI)
- Flüssigkeit abschlagen, Trocknen um die Umrandung
- Aufbringen des Sekundärantikörpers: Kaninchen-anti-Maus, FITC-konjugiert, Verdünnung 1:50 in BSA, Inkubation in Feuchtekammer, 60 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß
- Waschen (3 x 3 min. in RPMI)

- Flüssigkeit abschlagen, Trocknen um die Umrandung
- Eindecken mit Dabco-Erhaltungspuffer

Ein Eintrocknen der Proben ist nach dem Arbeitsschritt „Blocken“ unbedingt zu vermeiden!

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) spätestens 24 Stunden nach der Reaktion. Hierbei wurde der Prozentsatz der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen an einhundert fixierten Zellen durch Auszählen bestimmt und protokolliert.

Insgesamt dauerte das Experiment 10 Tage und wurde zweimal durchgeführt.

2.2.5.2 Molekularbiologischer Nachweis einer Infektion von Zellen mit dem Koi-Herpesvirus

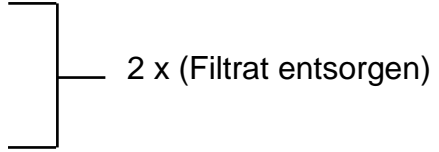
Der Nachweis einer erfolgreichen Infektion sowohl der Zellkulturen als auch der Versuchstiere mit dem Koi-Herpesvirus erfolgte mit molekularbiologischen Methoden, welche auf dem Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruhen. Hierzu war die Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben notwendig, die als Matrize (Template) in einer PCR-Reaktion eingesetzt wurde.

2.2.5.2.1 DNA-Extraktion aus Kulturzellen und Geweben

Als Probenmaterial zur Gewinnung von Koi-Herpesvirus-DNA wurden einerseits Kulturzellen des unter 2.2.5.1 beschriebenen Versuches zur Immunfluoreszenz verwendet, zum anderen gelangten Organpools aus Gewebeproben von Milz, Leber, Niere, Kieme und Gehirn der für die Immunhistochemie (s.u.) beprobten Karpfen zum Einsatz. Für die Isolierung der Virus-DNA aus allen verwendeten Geweben diente ein kommerzielles Isolationskit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Firma Roche, Mannheim) und wurde den Herstellerangaben zur Durchführung Folge geleistet.

Das Extraktions-Protokoll enthielt folgende Schritte:

- 25 mg Ausgangsmaterial, mechanisch homogenisiert
- Zugabe von 200 µl Tissue Lysis Buffer
- Zugabe von 40 µl Proteinase K

- Mischen (20 sec.)
 - Inkubation (1 Stunde, 55°C)
 - Spin down
 - Zugabe von 200 µl Bindung Buffer
 - Mischen (20 sec.)
 - Inkubation (10 min, 70°C)
 - Spin down
 - Zugabe von 100 µl Isopropanol
 - Mischen (20 sec.)
 - Überführen der Probe auf eine Säule in einem Sammelgefäß
 - Zentrifugieren (1 min., 6500 x g)
 - Überführen der Säule in neues Sammelgefäß
 - Zugabe von 500 ml Wash Buffer
 - Zentrifugieren (1 min., 6500 x g)
 - Zentrifugieren (10 sec., 19800 x g)
 - Überführen der Säule in neues Sammelgefäß
 - Zugabe von 200 µl vorgewärmtem (70 °C) Elusion Buffer
 - Zentrifugieren (1 min, 6500 x g)
 - Säule verwerfen, DNA im Sammelgefäß
- 
- 2 x (Filtrat entsorgen)

Die erhaltene DNA wird bis zu ihrer Verwendung als Template in der PCR bei -20°C im Elusionspuffer gelagert.

2.2.5.2.2 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur in vitro-Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes unter Zuhilfenahme von Enzymen sowie von Oligonukleotiden, welche den zu replizierenden DNA-Abschnitt auf den komplementären Strängen eingrenzen (Primer). Bei diesem Vorgang werden die Arbeitsschritte der Auftrennung des DNA-Doppelstranges (Denaturierung), der Anlagerung der Primer (Annealing) sowie das anschließende komplementäre Auffüllen der zwischen den Primern gelegenen fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden durch eine Polymerase (Polymerisation) zyklisch wiederholt. Der letzte Schritt liefert schließlich das PCR-Produkt, welches jeweils wieder Ausgangsstoff für einen darauffolgenden Zyklus ist, wodurch es theoretisch zu dessen exponentieller

Vermehrung kommt. Am Ende steht eine abhängig von der Ausgangskonzentration und der Zyklenzahl erhaltene, höhere Kopienzahl des gewünschten Erbgutes, welches dann für weitere Verfahren, z.B. optische Nachweismethoden, in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Die Aufstellung in Tabelle 1 gibt eine Übersicht über den in der vorliegenden Studie verwendeten Pipettieransatz, die verwendeten Primer und das PCR-Programm.

Tabelle 1: Übersicht über den in der vorliegenden Studie verwendeten Pipettieransatz, die verwendeten Primer und das PCR-Programm

Pipettieransatz für den Mastermix				
Volumen	Reagenz			
6,5 µl	ddH ₂ O			
1,5 µl	KHV-TKf (0,03 µmol)			
1,5 µl	KHV-TKr (0,03 µmol)			
0,9 µl	MgCl ₂ (2 mmol) (Invitrogen, Karlsruhe)			
2,5 µl	Amplification Buffer (10 x konzentriert für Polymerase)			
2 µl	dNTP-Mix (400 µmol, Nukleotide, Roth, Karlsruhe)			
0,1 µl	DNA-Polymerase (<i>Platinum Taq</i> – 1 U/µl)			
10 µl	Template-DNA			
Gesamtvolumen für 1 Probe: 25 µl				
Verwendete Primer (Startsequenzen)				
Bezeichnung	Sequenz	Amplifikatgröße in bp	Annealingtemperatur	Referenz
KHV-TKf	5'-GGGTTACCTGTACGAG-3'	409	51,7 °C	Bercovier et. al. (2005)
KHV-TKr	5'-CACCCAGTAGATTATGC-3'	409	50,4 °C	Bercovier et. al. (2005)
Ablauf der PCR				
Denaturierung, 5 min., 95°C				
Denaturierung, 1 min., 94°C	Zyklus, 39 Wiederholungen			
Annealing, 1 min. 52°C				
Polymerisation, 30 sec., 72°C				
Finale Polymerisation, 7 min., 72°C				
Aufbewahrung der PCR-Produkte bei 4°C bis zur Gelelektrophorese				

Zusätzlich wurden bei jedem PCR-Durchlauf eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um die DNA aus einer KHV-

infizierten CCB-Zellkultur, für die Negativkontrolle wurde anstelle des Genmaterials ddH₂O verwendet. Bei dem zur Amplifikation verwendeten Thermocycler handelte es sich um das Modell Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf, Hamburg.

2.2.5.2.3 Gelelektrophorese

Die Sichtbarmachung der hergestellten Amplifikate erfolgte mit der Methode der Gelelektrophorese, bei welcher die mit einem Farbstoff (Ethidiumbromid) gekoppelten DNA-Fragmente mit Hilfe eines elektrischen Feldes beim Durchwandern eines Agarosegels nach Größe aufgetrennt werden. Der Farbstoff interkaliert mit doppelsträngiger DNA und tritt unter der Einwirkung von UV-Licht optisch in Erscheinung, wodurch eine visuelle Auswertung möglich wird. Folgender Aufbau kam in der vorliegenden Arbeit für die Gelelektrophorese zur Verwendung:

Reagenzien:

- Agarosegel, 1% (Invitrogen, Karlsruhe)
- TBE-Puffer (Lauf- und Gelpuffer):
 - 5,4 g Tris (Roth, Karlsruhe)
 - 2,75 g Borsäure (Roth, Karlsruhe)
 - 2 ml 0,5 M EDTA (Applichem, Darmstadt)
 - Auffüllen auf 1000 ml mit Aqua dest.
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Ladepuffer (Roth, Karlsruhe)
- DNA-Leiter (100 bp, Roth, Karlsruhe)

Geräte:

- Mini-Elektrophoresekammer (Modell SubSystem 70, Axon, Kaiserslautern)
- Stromquelle: „Power Supply EV243“ (Roth, Karlsruhe)
- UV-Transluminator (Modell: Biometra, TI 1, Göttingen)

Für das Gel wurden 0,5 g Agarose mit 45 ml TBE-Puffer und 10 µl Ethidiumbromid versetzt und in die Elektrophoresekammer überführt. In die Taschen des Agarosegels wurde ein Gemisch aus 6 µl des PCR-Produkts und 2 µl Ladepuffer pipettiert. Zusätzlich wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle aufgetragen. Die

Laufzeit wurde für 30 Minuten bei einer Stromspannung von 90 Volt angesetzt. Anschließend erfolgte die Auswertung unter UV-Licht.

2.3 Infektionsversuche mit Karpfen

Die im Folgenden beschriebene Versuchsdurchführung wurde insgesamt dreimal, jeweils im Abstand von einigen Monaten, wiederholt.

2.3.1 Versuchstiere und Hälterung

Für jeden Versuchsdurchgang gelangten 24 SPF-Karpfen der unter 2.1 beschriebenen Herkunft zur Verwendung. Daraus folgt, dass die Karpfen für jeden der drei Ansätze in einem anderen Alter und mit einem anderen Durchschnittsgewicht in den Versuch eintraten. Das jeweilige Alter und Gewicht der verwendeten Karpfen während der einzelnen Versuchsdurchgänge verhalten sich wie in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Alter und Gewicht der in den Versuchen verwendeten SPF-Karpfen

Versuchsdurchgang	Alter	Gewicht
Versuch 1	3 Monate	38 g (25 – 53)
Versuch 2	10 Monate	54 g (43 – 63)
Versuch 3	15 Monate	64 g (41 – 101)

Angegeben sind Durchschnittsgewichte sowie Minimal- und Maximalwerte.

Die Hälterung der Versuchstiere erfolgte ab einem Zeitraum von 10 Tagen vor der Versuchsdurchführung in 400 Liter fassenden Kunststoffbecken. Diese waren zuvor mit 80°C heißem Wasser und 0,5 M Natronlauge desinfiziert worden und wurden nach Befüllung mit Leitungswasser über einen EHEIM-Außenfilter, Modell 2217, mit den handelsüblichen Filtermedien gefiltert. Die Temperatur wurde über einen Zeitraum von einer Woche mittels Reglerheizern (Firma TETRA) langsam auf 25°C eingestellt, um den Karpfen eine Adaption zu ermöglichen. Mit der Überführung in die Versuchsbecken endete die Fütterung der Karpfen.

Von den 24 Versuchskarpfen wurden für jeden Versuch 16 Karpfen infiziert, 8 Karpfen blieben als Kontrollfische ohne Infektion. Wegen der hohen Ansteckungsgefahr wurden diese zwar unter denselben Bedingungen, jedoch räumlich streng getrennt von den infizierten Karpfen gehältert.

2.3.2 Infektion

Als Eintrittspforte für das Koi-Herpesvirus in den Wirt werden vor allem Darm- und Kiemenepithelien diskutiert (HEDRICK 1999, MEYER 2007). Zur Sicherstellung eines direkten Kontaktes des Wirtsgewebes mit Viruspartikeln wurde den Karpfen deshalb die Virussuspension mittels einer Knopfkanüle *per os* direkt in den Mitteldarm verabreicht. Das zugeführte Volumen pro Karpfen betrug 0,5 ml Suspension mit einer Konzentration von 5000 KID₅₀/ml, was einer individuellen infektiösen Dosis von 2500 KID₅₀ entspricht.

Den Karpfen der Kontrollgruppe wurde statt der Virussuspension dasselbe Volumen (0,5 ml) einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS, Firma PAA, Pasching) eingeführt. Zur Stressminderung wurden die Karpfen vor dem Handling für die Infizierung narkotisiert.

2.3.3 Narkose

Zur Betäubung wurden die Karpfen nacheinander in ein 1,5 Liter fassendes Plastikaquarium aus dem Aquaristikbedarf überführt. Dieses war mit Leitungswasser befüllt, welchem 0,15 g/l des Narkosemittels MS 222 (Metaaminobenzoessäureethylester, Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugefügt worden waren. Im Narkosebad verblieben die Karpfen bis zum Erlöschen des Augendrehreflexes.

2.4 Probengewinnung

Vor jeder Beprobung wurde der Allgemeinzustand der Versuchskarpfen beurteilt und diese auf äußere pathologische Veränderungen hin begutachtet. Darüber hinaus wurden auch Verhaltensänderungen über den gesamten Versuchsverlauf hinweg protokolliert. Die Entnahme von Gewebeproben für die Untersuchungen erfolgte an den Tagen 2, 5, 8 und 13 p.I., wobei der Infektionstag als Tag 0 angesehen wurde. An jedem Termin wurden 4 infizierte und 2 nicht infizierte Karpfen beprobt.

2.4.1 Tötung und Sektion

Vor der Sektion wurden die Karpfen in einem 1,5 Liter-Aquarium mit einer Dosis von 0,5 g/l des Narkosemittels MS 222 euthanasiert. Für die anschließende Organentnahme wurden die Karpfen auf eine mit einer angefeuchteten Lage Zellpapier bedeckte und gekühlte Unterlage (Kühlakku) überführt. Daraufhin wurde die Leibeshöhle auf der linken Körperseite eröffnet und der Gastrointestinalkanal

hinter dem Oesophagus und vor der Afteröffnung durchtrennt und in voller Länge entnommen. Dieser wurde auf der Kühllunterlage sofort und vorsichtig von einmündenden Darmanhangsdrüsen sowie anhaftendem Fettgewebe bestmöglich befreit und unverzüglich der weiteren Probengewinnung unterzogen.

2.4.2 Probennahme

Für die Untersuchungen kamen Gewebeproben des zweiten und des dritten Darmsegmentes zur Verwendung. Hierbei handelt es sich um den unmittelbar an die magenähnliche Erweiterung (Pseudogaster) anschließenden Teil des Mitteldarmes (2. Segment) sowie um den Enddarm (3. Segment). Entnommen wurden Darmstückchen von 5 mm Länge an einer Position etwa 1 cm hinter dem Pseudogaster für das Mitteldarmsegment und 1 cm vor der Enddarmausmündung für das Enddarmsegment. Die Entfernungsangabe von 1 cm ist als relativ zu betrachten, da sie je nach absoluter Darmlänge etwas variiert werden musste, um für jedes Individuum denselben Darmabschnitt zu beproben. Die Präparation geschah mit äußerster Vorsicht, um die hinfälligen und druckempfindlichen Darmstrukturen bestmöglich zu erhalten.

2.5 Histologie

2.5.1 Gewebefixierung

Die gewonnenen Darmstückchen wurden für die anschließenden histologischen Arbeitsschritte unverzüglich einzeln in bereitstehende Histokassetten (Firma Vogel, Gießen) überführt und in Bouinscher Lösung fixiert:

Bouinsche Lösung (nach BOECK, 1989):

1500 ml gesättigte Pikrinsäure (99%)

500 ml Formaldehyd (37%)

100 ml Eisessig (99%)

In der Fixierungslösung verblieben die Proben für 48 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit wurden sie zum Entfernen des überschüssigen Fixativs mehrmals in 70% Ethanol gepült, bis keine Gelbfärbung des Alkohols mehr eintrat. Hiernach wurden die Proben für 24 Stunden in 80% Ethanol überführt, welcher während dieses Zeitraumes dreimal gewechselt wurde. Anschließend erfolgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Vorbereitung auf die Paraffineinbettung: 24 Stunden in 80% Ethanol, 2 Stunden in 96% Ethanol und 2 Stunden in Isopropanol (abs.).

2.5.2 Paraffineinbettung

Zur Entfernung des Ethanols aus dem Gewebe wurden die Proben zweimal für jeweils 2 Stunden in Xylol eingelegt und in 60°C warmes Paraffin (Paraplast, Sherwood) überführt, wo sie über Nacht verblieben. Am folgenden Tag wurden sie bei wiederum 60°C zweimal, jeweils für 4 Stunden, in frisches Paraffin verbracht, bevor die Einbettung bei derselben Temperatur und mit erneut frischem Paraffin erfolgte. Die Aushärtung fand bei 4°C im Kühlschrank statt.

2.5.3 Schneiden

Die Schnittherstellung der Gewebeproben erfolgte mit einem Standard-Schlittenmikrotom (Firma Reichert/Jung, Heidelberg). Für die Immunhistochemie wurde eine Schnittdicke von 5 µm gewählt. Die angefertigten Schnitte wurden auf einem etwa 50°C warmen Wasserbad gestreckt und schließlich auf beschichtete

Adhäsions-Objektträger (Firma Superfrost, Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Abschließend wurden sie über Nacht bei 60°C im Inkubator getrocknet.

2.6 Immunhistochemie

Die Praxis der Immunhistochemie macht sich Verfahren zunutze, mit welchen Antigene mit Hilfe von markierten spezifischen Antikörpern in mikroskopischen Gewebeschnitten lokalisiert und licht- oder fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Um dies zu erreichen, werden die Antikörper mit farbigen Markern (Chromogen) gekoppelt. In der vorliegenden Untersuchung kam die Visualisierung solcher Antigen-Antikörper-Reaktionen für folgende Proteine zum Einsatz: die transmembranären Proteine Claudin-1 und Claudin-2 sowie die antimikrobiellen Peptide β -Defensin 2, β -Defensin 3 und Lysozym.

2.6.1 Primäre Antikörper

Über die die Eigenschaften der verwendeten primären Antikörper sowie über ihre eingesetzten Konzentrationen gibt Tabelle 3 Auskunft. Alle Antikörper wurden mit PBS und 1% bovinem Serumalbumin (BSA) bis zur benötigten Konzentration verdünnt und das Probengewebe bei 4°C über Nacht mit den Antikörpern inkubiert.

Tabelle 3: Eigenschaften und eingesetzte Konzentrationen der in der Studie verwendeten primären Antikörper (Firma: Biologo)

Primärer Antikörper	Herkunft	Klon	Deklarierte Spezifität	Eingesetzte Konzentration
Claudin-1	Kaninchen	polyklonal	Mensch, Maus	1:100
Claudin-2	Kaninchen	polyklonal	Mensch, Maus	1:50
β -Defensin-2	Kaninchen	polyklonal	Mensch, Maus	1:500
β -Defensin-3	Kaninchen	polyklonal	Mensch, Maus	1:1000
Lysozym	Kaninchen	polyklonal	Mensch	1:100

2.6.2 Detektionssystem

Als Detektionssystem wurde die so bezeichnete „indirekte Methode“ nach PEARSE (1985) angewendet. Hierbei reagiert zunächst ein unmarkierter primärer Antikörper mit dem Antigen im Gewebe. Die anschließende Visualisierung zur Signalverstärkung der Reaktion erfolgt in zwei Schritten: zuerst wird der primäre Antikörper mit einem sekundären Antikörper verbunden. Dieser ist gegen den Immunoglobulin-Isotyp des primären Antikörpers gerichtet und mit einem HRP (**H**orseradish **P**eroxidase)-konjugierten Dextranpolymer markiert. Im zweiten Schritt wird die Verbindung durch die Reaktion mit einem Chromogen sichtbar gemacht. Im vorliegenden Fall handelte es sich bei dem Chromogen um 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), welches durch die Peroxidase am sekundären Antikörper reduziert wird, sobald dieser mit dem primären Antikörper reagiert hatte. Das Reaktionsprodukt ist dann als ein bräunliches Präzipitat im Gewebe an der Reaktion der Antikörperreaktion sichtbar. Katalysiert wird die Reaktion durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches ebenfalls benötigt wird, um die endogene Peroxidase im Gewebe zu blockieren. Dies geschieht bereits während der Entwässerung der Gewebeproben (Tabelle 4). Da alle in dieser Studie verwendeten primären Antikörper vom Kaninchen stammen, wurde als Detektionssystem das Reaktionskit EnVision® Rabbit von DAKO genutzt.

2.6.3 Ablauf der immunhistologischen Färbung

Die generelle Prozedur einer immunhistologischen Färbung ist der Tabelle 4 zu entnehmen. Um überhaupt Reaktionen mit den Strukturen im Gewebe – hier im Karpfendarm – zu ermöglichen, ist zunächst eine Entparaffinierung mit Xylol notwendig. Die anschließende Rehydrierung, also die Rückführung von Wasser in das Gewebe durch eine abfallende Alkoholreihe, ist entscheidend, wenn Reaktionen – wie im vorliegenden Fall – im aquatischen Milieu durchgeführt werden sollen. Im selben Arbeitsgang geschieht die Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation mit H_2O_2 . Bei formalinfixiertem Gewebe kommt es zu Quervernetzungen zwischen den Proteinen und zur Anhäufung von Methylbrücken durch die Reaktion des Fixativs mit den Aminosäuren. Dies kann die gewünschte Reaktivität der Epitope mit den Antikörpern herabsetzen, was eine Demaskierung notwendig machen kann (HORNICKEL et al., 2011). Diese wurde in der vorliegenden Studie für die Antikörperreaktion mit Lysozym mit einer auf 37°C erwärmten Trypsinlösung (0,1%) für 30 Minuten durchgeführt (nach HAUTZER et al., 1980). Die anschließende

Inkubation mit normalem Ziegenserum (NGS) dient der Reduzierung von Hintergrundfärbungen durch vorherige Absättigung freier Bindungsstellen des Gewebes für Proteine. Dies geschieht, indem die Serumproteine an verschiedene Ladungsträger im Probengewebe anlagern und daraufhin der primäre Antikörper nur noch spezifisch mit dem Ziel-Antigen reagieren kann. Die anschließende Inkubation des Gewebes mit dem primären Antikörper sowie die Visualisierung der Bindung des primären Antikörpers geschehen wie unter 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben. Darauf folgt die abschließende Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe und schließlich die Haltbarmachung der Schnitte durch Eindecken mit Eukitt®.

Tabelle 4: Protokoll einer immunhistochemischen Färbung

Arbeitsschritt	Prozedur
Entparaffinierung	- 2 x 10 min. Xylol - 2 min. Isopropylalcohol
Rehydrierung und Inaktivierung der endogenen Peroxidase	- 2 min. 96 % Ethanol - 30 min. 80% Ethanol + H ₂ O ₂ (197 ml 80% Ethanol + 3 ml 30% H ₂ O ₂) - 2 min. 70% Ethanol
Waschen	- 3 x 5 min. PBS
Demaskierung der Epitope	- 30 min. 0,1% Trypsin, pH 7,8, 37°C - Spülen in PBS
Absättigen der freien Bindungsstellen	- 20 min. NGS (Verdünnung 1:5 mit PBS)
Inkubation mit primärem Antikörper	- über Nacht bei 4°C
Waschen	- 3 x 5 min. PBS
Visualisierung	<u>EnVision® Rabbit:</u> - 45 min. Sekundärantikörper (Labelled Polymer HRP) bei Raumtemperatur - 3 x 5 min. PBS - 5 min. Chromogen (40 µl DAB + 1000 µl HRP Substratpuffer)
Waschen	- 5 min. PBS - 10 min. fließendes Leitungswasser
Entwässerung	- 2 min. 70 % Ethanol - 2 min. 80% Ethanol - 2 min. 96 % Ethanol - 2 min. Isopropylalcohol
Eindecken	- Eukitt® (Kindler)

Abkürzungen: DAB: 3,3'-Diaminobenzidin, HRP: Horseradish peroxidase, NGS: Normal goat serum, PBS: Phosphate buffered saline

2.6.4 Kontrollen

Für alle immunhistochemischen Färbungen wurden Negativkontrollen durchgeführt, indem das Gewebe anstelle des primären Antikörpers mit 1% BSA inkubiert wurde. Um die Möglichkeit unspezifischer Bindungen des primären Antikörpers weitestgehend herabzusetzen, wurden darüber hinaus Isotypen-Kontrollen durchgeführt, indem der primäre Antikörper gegen IgG Kaninchen (Sigma) in derselben Proteinkonzentration ersetzt wurde.

2.7 Mikroskopische Auswertung

Die gefärbten Gewebedünnschnitte wurden mit dem Photomikroskop II (Zeiss) mit digitaler Mikroskopkamera (Olympus DP70) analysiert.

2.7.1 Histopathologische Veränderungen der Darmmukosa

Im Verlauf einer Infektion der Darmschleimhaut mit Viren, Bakterien, oder ein- oder mehrzelligen Parasiten sind regelmäßig typische Gewebsveränderungen als Reaktion des Darmgewebes auf die Infektion zu beobachten (JENDRYSEK 1993). Hierzu zählen unter anderem die Reduktion der Anzahl der Becherzellen sowie eine Verkürzung der Mucosafalten. Eine Proliferation der Zellen der Lamina propria und Lamina submucosa bewirkt eine Verbreiterung der Falten und eine Vergrößerung des Abstandes des Epithels von der Lamina muscularis. Auch eine Zellschädigung der Enterozyten kann in unterschiedlichem Maße hinzukommen.

Zur Grundlagenerweiterung für die Bewertung der immunhistochemischen Befunde wurden die Gewebeschnitte in der vorliegenden Studie ebenfalls auf die obenstehend beschriebenen histopathologischen Veränderungen hin untersucht und ausgewertet. Hierzu wurde für die jeweiligen Gewebebereiche bzw. deren Veränderungen ein semiquantitatives Bewertungsschema entworfen, welches der folgenden Aufstellung zu entnehmen ist:

Epithelschädigung:	0 = keine;	1 = beschädigt;	2 = stark beschädigt		
Becherzellen:	0 = keine;	1 = wenige;	2 = mäßig;	3 = viele	
Faltenhöhe:	1 = sehr flach;	2 = flach;	3 = mittel;	4 = hoch;	5 = sehr hoch
Faltenbreite:	1 = normal;	2 = erweitert;	3 = stark erweitert		
Submucosahöhe:	1 = normal;	2 = erweitert;	3 = stark erweitert		

2.7.2 Immunhistochemische Befunde

Auch die Intensitäten der Antikörpermarkierungen wurden anhand eines semiquantitativen Beurteilungsschemas ausgewertet. Dieses bestand aus 6 Stufen:

0 = ungefärbt	3 = mittel
1 = sehr schwach	4 = stark
2 = schwach	5 = sehr stark

2.7.3 Western Blotting

Zur Darstellung der Größe der Proteine, an welche die Antikörper gegen die untersuchten Proteine banden, wurden die Ergebnisse von parallel zu den eigenen Untersuchungen durchgeführten Western Blottings für Lysozym, β -Defensin-3 und Claudin-2 mit einbezogen.

Diese erbrachten für Lysozym eine Bande bei etwa 17kDa, für β -Defensin-3 bei etwa 10 kDa und für Claudin-2 bei 20-25 kDa.

3 Ergebnisse

3.1 Infektionserfolg und Krankheitsverlauf nach experimenteller Infektion mit KHV

In allen Organproben der mit KHV infizierten Karpfen konnte Koi-Herpesvirus-DNA mittels PCR nachgewiesen werden. Die Gewebeproben der nicht infizierten Karpfen waren in der PCR KHV-negativ, Diese Individuen zeigten auch während der gesamten Dauer des Versuches keinerlei Anzeichen einer Erkrankung und blieben ohne Befund.

Bei den infizierten Individuen dagegen wies der Verlauf der Erkrankung im Rahmen der nacheinander erfolgten Versuche deutliche Unterschiede auf. Die jüngsten, drei Monate alten Karpfen zeigten bereits am **zweiten Tag** p.l. erste Reaktionen auf die Infektion. Diese bestanden aus einer verminderten Schwimmaktivität sowie vereinzelt Hautveränderungen in Form von lokal begrenzten, sandpapierartigen Partien. Des Weiteren zeigten die Kiemen Anschwellungen und partielles Ausfransen, wiesen aber eine normale Durchblutung auf. Das Reaktionsvermögen der Karpfen war zu diesem Zeitpunkt nicht beeinträchtigt.

Fünf Tage nach der Infektion kam es zu nun regelmäßigem Auftreten der Hautveränderungen, zusätzlich waren die Kiemen stark verschleimt und blass. Das Schwimmverhalten der Karpfen verschlechterte sich weiterhin, indem neben taumelnden auch unkoordinierte und schnelle, „schießende“ Schwimmbewegungen hinzutraten. Darüber hinaus begann das Reaktionsvermögen der Karpfen nachzulassen.

Nach **acht Tagen** befanden sich die Karpfen in einem apathischen Zustand mit stark vermindertem Reaktionsvermögen. Die zuvor beschriebenen Hautveränderungen traten nun großflächig auf und führten am ganzen Körper zu Stellen mit Sandpapiereffekt, gelockerten Schuppeninsertionen und ausgedehnten Schleimablösungen. Die Verschleimung der Kiemen war hochgradig, in diesem Stadium traten auch erste nekrotische Bereiche des Kiemenepithels auf und es kam zu ersten Mortalitäten.

Nach **13 Tagen** zeigten die Karpfen einen nahezu vollständigen Verlust der Körperkontrolle und des Gleichgewichtes beim Schwimmen, verbunden mit Zuckungen. Auch das Ausrichten der vertikalen Körperachse sowie das Einhalten einer festen Position in der Wassersäule waren stark beeinträchtigt, Reaktionen auf äußere Reize nicht mehr feststellbar. Die Kiemendeckel waren weit abstehend, die

darunter liegenden Kiemen beidseitig stark angeschwollen, hochgradig verschleimt und an allen Kiemenbögen fokal nekrotisch. Die Haut war ödematös, wies Läsionen auf und es kam zu Schuppenverlusten. Vereinzelt war ein beginnender Enophthalmus feststellbar, darüber hinaus traten weitere Todesfälle auf.

Im Gegensatz zu den auffälligen äußeren Veränderungen blieben die inneren Organe bei der Adspektion während der Sektionen ohne besonderen Befund.

Dem intensiven Krankheitsverlauf bei den drei Monate alten Karpfen stehen die nahezu symptomlos verlaufenden Infektionen der folgenden Versuchsgruppen der 10 und 15 Monate alten Karpfen gegenüber. Auch hier konnte der Infektionserfolg mittels PCR bei allen Karpfen nachgewiesen werden, jedoch zeigten die infizierten Karpfen nicht die von den jüngeren Individuen bekannten Reaktionen. So waren bei den 10 Monate alten Karpfen ab dem 5. Tag p.i. lediglich eine Veränderung des Schwimmverhaltens in Form von leichten bis mittelgradigen Koordinationsschwierigkeiten, sowie Apathie und leichte Gleichgewichtsstörungen feststellbar. Kiemen, Haut und Augen blieben – wie auch hier die inneren Organe – ohne Befund. Bei den 15 Monate alten Karpfen schließlich waren keine Symptome mehr erkennbar, auch das Schwimmverhalten änderte sich nicht, lediglich einzelne Fische zeigten Anzeichen einer geringgradigen Apathie. Das Reaktionsvermögen blieb über den gesamten Infektionsverlauf hinweg erhalten und es kam, wie auch bei den 10 Monate alten Individuen, zu keinen Todesfällen. Kiemen, Haut, Augen und innere Organe waren auch bei den 15 Monate alten Karpfen ohne Befund.

Insgesamt ist also die Schwere des Infektionsverlaufes altersabhängig, mit einem symptomärmeren Verlauf bei älteren Individuen.

3.2 Vermehrungskinetik des Koi-Herpesvirus in der Zellkultur

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, war im ersten Versuchsansatz zur Analyse der Vermehrungskinetik des Koi-Herpesvirus in Zellrasen der Karpfenhirnzellen in den ersten vier Tagen p.i. kein zytopathogener Effekt festzustellen. Auch bei der Auswertung der Immunfluoreszenz zum Erkennen von Virusproteinen waren keine markierten Zellen nachweisbar. Ein beginnender CPE zeigte sich am 5. Tag p.i.. An diesem Tag waren Virusproteine in einem Anteil von 20 Prozent der Zellen durch Antikörpermarkierung bei der fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung festzustellen. In den folgenden Tagen traten in den Zellrasen jeweils sehr deutliche

zytopathogene Effekte auf und der Anteil markierter Zellen in den jeweiligen Proben stieg bereits am 6. Tag p.I. auf etwa 80 Prozent, um für die restlichen Tage konstant bei über 90 Prozent zu verbleiben.

Im zweiten Ansatz des Versuches (Tabelle 6) begannen die Zellrasen bereits am 4. Tag p.I. zytopathogene Effekte aufzuweisen, wobei der Anteil markierter Zellen in der Immunfluoreszenz an diesem Tag bereits bei etwa 50 Prozent lag. Nach einer Zunahme auf 60 Prozent markierter Zellen am Folgetag war der weitere Verlauf mit dem des ersten Ansatzes identisch.

In beiden Ansätzen konnte an jedem Versuchstag der Infektionserfolg der Zellkulturen durch positive PCR-Testergebnisse belegt werden.

Tabelle 5: Vermehrungskinetik des Koi-Herpesvirus in Zellrasen von Karpfenhirnzellen, Ansatz 1

Tag p.I.	CPE	Anteil von Zellen mit Virusprotein	Nachweis des Virusgenoms
1	Nein	0 %	Positiv
2	Nein	0 %	Positiv
3	Nein	0 %	Positiv
4	Nein	0 %	Positiv
5	Beginnend	20 %	Positiv
6	Ja	80 %	Positiv
7	Ja	90 %	Positiv
8	Ja	> 90%	Positiv
9	Ja	> 90%	Positiv
10	Ja	> 90%	Positiv

Virusproteine wurden mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen

CPE = cytopathologischer Effekt; Tag p.I. = Tag nach Infektion

Tabelle 6: Vermehrungskinetik des Koi-Herpesvirus in Zellrasen von Karpfenhirnzellen, Ansatz 2

Tag p.I.	CPE	Anteil von Zellen mit Virusprotein	Nachweis des Virusgenoms
1	Nein	Negativ	Positiv
2	Nein	Negativ	Positiv
3	Nein	Negativ	Positiv
4	Beginnend	50 %	Positiv
5	Ja	60 %	Positiv
6	Ja	80 %	Positiv
7	Ja	90 %	Positiv
8	Ja	> 90%	Positiv
9	Ja	> 90%	Positiv
10	Ja	> 90%	Positiv

Virusproteine wurden mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen
 CPE = cytopathologischer Effekt; Tag p.I. = Tag nach Infektion

3.3 Veränderungen im infizierten Darmgewebe

Die unter 2.7 beschriebenen möglichen histopathologischen Veränderungen des Darmgewebes infizierter Karpfen konnten auch in der vorliegenden Arbeit bei Karpfen unter Einfluß einer KHV-Infektion festgestellt werden. So ist den Tabellen 7 bis 9 zu entnehmen, dass die Anzahl der Becherzellen, welche natürlicherweise im Mitteldarm größer ist als im Enddarm, in beiden Darmsegmenten der Karpfen unter KHV-Infektion einen deutlichen Rückgang aufwies. Stets lag am 13. Tag p.I. die Anzahl der nachgewiesenen Becherzellen deutlich unter derjenigen der als Referenz dienenden, nicht infizierten Individuen. Zumeist war bereits während der vorangegangenen Probenahmetermine ein gradueller Rückgang zu verzeichnen. Eine Ausnahme stellte nur das Enddarmsegment der 10 Monate alten Karpfen dar, in welchem die Anzahl der Becherzellen von „wenigen“ (0,8) bei den nicht infizierten Karpfen, zunächst auf „mäßig“ (2,0) bei den KHV-infizierten Karpfen an Tag 2 p.I. anstieg, bis zum Tag 13 p.I. aber wieder auf „wenige“ (0,6) zurückging.

Des Weiteren war eine auffällige Verkürzung der Mucosafalten bei den Karpfen unter dem Einfluß einer KHV-Infektion zu beobachten, die sich bis auf wenige Ausnahmen ebenfalls allmählich während des Untersuchungszeitraumes entwickelte. Am 13.Tag p.I. wiesen die Karpfen schließlich deutliche Veränderungen gegenüber den nicht infizierten Individuen auf, welche als Reduktion der Faltenhöhe um bis zu 50 Prozent sichtbar wurde. Einhergehend mit der Verkürzung der Mucosafalten kam es zu deren

Verbreiterung durch starke Zellvermehrungen in der Lamina propria, während eine äquivalente Vermehrung der Zellen der Lamina submucosa den Abstand zwischen Darmepithel und Lamina muscularis vergrößerte. Auch diese Veränderungen traten nicht plötzlich mit Beginn der Infektion auf, sondern entwickelten sich schrittweise bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes, an welchem wiederum deutliche Unterschiede gegenüber den nicht infizierten Karpfen festgestellt werden konnten. Nur bei den drei Monate alten Karpfen kam es diese Veränderungen betreffend im Infektionsverlauf nicht zu einem schrittweisen Anstieg, sondern zu Schwankungen. Dennoch waren die Breite der Lamina propria und die Höhe der Lamina submucosa auch bei diesen Individuen am 13. Tag p.I. gegenüber den nicht infizierten Karpfen deutlich angestiegen. Schädigungen der Enterozyten in Form von besonders an der Faltenpitze auftretenden Zerstörungen der apikalen Zellregionen waren bei den Karpfen unter KHV-Infektion feststellbar, unterlagen aber keinem eindeutigen Entwicklungsmuster den Krankheitsverlauf betreffend. Zumeist war aber das Enddarmsegment etwas stärker von Epithelschädigungen betroffen. Im Vergleich der drei Altersgruppen erweckte das mikroskopische Bild des Darmgewebes der drei Monate alten Karpfen den Eindruck des größten Ausmaßes an Epithelschädigungen, diese wiesen noch bis zum Versuchsende große Bereiche zerstörten Gewebes auf. Im Gegensatz dazu waren die Schädigungen der 10 und 15 Monate alten Karpfen optisch geringgradiger, hier waren vor allem gegen Ende des Versuchszeitraumes auch vereinzelt bereits regenerative Bereiche erkennbar.

Tabelle 7: Histopathologische Veränderungen im Darm von 3 Monate alten Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation				
		Epithelschädigung	Anzahl GZ	Faltenhöhe	Propriabreite	Submucosahöhe
Mitteldarm	Kontrolle	0,0 (0)	2,8 (2,5-3)	4,0 (3-5)	1,0 (1)	1,0 (1)
	Tag 2	1,3 (1-1,5)	2,5 (2,5)	3,0 (2,5-3,5)	1,3 (1-1,5)	1,5 (1-2)
	Tag 5	0,5 (0,5)	0,8 (0-1,5)	3,0 (3)	1,0 (1)	1,0 (1)
	Tag 13	1,5 (1-2)	0,8 (0-2,5)	2,4 (1,5-3)	1,5 (1-2)	1,5 (1-2)
Enddarm	Kontrolle	0,0 (0)	2,0 (1,5-2)	2,4 (1,5-3,5)	1,0 (1)	1,0 (1)
	Tag 2	1,0 (1)	2,0 (2)	2,5 (2,5)	1,8 (1,5-2)	1,3 (1-1,5)
	Tag 5	1,3 (1-1,5)	1,0 (0,5-1,5)	2,0 (1,5-2,5)	1,5 (1-2)	1,8 (1,5-2)
	Tag 13	1,8 (1,5-2)	0,0 (0)	1,8 (1,5-2,5)	1,6 (1-2)	2,0 (2)

Tabelle 8: Histopathologische Veränderungen im Darm von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation				
		Epithelschädigung	Anzahl GZ	Faltenhöhe	Propriabreite	Submucosahöhe
Mitteldarm	Kontrolle	0,0 (0)	2,0 (1-3)	3,4 (3-4)	1,0 (1)	1,0 (1)
	Tag 2	0,5 (0-1)	2,5 (2,5)	3,3 (3-3,5)	1,0 (1)	1,0 (1)
	Tag 5	0,1 (0-0,5)	1,6 (1-2,5)	2,9 (2-3,5)	1,6 (1-2,5)	1,5 (1-2,5)
	Tag 8	0,5 (0-1)	1,1 (1-1,5)	2,3 (1,5-2,5)	2,4 (2-3)	1,5 (1-2)
	Tag 13	0,4 (0-0,5)	0,6 (0-1,5)	1,9 (1,5-3)	2,1 (1,5-2,5)	2,1 (1,5-3)
Enddarm	Kontrolle	0,0 (0)	0,8 (0-1,5)	2,0 (1,5-2,5)	1,5 (1-2)	1,8 (1-3)
	Tag 2	0,7 (0,5-1,5)	2,0 (2)	2,0 (1-3)	1,3 (1-1,5)	1,3 (1-1,5)
	Tag 5	0,4 (0-1)	0,6 (0-2)	1,6 (1,5-2)	2,1 (1,5-2,5)	2,4 (2-3)
	Tag 8	0,8 (0-1,5)	0,5 (0-1)	1,3 (1-1,5)	2,3 (2-2,5)	2,3 (2-2,5)
	Tag 13	0,4 (0-1)	0,6 (0-1,5)	1,0 (1)	2,8 (2-3)	2,8 (2,5-3)

Tabelle 9: Histopathologische Veränderungen im Darm von 15 Monate alten Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation				
		Epithelschädigung	Anzahl GZ	Faltenhöhe	Propriabreite	Submucosahöhe
Mitteldarm	Kontrolle	0,0 (0)	2,2 (1,5-2,5)	4,0 (3,5-4,5)	1,1 (1-1,5)	1,0 (1)
	Tag 2	0,5 (0-1)	2,3 (1,5-3)	3,3 (3-4)	1,3 (1-1,5)	1,5 (1-2)
	Tag 5	0,5 (0-5)	1,5 (1-2)	3,8 (3,5-4)	1,5 (1,5)	1,0 (1)
	Tag 8	0,6 (0-1,5)	1,4 (1-2)	2,6 (2-3,5)	1,9 (1,5-2,5)	1,6 (1-2)
	Tag 13	0,5 (0-1)	1,5 (0-5-2)	2,1 (1-3,5)	2,3 (2-2,5)	1,6 (1,5-2)
Enddarm	Kontrolle	0 (0)	1,3 (1-1,5)	2,8 (2,5-3)	1,2 (1-1,5)	1,2 (1-1,5)
	Tag 2	0,3 (0-1)	1,7 (1-2,5)	2,5 (2-3)	1,3 (1-1,5)	1,5 (1,5)
	Tag 5	1,0 (1)	1,3 (0,5-2)	2,3 (2-2,5)	1,5 (1,5)	1,8 (1,5-2)
	Tag 8	1,3 (0,5-2)	0,9 (0-1,5)	2,4 (1,5-3)	1,8 (1,5-2)	2,3 (1,5-2,5)
	Tag 13	1,3 (0,5-1,5)	0,4 (0-1)	1,8 (1,5-2)	2,0 (2)	2,0 (1,5-2,5)

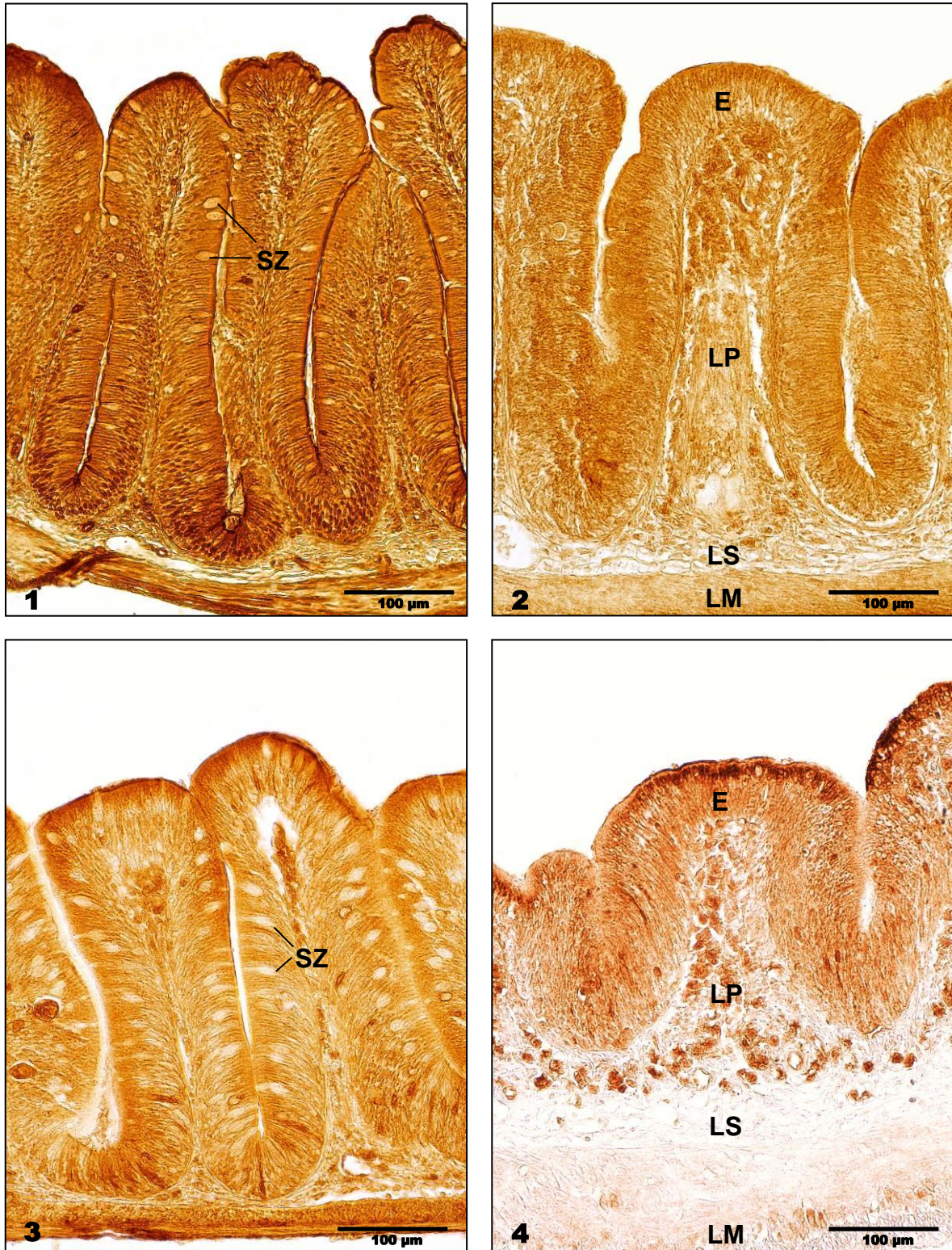


Abbildung 1-4: Darstellung der histopathologischen Veränderungen im Darm von 10 Monate alten *Cyprinus carpio* unter dem Einfluß einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus: Verkürzung der Falten, Proliferation von Lamina propria und Lamina submucosa, Verringerung der Schleimzellanzahl

Abb. 1+2: Mitteldarm, links: nicht infiziert, rechts: 13. Tag p.I.

Abb. 3+4: Enddarm, links: nicht infiziert, rechts: 13. Tag p.I.

E: Epithel, LM: Lamina muscularis, LP: Lamina propria, LS: Lamina submucosa, SZ: Schleimzellen

3.4 Immunhistochemische Befunde

3.4.1 Claudin-1

3.4.1.1 Bindung des für humanes Claudin-1 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm

Bindungen der Antikörper für humanes Claudin-1 erfolgten primär an Strukturen des intestinalen Epithels. Diese waren vor allem an den Zellwänden der Enterozyten lokalisiert, wo die intensivsten Markierungen hauptsächlich in den basalen Bereichen beobachtet werden konnten, in geringerem Maße auch in apikalen Zellbereichen. Das Zytoplasma der Enterozyten blieb dagegen ungefärbt. Die Markierungen konnten in unterschiedlicher Ausprägung sowohl in den Mitteldarm- (Abbildung 5-8) als auch in den Enddarmsegmenten (Abbildung 9-12) in allen Regionen der Mucosafalten (Faltenspitze, Faltenflanke und Faltengrund) festgestellt werden. Sowohl die apikal zwischen den Enterozyten liegenden Becherzellen als auch die von diesen produzierte Schleimauflage des Darmepithels blieb ungefärbt. Ohne Markierungen verblieb auch das Endothel der Blutgefäße. Bis auf wenige individuelle Ausnahmen in Form von Anfärbungen einzelner Zellen wiesen ebenfalls Lamina propria, Lamina submucosa und Lamina muscularis keinerlei Markierungen auf.

3.4.1.2 Befunde an nicht infizierten Karpfen (Kontrollen)

Beim Vergleich der nicht infizierten Karpfen aus den jeweiligen Versuchsdurchgängen war ein deutlicher Rückgang der Antikörperbindungen von den jüngsten, drei Monate alten Karpfen bis hin zu den 15 Monate alten Individuen des abschließenden dritten Versuches erkennbar. So gingen die im Mitteldarm intensiv markierten Bereiche der apikalen und basalen Enterozytenbereiche der Faltenflanken von durchschnittlich 1,7 auf 0,6 bzw. 0,8 zurück. Auch der bei den drei Monate alten Individuen noch mit einer Intensität von 2,0 am stärksten markierte apikale Faltengrund erreichte bei Karpfen im Alter von 15 Monaten im dritten Versuch nur noch eine Markierungsintensität von 0,6 (Tabelle 10). Dieser Rückgang betraf alle Epithelbereiche mit Ausnahme der basalen Enterozytenbereiche der Faltenflanken und des Faltengrundes der 10 Monate alten Karpfen im zweiten Versuch, welche hier noch eine Stärke von 2,5 aufwiesen. Bei 15 Monate alten Karpfen fiel die Markierung auch hier auf 0,8 bzw. 1,0 ab.

Vergleichbare Ergebnisse erbrachte auch die Betrachtung der Bindungsintensitäten der Antikörper für humanes Claudin-1 an den untersuchten Enddarmabschnitten.

Insgesamt stärker als im Mitteldarm, so waren auch hier die meisten Markierungen in den basalen Enterozytenanteilen der Faltenflanken und des Faltengrundes zu finden. Die Intensitäten gingen von im Mittel 3,3 bei den Karpfen im Alter von neun Monaten auf 1,8 in der Faltenflanke sowie 2,4 am Faltengrund bei den 15 Monate alten Karpfen zurück. Ein vergleichbarer Rückgang der Bindungsintensitäten betraf auch alle übrigen Epithelbereiche.

Tabelle 10: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Versuch 1	1,2 (0-2,5)	1,0 (0-2)	1,7 (1-2)	1,7 (1-3)	2,0 (2)	1,3 (0-2)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,0 (0)
	Versuch 2	1,0 (0,5-1,5)	1,0 (1,0)	1,0 (1,0)	2,5 (2-3)	0,5 (0-1)	2,5 (2-3)	1,0 (1,0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Versuch 3	0,6 (0-2)	0,7 (0-2,5)	0,6 (0-2)	0,8 (0-2,5)	0,6 (0-2)	1,0 (0-3)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)
Enddarm	Versuch 1	2,0 (1-3,5)	2,8 (1-4)	2,4 (1-3)	3,3 (1-4)	2,3 (1-3)	3,3 (1-4)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)
	Versuch 2	1,8 (1,5-2)	2,0 (1,5-3)	1,8 (1,5-2)	2,2 (1,5-3,5)	1,7 (1,5-2)	2,0 (1-3,5)	0,2 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Versuch 3	0,8 (0-1)	0,9 (0-2)	0,9 (0-2)	1,8 (1-2,5)	1,2 (0,5-2,5)	2,4 (1-3,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

Angegeben sind die Mittelwerte aus Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
 Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

3.4.1.3 Befunde an Karpfen unter KHV-Infektion

Unter dem Einfluß einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus veränderte sich das Muster der Antikörperbindungen bei den Karpfen aller Altersgruppen nicht. Weiterhin lagen die Schwerpunkte der Markierungen durchweg auf den basalen Enterozytenbereichen vor allem der Faltenflanken und des Faltengrundes, im Enddarmsegment auch an der Falten spitze, so dass das Epithel hier durchgehend und gleichmäßig markiert erschien.

Deutliche Unterschiede gegenüber den nicht infizierten Karpfen ergaben sich allerdings bezüglich der Intensität der Antikörperbindungen, die sich über den Infektionsverlauf hinweg unabhängig vom Alter der Karpfen in vergleichbarer Weise änderte. So war für die meisten Epithelbereiche in beiden untersuchten Darmsegmenten bis einschließlich Tag 5 p.I. ein deutlicher Rückgang der Bindungsintensitäten zu verzeichnen. Dieser Rückgang betraf die Karpfen aller Altersgruppen in vergleichbarer Weise. Das heißt, die Bindungsintensitäten lagen bei allen Karpfen zwischen dem 2. und 5. Tag p.I. in den Mitteldarmsegmenten zwischen 0 bis maximal 1,5 in den am stärksten markierten Epithelregionen (Faltenflanke basal und Faltengrund basal, Tabelle 11-13), während bei den nicht infizierten Karpfen in denselben Bereichen Bindungsintensitäten von 0,8 bis 2,5 erreicht wurden. Die vergleichsweise niedrigen Mittelwerte von 0,8 bzw. 1 für die basalen Epithelbereiche an Faltenflanke und Faltengrund im Mitteldarmsegment der 15 Monate alten Karpfen (Tabelle 13) stellen bei den allgemein sehr schwachen Bindungsintensitäten dieser Altersgruppe allerdings auch hier einen deutlichen Unterschied gegenüber den Werten des 2. und 5. Tages p.I. (0,0 und 0,1) dar. Auf den beschriebenen Rückgang folgte in allen drei Versuchen zum Probennahmeende hin ein Anstieg der Bindungsintensitäten, welche am 13. Tag p.I. in den jeweiligen Altersgruppen wieder Werte erreichten, die sich jenen der nicht infizierten Karpfen annähern. Eine Ausnahme stellten die 15 Monate alten Karpfen des dritten Versuchsdurchganges dar: Hier wurden die maximalen Bindungsintensitäten im Mitteldarmsegment bereits am 8. Tag p.I. erreicht, wo sie in allen Epithelbereichen jene der nicht infizierten Karpfen übertrafen (Tabelle 13). Es folgte ein erneuter Rückgang bis zum 13. Tag p.I. auf Werte leicht unter jenen der nicht infizierten Karpfen.

Im Durchschnitt etwas stärker markiert als der Mitteldarm, zeigte sich bei den Enddarmsegmenten zunächst eine vergleichbare Dynamik der Bindungsintensitäten. Auch hier kam es zunächst zu einem Rückgang der Markierungen bis zum 5. Tag

p.I., wobei sich im weiteren Verlauf allerdings Unterschiede zum Verhalten des Mitteldarmsegmentes und zwischen den jeweiligen Altersgruppen ergaben. Bei den drei Monate alten Karpfen konnte bis zum 13. Tag p.I. kein erneuter Anstieg der Bindungsintensitäten beobachtet werden (Tabelle 11). Bei den 10 Monate alten Karpfen war ein Rückgang der Bindungsintensitäten am 2. Tag p.I. nur an der Falten spitze zu finden, während die Markierungen an Faltenflanke und Faltengrund mit 2,5 in der Größenordnung der nicht infizierten Karpfen verblieben (Tabelle 12). Nach einem Rückgang der Markierungen auch dieser Bereiche am 5. Tag p.I., wurden bereits am 8. Tag p.I. die Intensitäten der nicht infizierten Karpfen wieder erreicht, wobei die Antikörper nicht ausschließlich in den basalen, sondern zum Teil auch in den darüber gelegenen Zellwandbereichen der Enterozyten banden. Letzteres zeigte sich besonders deutlich am 13. Tag p.I., an welchem das gesamte Epithel deutlich markiert war. Die stärksten Bindungen traten jedoch auch hier wieder in den basalen Epithelbereichen auf. Die Entwicklung der Markierungen in den Enddarmsegmenten der 15 Monate alten Karpfen schließlich entsprach wieder weitgehend jener der Mitteldarmsegmente dieser Altersgruppe: auf einen deutlichen Rückgang der Bindungsintensitäten zu Beginn der Infektion folgte ein Anstieg bis zum Tag 13 p.I., an welchem die Werte für die basalen Epithelbereiche der Faltenflanke (2,0) und des Faltengrundes (2,3) jene der nicht infizierten Karpfen (1,8 und 2,4) wiederum annähernd erreichten (Tabelle 13).

Tabelle 11: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	1,2 (0-2,5)	1,0 (0-2)	1,7 (1-2)	1,7 (1-3)	2,0 (2)	1,3 (0-2)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,0 (0)
	Tag 2	0,0 (0)	0,5 (0,5)	0,0 (0)	0,5 (0,5)	0,0 (0)	0,5 (0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,5 (0-1)	0,3 (0-0,5)	0,5 (0-1)	0,3 (0-0,5)	0,5 (0-1)	0,3 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	0,3 (0-1)	0,7 (0-2)	0,3 (0-1)	0,7 (0-2)	0,3 (0-1)	0,7 (0-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Enddarm	Kontrolle	2,0 (1-3,5)	2,8 (1-4)	2,4 (1-3)	3,3 (1-4)	2,3 (1-3)	3,3 (1-4)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)
	Tag 2	0,0 (0)	0,5 (0,5)	0,0 (0)	1,0 (1,0)	0,5 (0,5)	0,5 (0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,5 (0-1)	1,0 (1)	0,5 (0,5)	1,0 (1)	0,5 (0,5)	1,0 (1,0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	0,4 (0-1)	0,6 (0-1)	0,3 (0-1)	0,6 (0-1)	0,3 (0-1)	0,9 (0-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 12: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	1,0 (0,5-1,5)	1,0 (1,0)	1,0 (1,0)	2,5 (2-3)	0,5 (0-1)	2,5 (2-3)	1,0 (1,0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	1,0 (0,5-1,5)	1,3 (1,0 -1,5)	1,0 (0,5-1,5)	1,5 (1-2)	1,0 (0,5-1,5)	1,3 (1-1,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	1,0 (0,5-1,5)	1,3 (1-1,5)	1,0 (0,5-1,5)	1,3 (1-1,5)	1,0 (0,5-1,5)	1,5 (1-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 8	1,5 (1-2)	1,5 (1-2,5)	1,2 (1-1,5)	1,8 (1,5-2)	1,0 (0,5-1,5)	1,5 (0,5-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	1,8 (1,5-2)	1,5 (1,5)	1,8 (1,5-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Enddarm	Kontrolle	1,8 (1,5-2)	2,0 (1,5-3)	1,8 (1,5-2)	2,2 (1,5-3,5)	1,7 (1,5-2)	2,0 (1-3,5)	0,2 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	1,0 (1,0)	1,5 (1-2)	1,0 (1,0)	2,5 (2,5)	1,0 (1,0)	2,5 (2-3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	1,3 (0-2)	1,0 (0-2,5)	1,5 (0-2)	1,6 (0-3)	1,1 (0-2)	1,8 (0-2,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 8	1,5 (1,5)	2,3 (2,0-2,5)	1,5 (1,5)	2,8 (2,5-3)	1,5 (1,5)	2,5 (2,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	2,3 (2,0-2,5)	2,8 (2,5-3)	2,0 (2,0)	2,8 (2,5-3)	2,3 (2,0-2,5)	2,8 (2,5-3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 13: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-1 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	0,6 (0-2)	0,7 (0-2,5)	0,6 (0-2)	0,8 (0-2,5)	0,6 (0-2)	1,0 (0-3)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)
	Tag 2	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,0 (0)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 8	1,0 (0-1)	1,3 (0-1,5)	1,2 (0,5-2,5)	1,8 (1,5-3)	1,2 (0,5-2,5)	1,8 (1-3)	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0,0 (0)
	Tag 13	0,3 (0-1)	0,5 (0-1,5)	0,4 (0-1,5)	0,5 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,5 (0-1,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Enddarm	Kontrolle	0,8 (0-1)	0,9 (0-2)	0,9 (0-2)	1,8 (1-2,5)	1,2 (0,5-2,5)	2,4 (1-3,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	0,0 (0)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,9 (0,5-2)	0,3 (0-1)	1,4 (0,5-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	1,2 (0-2)	0,2 (0-0,5)	1,2 (0-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 8	0,1 (0-0,5)	0,5 (0,5-1,5)	0,1 (0-0,5)	1,0 (0,5-1,5)	0,1 (0-0,5)	1,6 (1-2)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	0,5 (0-1)	0,5 (0-1)	0,3 (0-0,5)	2,0 (1-3)	0,7 (0-1,5)	2,3 (2-2,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
 Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

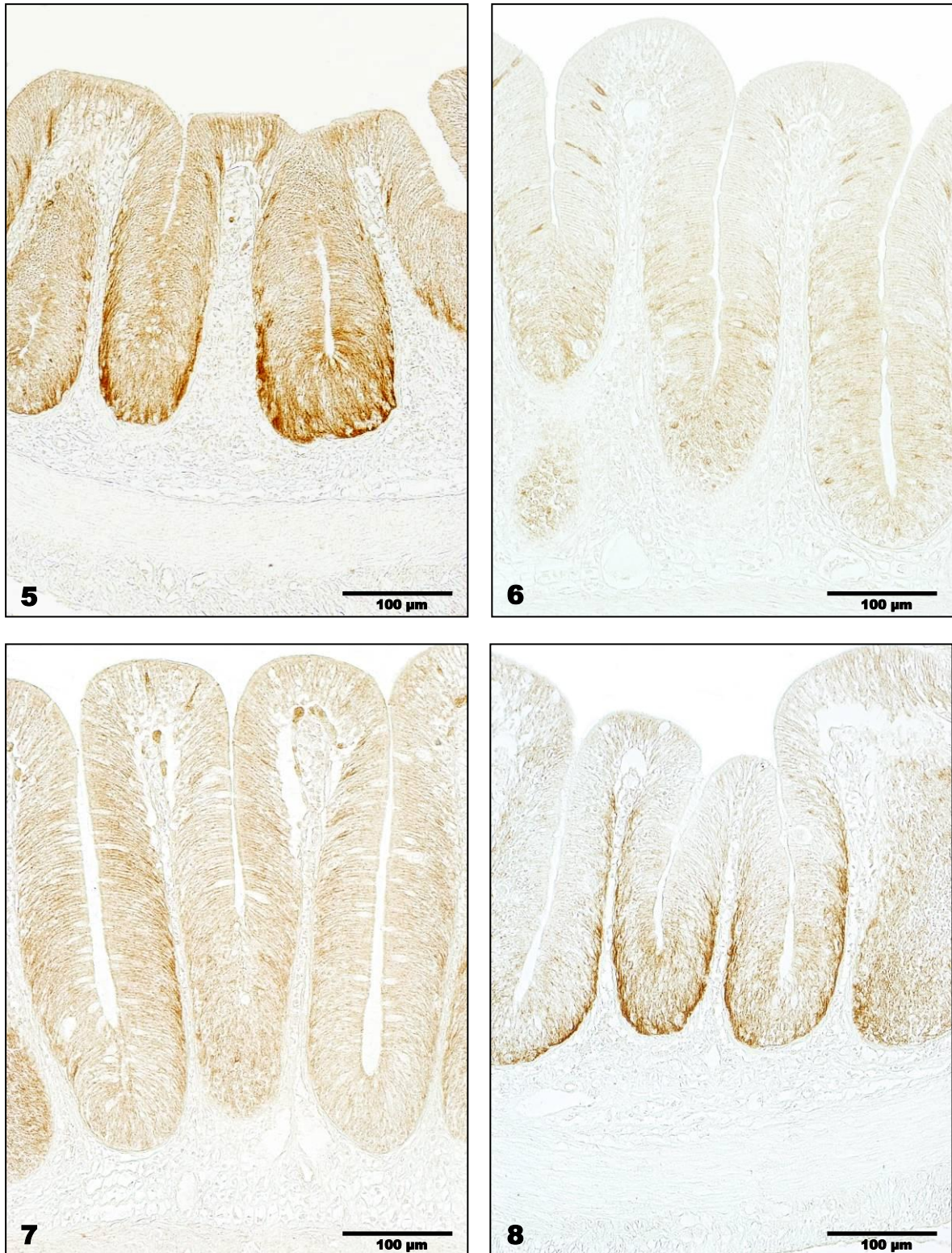


Abbildung 5-8: Bindungen des für humanes Claudin-1 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Mitteldarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV

Abb. 5: nicht infiziert Deutliche Markierung der basalen Enterozytenbereiche an Faltenflanke und Faltengrund, teilweise Markierung apikaler Bereiche an den Falten spitzen

Abb. 6: 2. Tag p.I. Sehr schwache Markierungen der Zellwände der Enterozyten besonders an Faltenflanke und Faltengrund

Abb. 7: 8. Tag p.I. Markierung der Zellwände der Enterozyten vor allem basal an den Faltenflanken zunehmend

Abb. 8: 13. Tag p.I. Deutliche Markierung der basalen Enterozytenbereiche an Faltenflanke und Faltengrund

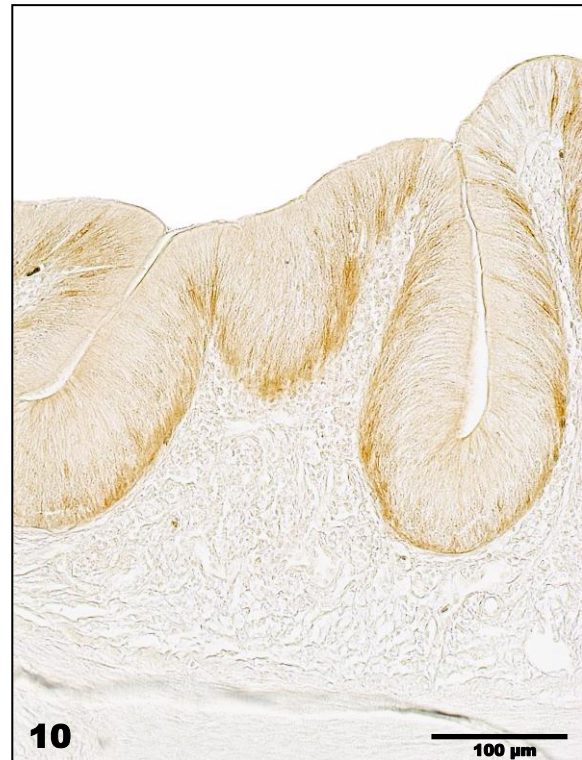


Abbildung 9-12: Bindungen des für humanes Claudin-1 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Enddarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV

- Abb. 9: nicht infiziert Deutliche Reaktion des gesamten Epithels, stärkste Markierungen basal
Abb. 10: 2. Tag p.i. Markierungen primär in den basalen Enterozytenbereichen der gesamten Falte
Abb. 11: 8. Tag p.i. Bindungsintensitäten v.a. am Faltengrund zunehmend
Abb. 12: 13. Tag p.i. Wie Abb. 9

3.4.2 Claudin-2

3.4.2.1 Bindung des für humanes Claudin-2 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm

Die Bindungen des für humanes Claudin-2 spezifischen Antikörpers erfolgten an denselben Lokalisationen wie auch für Claudin-1 beschrieben und waren auch in ihrem Verteilungsmuster vergleichbar. Wiederum erfolgten die Bindungen an den Zellwänden der Enterozyten des intestinalen Epithels und konnten ebenfalls sowohl im Mitteldarmsegment (Abbildung 16-19) als auch im Enddarmsegment (Abbildung 20-23) in unterschiedlicher Ausprägung in allen Regionen der Mucosafalten nachgewiesen werden. Während die Markierungen für Claudin-1 allerdings hauptsächlich die basalen Enterozytenbereiche beider Darmsegmente betrafen, so waren für Claudin-2 im Mitteldarmsegment auch die apikalen Epithelbereiche, vor allem an den Faltenspitzen und den Faltenflanken, teilweise deutlich markiert. Als ein weiterer Unterschied zur Immunreaktion des vorangehend besprochenen Antikörpers traten bei einigen Individuen auch Markierungen an der Zellmembran von Zellen in der Lamina propria und Lamina submucosa auf, welche allerdings schwächer waren als die Markierungen an den Zellwänden von Enterozyten. Becherzellen, Schleimaufgabe sowie die Endothelien der Blutgefäße verblieben auch für Claudin-2 nicht markiert. Wie bereits für Claudin-1 dargestellt, so waren auch die Markierungen von Claudin-2 allgemein als schwach, in Ausnahmefällen als mittel, mit 2,8 bei den drei Monate alten, nicht infizierten Karpfen als maximale Bindungsintensität einzustufen.

3.4.2.2 Befunde an nicht infizierten Karpfen (Kontrollen)

Auch für Claudin-2 war der bereits für Claudin-1 beschriebene Rückgang der Bindungsintensitäten mit zunehmendem Alter und Gewicht der Karpfen feststellbar. Dies betraf ebenfalls alle Epithelbereiche beider Darmsegmente und geschah in vergleichbarer Deutlichkeit wie bei Claudin-1 (Abbildung 13-15).

Wie der Tabelle 14 zu entnehmen ist, traten in den Mitteldarmsegmenten der drei und zehn Monate alten Karpfen die stärksten Markierungen mit 1,0 bis 1,5 in den apikalen Enterozytenbereichen der Mucosafalten auf. Andere Epithelbereiche blieben nahezu ungefärbt. Diese Bindungsmuster änderten sich bei den 15 Monate alten Karpfen dahingehend, dass nunmehr die basalen Enterozytenbereiche mit 0,4 gegenüber den apikalen mit 0,1 etwas stärker markiert waren, die Bindungsintensität insgesamt aber deutlich zurückging.

Im Enddarmsegment waren die stärksten Markierungen in den basalen Bereichen der Enterozyten zu finden, wobei diese bei den drei Monate alten Karpfen mit 2,8 an der Falten spitze und 2,6 an der Faltenflanke die maximalen Bindungsintensitäten erreichten. Das apikale Epithel des Faltengrundes war dagegen mit 0,6 nur schwach markiert. Bereits bei den 10 Monate alten Karpfen zeigte sich ein drastischer Rückgang der Bindungsintensitäten gegenüber den jüngeren Individuen. So waren die zuvor noch vergleichsweise intensiv gefärbten Epithelbereiche der Falten spitzen und der Faltenflanken mit Bindungsintensitäten von 0,3 in den apikalen bzw. 0,4 in den basalen Regionen nur noch schwach markiert. Bei den 15 Monate alten Karpfen gingen diese Bindungsintensitäten nochmals zurück und erreichten im gesamten Faltenepithel gleichmäßig nur noch 0,1 in den apikalen und 0,2 in den basalen Enterozytenbereichen.

Tabelle 14: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Versuch 1	1,5 (1,5)	0,0 (0)	1,5 (1,5)	0,0 (0)	1,5 (1,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Versuch 2	1,0 (0-3)	0,0 (0)	1,0 (0-3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Versuch 3	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)
Enddarm	Versuch 1	1,4 (0-2)	2,8 (0-4)	1,1 (0-2)	2,6 (0-4)	0,6 (0-1)	0,6 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)
	Versuch 2	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Versuch 3	0,1 (0-0,5)	0,2 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,2 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,2 (0-1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

Angabe sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

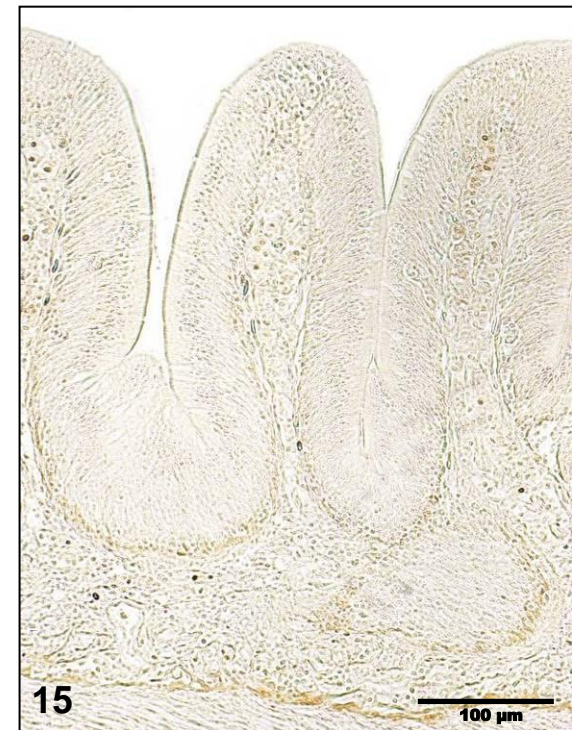
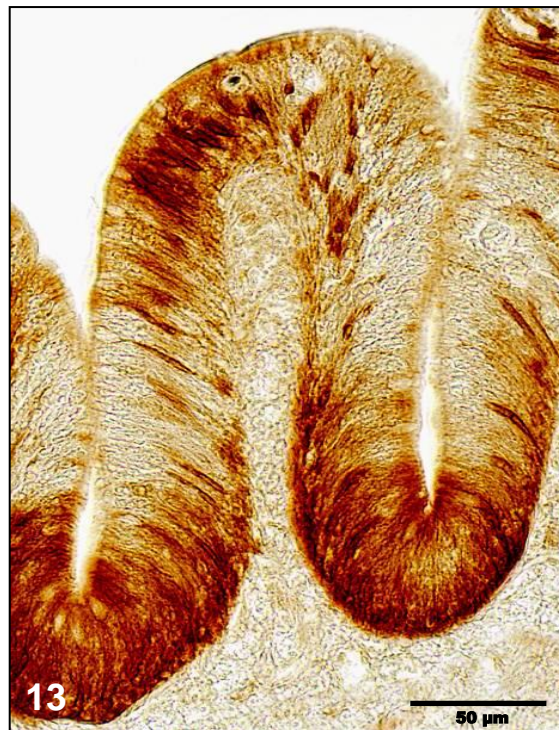


Abbildung 13-15: Darstellung der altersabhängigen Abnahme der Bindungsintensitäten des Antikörpers gegen humanes Claudin-2 an Strukturen im Enddarmgewebe von *Cyprinus carpio* bei nicht infizierten Individuen.

Abb. 13: Alter: 3 Monate, Abb. 14: Alter: 10 Monate, Abb. 15: Alter: 15 Monate

3.4.2.3 Befunde an Karpfen unter KHV-Infektion

Auch für Claudin-2 war keine Veränderung im Muster der Antikörperbindungen unter dem Einfluss einer KHV-Infektion gegenüber den nicht infizierten Karpfen festzustellen. Allerdings verlor die bevorzugte Markierung bestimmter Epithelbereiche vor allem im Mitteldarmsegment bei den infizierten Karpfen mitunter an Klarheit. Waren bei den drei und 10 Monate alten, nicht infizierten Karpfen noch die apikalen Enterozytenbereiche der Faltenspitze und des Faltengrundes deutlich stärker markiert als die übrigen Bereiche, traf dies bei den infizierten Karpfen nur noch für die 10 Monate alten Individuen zu (Tabelle 16). Bei den drei Monate alten Karpfen (Tabelle 15) kehrte sich das Verhältnis sogar zugunsten von leicht stärker markierten basalen Enterozytenanteilen um. Allerdings waren die festgestellten Unterschiede zwischen den jeweiligen Epithelbereichen bei den Karpfen dieser Altersgruppen insgesamt sehr schwach und erreichten eine maximale Differenz der Bindungsintensitäten von 0,5, was sich in einem relativ gleichmäßigen Verteilungsmuster der Markierungen ausdrückte. Bei den 15 Monate alten Karpfen (Tabelle 17) zeigte sich zunächst eine deutlich stärkere Markierung der apikalen Epithelbereiche am 2. und am 5. Tag p.I. mit 1,5 bzw. 0,9 an der apikalen Faltenspitze und Faltenflanke gegenüber 0,3 in den basalen Anteilen dieser Epithelbereiche. Im Folgenden entsprachen mit einer stärkeren Markierung der basalen Anteile und nach einer Abschwächung der Bindungsintensitäten am 13. Tag p.I. auf 0,3 in den apikalen und 0,4 in den basalen Enterozytenbereichen die Befunde zu diesem Zeitpunkt schließlich weitgehend jenen der nicht infizierten Karpfen dieser Altersgruppe.

Die Enddarmsegmente der Karpfen unter KHV-Infektion wiesen das auch bei Claudin-1 festgestellte Bindungsmuster in Form von stärker markierten basalen und schwächer markierten apikalen Enterozytenbereichen auf. Dieses Muster betraf alle Epithelbereiche der Mucosafalten in ähnlicher Weise, mit nur geringen individuellen Abweichungen. Auffällig war, dass sowohl bei den 10 Monate alten als auch bei den 15 Monate alten Karpfen vorübergehend Bindungsintensitäten erreicht wurden, welche jene der nicht infizierten Karpfen deutlich übertrafen. Mit Intensitäten von durchschnittlich 1,5 in den basalen Epithelbereichen geschah dies bei den 10 Monate alten Individuen am 8. Tag p.I., bei den 15 Monate alten Karpfen mit 1,9 bis 2,3 bereits am 2. Tag p.I. In beiden Fällen ging die Intensität der Bindungen nach Erreichen dieser Maxima zum Versuchsende hin wieder zurück. Dies steht im

Gegensatz zu den drei Monate alten Karpfen, welche mit Intensitäten von 0,3 bis 0,5 ihre stärksten Markierungen erst am 13 Tag p.I. erreichten, welche aber deutlich schwächer waren als jene der nicht infizierten Karpfen dieser Altersgruppe mit 2,8 an der Falten spitze und 2,6 an der Faltenflanke.

Insgesamt fiel auch bei Claudin-2 der bereits für Claudin-1 beschriebene starke Rückgang der Markierungen nach erfolgter KHV-Infektion gegenüber den nicht infizierten Karpfen auf. Dieser betraf beide untersuchten Darmsegmente und war ab dem 2. Tag p.I. feststellbar. Eine Ausnahme hiervon stellten, wie bereits erläutert, die 15 Monate alten Karpfen dar, bei denen in beiden Darmsegmenten im Mittel zunächst ein Anstieg der Bindungsintensitäten zu verzeichnen war, bevor diese im weiteren Verlauf des Experimentes wieder zurückgingen und sich am 13. Tag p.I. jenen der nicht infizierten Karpfen annäherten.

Tabelle 15: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	1,5 (1,5)	0,0 (0)	1,5 (1,5)	0,0 (0)	1,5 (1,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	0,0 (0)	0,5 (0,5)	0,0 (0)	0,5 (0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,3 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,0 (0)
Enddarm	Kontrolle	1,4 (0-2)	2,8 (0-4)	1,1 (0-2)	2,6 (0-4)	0,6 (0-1)	0,6 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)
	Tag 2	0,5 (0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,3 (0,5)	0,3 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	0,1 (0-0,5)	0,5 (0-2)	0,0 (0)	0,4 (0-1,5)	0,0 (0)	0,3 (0-1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.

Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 16: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	1,0 (0-3)	0,0 (0)	1,0 (0-3)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	1,0 (0-2)	0,8 (0-2,5)	0,8 (0-2)	0,8 (0-1,5)	0,8 (0-2)	0,8 (0-1,5)	0,4 (0-1,5)	0,4 (0-1,5)	0,0 (0)
	Tag 8	0,7 (0-1)	0,2 (0-0,5)	0,7 (0-1)	0,2 (0-0,5)	0,7 (0-1)	0,2 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 13	0,9 (0-2)	0,8 (0-2)	1,1 (0-3,5)	0,8 (0-2)	0,8 (0-2)	0,8 (0-2)	0,4 (0-1,5)	0,4 (0-1,5)	0,0 (0)
Enddarm	Kontrolle	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,7 (0,5-1)	1,2 (1-1,5)	0,7 (0,5-1)	1,2 (1-1,5)	0,7 (0,5-1)	1,7 (1-2,5)	0,2 (0-0,5)	0,2 (0,0,5)	0,0 (0)
	Tag 8	1,5 (1-2)	1,5 (0,5-2,5)	1,1 (0,5-2)	1,5 (0,5-2,5)	1,1 (0,5-2)	1,5 (0,5-2,5)	0,6 (0-1,5)	0,4 (0-1)	0,0 (0)
	Tag 13	0,3 (0-0,5)	1,3 (0,5-2)	0,8 (0-1,5)	1,2 (0,5-2)	0,5 (0-1)	1,3 (0,5-2)	0,2 (0-0,5)	0,2 (0-0,5)	0,0 (0)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.

ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 17: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Claudin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,4 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	1,5 (0-3)	0,3 (0-0,5)	1,5 (0-3)	0,3 (0-0,5)	1,5 (0-3)	0,3 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,9 (0-2,5)	0,3 (0-0,5)	0,9 (0-2,5)	0,3 (0-0,5)	0,3 (0-1)	0,3 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 8	0,6 (0-1)	1,1 (0-3,5)	0,8 (0-1)	1,0 (0-3)	0,6 (0-1)	0,5 (0-1)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,0 (0)
	Tag 13	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,4 (0-1,5)	0,3 (0-1)	0,3 (0-1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
Enddarm	Kontrolle	0,1 (0-0,5)	0,2 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,2 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,2 (0-1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 2	0,3 (0-0,5)	1,9 (0-3)	0,3 (0-0,5)	1,9 (0-3)	0,3 (0-0,5)	2,3 (2-3)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	0,3 (0-0,5)	1,0 (0-2)	1,1 (0-3,5)	1,6 (0-3,5)	0,3 (0-0,5)	0,8 (0-2)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)
	Tag 8	0,4 (0-1)	0,6 (0-1)	0,4 (0-1)	0,8 (0-1,5)	0,4 (0-1)	0,8 (0-1,5)	0,4 (0-1)	0,4 (0-1)	0,0 (0)
	Tag 13	0,1 (0-0,5)	0,3 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,3 (0-1)	0,1 (0-0,5)	0,3 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,1 (0-0,5)	0,0 (0)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.

Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

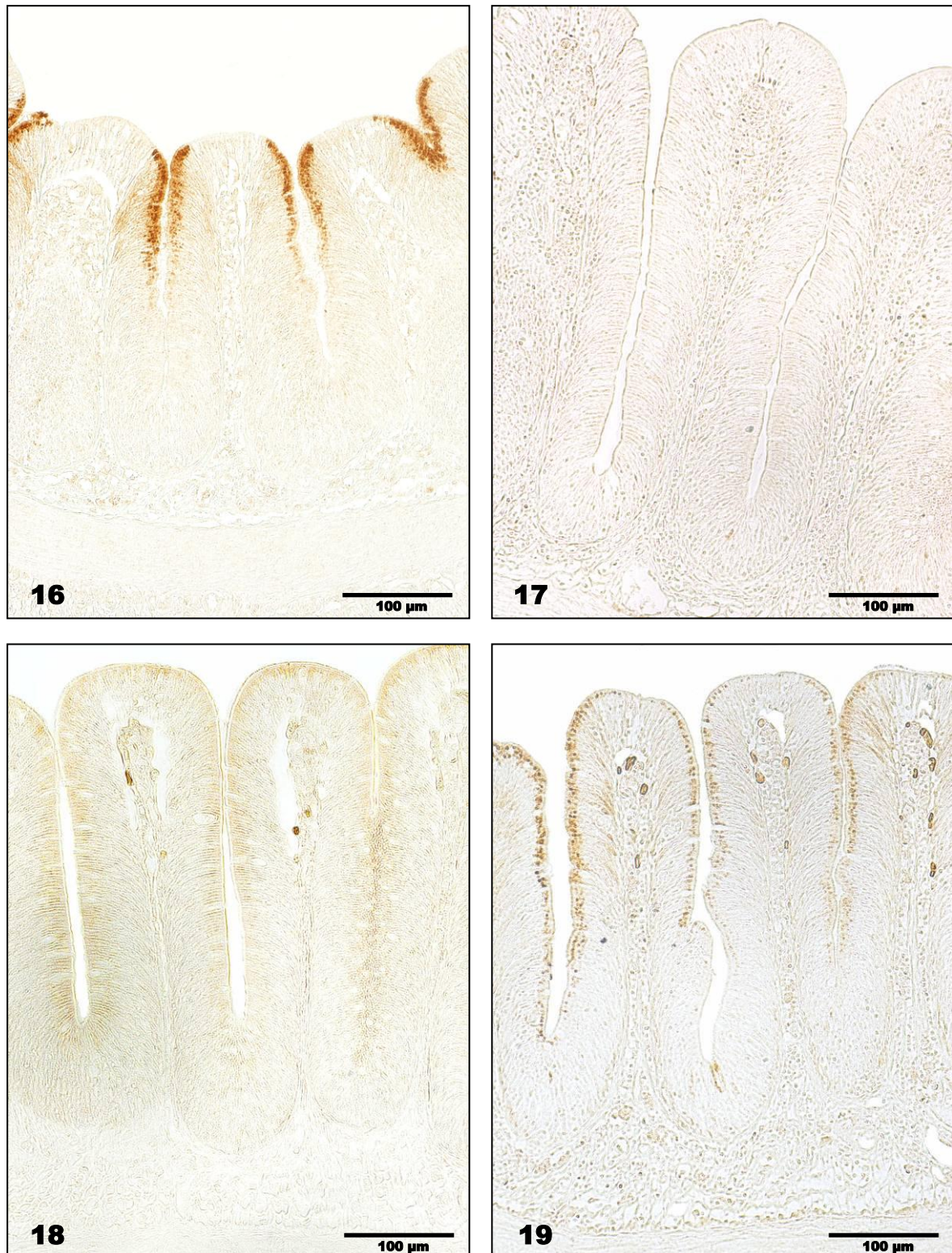


Abbildung 16-19: Bindungen des für humanes Claudin-2 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Mitteldarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV

Abb. 16: nicht infiziert Starke Markierungen der apikalen Enterozytenbereiche der distalen Faltenflanken

Abb. 17: 2. Tag p.I. Keine erkennbaren Markierungen

Abb. 18: 8. Tag p.I. Schwache Markierungen der apikalen Enterozytenbereiche

Abb. 19: 13. Tag p.I. Deutliche apikale Markierungen der Enterozyten der distalen Faltenflanken

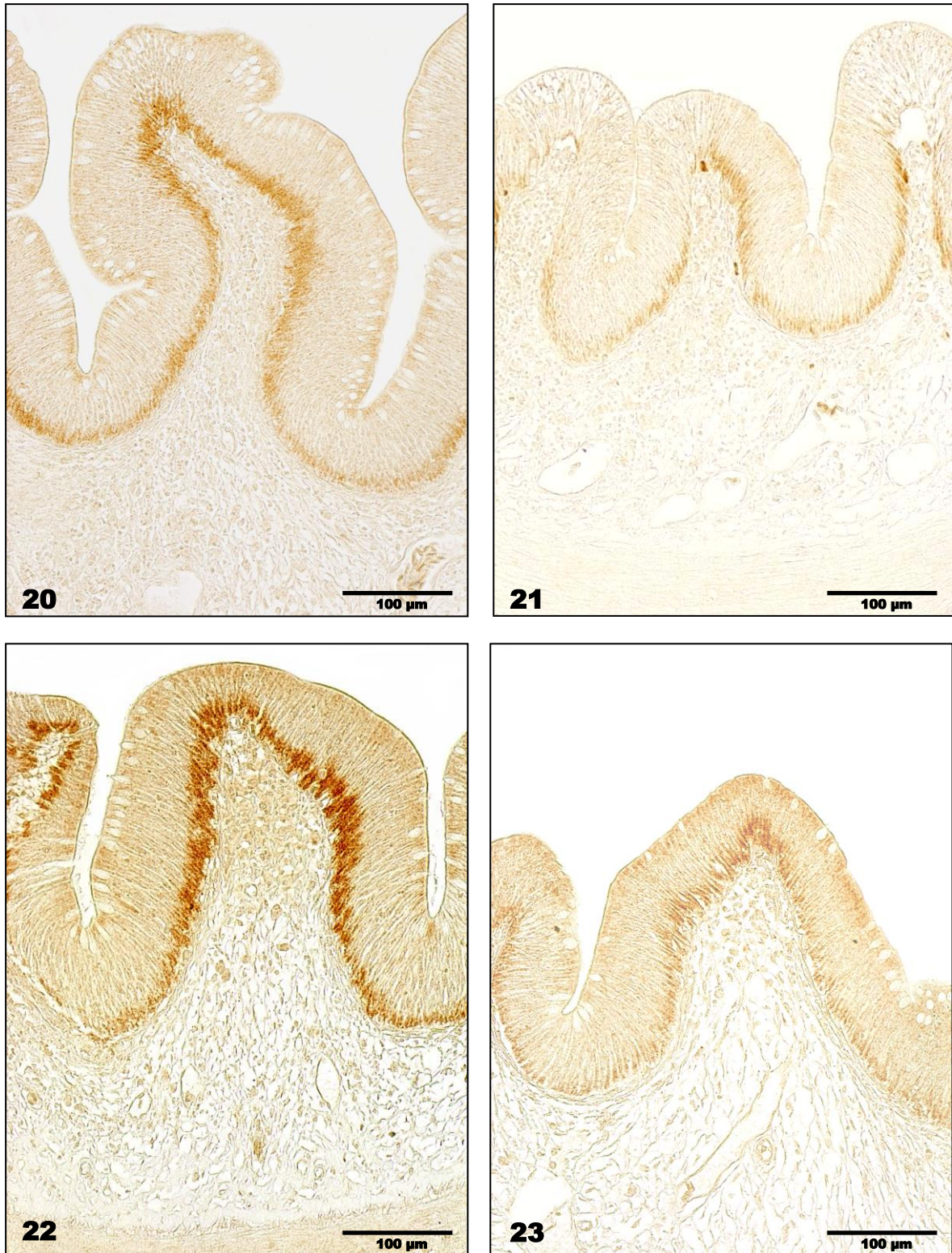


Abbildung 20-23: Bindungen des für humanes Claudin-2 spezifischen Antikörpers an Strukturen im Enddarmsegment von 10 Monate alten Karpfen unter Infektion mit KHV

Abb. 20: nicht infiziert Schwache bis mittlere Markierungen der basalen Enterozytenbereiche des gesamten Epithels, übrige Gewebereiche ohne Reaktionen

Abb. 21: 2. Tag p.I. Keine erkennbaren Markierungen

Abb. 22: 8. Tag p.I. Starke Markierungen der basalen Enterozytenbereiche des gesamten Epithels, schwache Markierung der übrigen Enterozytenzellwände

Abb. 23: 13. Tag p.I. Mittlere bis starke Markierungen der basalen und teilweise der apikalen Enterozytenbereiche, schwache Markierung der übrigen Enterozytenzellwände

3.4.3 Beta-Defensin-2

3.4.3.1 Bindung des für humanes Beta-Defensin-2 (hBD-2) spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm

Durch die für humanes Beta-Defensin-2 spezifischen Antikörper wurden Strukturen in nahezu allen am Aufbau der Darmwand beteiligten Zell- und Gewebetypen markiert. Dies schloss sowohl die Enterozyten des Epithels als auch die Zellen der Lamina propria, Lamina submucosa und Tunica muscularis mit ein, wobei in beiden untersuchten Darmsegmenten äquivalente Bindungsmuster und –intensitäten auftraten. In den Enterozyten war neben den etwas stärker markierten Zellwänden auch das Zytoplasma durchgängig gefärbt. In einigen Fällen waren die Enterozyten in ihren apikal gelegenen Bereichen intensiver markiert, insgesamt ergaben sich aber kaum Färbungsunterschiede zwischen apikalen und basalen Zellregionen. Auch bei der Betrachtung der Mucosafalten als Ganzes wies das Muster der Markierungen keinerlei erkennbare Unterschiede zwischen Falten spitze, Faltenflanke und Faltengrund auf. Waren Lamina propria, Lamina submucosa und Tunica muscularis bei den bereits beschriebenen Reaktionen von Claudin-1 und Claudin-2 (s. 3.4.1 und 3.4.2) ungefärbt, so konnten diese im Falle von Beta-Defensin-2 etwas schwächer oder aber in derselben Intensität markiert sein wie das Epithel; eine deutliche Markierung war für diese Gewebe aber in jedem Falle feststellbar (Tabellen 18-21, Abbildung 24+25). Besonders in der Lamina propria fielen dabei immer wieder stark markierte Zellen bzw. Zellgruppen auf. Wann immer die Schleimauflage erhalten blieb, zeichnete sich diese durch besonders starke Anfärbungen aus, welche vor allem bei den drei und 10 Monate alten Karpfen oft durch maximale Bindungsintensitäten im Bereich von 4 bis 5 zum Ausdruck kamen (Tabelle 19+20). Individuen mit erhalten gebliebener, aber ungefärbter Schleimauflage stellten die Ausnahme dar. Anders als Schleimauflage und Enterozyten blieben die zwischen letzteren gelegenen Becherzellen durchweg ungefärbt.

Eine altersabhängige Veränderung des Bindungsmusters der Antikörper war – im Gegensatz zu den Claudinen – nicht feststellbar. Ebenso traten keine Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Karpfen zutage. Nur im Falle der jüngsten, drei Monate alten Karpfen (Tabelle 19) war ein Rückgang der Markierungen bei den Individuen unter KHV-Infektion im Vergleich zu den nicht infizierten Karpfen (Tabelle 18) erkennbar, welcher in beiden Darmsegmenten über den gesamten Versuchsverlauf hinweg Bestand hatte. So verringerten sich die Bindungsintensitäten

von im Mittel 2,8 bis 4,3 in den Mittel- und Enddarmenterocyten der nicht infizierten Karpfen auf Werte von 1,0 bis 3,1 bei den Karpfen unter KHV-Infektion. Bei den 10 und 15 Monate alten Individuen war eine solche Reaktion nicht nachzuweisen.

Tabelle 18: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Versuch 1	4,0 (3-4,5)	2,9 (2-4)	3,7 (3-4)	3,0 (2-4)	3,4 (3-4,5)	3,3 (2-4,5)	2,8 (2-3,5)	2,6 (2-3,5)	4,2 (3-5)
	Versuch 2	2,8 (2,5-3)	2,5 (2-3)	2,7 (2,5-3)	2,3 (2-3)	2,7 (2,5-3)	2,3 (2-3)	2,8 (2-3,5)	1,8 (1,5-2,5)	2,3 (0-3,5)
	Versuch 3	2,9 (2,5-3,5)	2,4 (2-3)	2,7 (2,5-3)	2,4 (2-3)	2,8 (2,5-3)	2,4 (2-3)	2,3 (2-2,5)	1,8 (1,5-2,5)	3,5 (2-4)
Enddarm	Versuch 1	4,3 (3,5-5)	3,1 (3-3,5)	3,3 (3-4)	3,0 (3)	3,3 (3-4)	3,1 (3-3,5)	2,9 (2,5-3)	2,8 (2,5-3)	4,8 (4-5)
	Versuch 2	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	4,0 (4)
	Versuch 3	2,6 (2-3,5)	2,2 (1,5-3)	2,5 (2-3,5)	2,2 (1,5-3)	2,3 (2-3)	2,2 (1,5-3)	2,2 (1,5-3)	1,8 (1,5-2)	2,2 (0-4)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.

Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 19: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	4,0 (3-4,5)	2,9 (2-4)	3,7 (3-4)	3,0 (2-4)	3,4 (3-4,5)	3,3 (2-4,5)	2,8 (2-3,5)	2,6 (2-3,5)	4,2 (3-5)
	Tag 2	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)	1,0 (1)
	Tag 5	3,0 (3)	2,0 (1-3)	3,0 (3)	2,0 (1-3)	2,0 (1-3)	2,0 (1-3)	1,8 (0,5-3)	1,0 (0,5-1,5)	4,8 (4,5-5)
	Tag 13	2,7 (1,5-4,5)	2,0 (1,5-3)	2,0 (1,5-3)	2,0 (1,5-3)	2,5 (1,5-3)	2,0 (1,5-3)	2,3 (1,5-3)	2,0 (1-3)	4,3 (3,5-5)
Enddarm	Kontrolle	4,3 (3,5-5)	3,1 (3-3,5)	3,3 (3-4)	3,0 (3)	3,3 (3-4)	3,1 (3-3,5)	2,9 (2,5-3)	2,8 (2,5-3)	4,8 (4-5)
	Tag 2	1,5 (1,5)	1,0 (1)	2,5 (2,5)	1,0 (1)	3,0 (3)	1,0 (1)	0,0 (0)	0,0 (0)	0,0 (0)
	Tag 5	2,5 (2,5)	1,0 (1)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	1,0 (1)	1,0 (1)	4,0 (4)
	Tag 13	3,1 (2-3,5)	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)	2,6 (2-3)	2,5 (2-3)	2,4 (2-2,5)	1,9 (1,5-2)	3,4 (2-4,5)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.

Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 20: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	2,8 (2,5-3)	2,5 (2-3)	2,7 (2,5-3)	2,3 (2-3)	2,7 (2,5-3)	2,3 (2-3)	2,8 (2-3,5)	1,8 (1,5-2,5)	2,3 (0-3,5)
	Tag 2	3,2 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,2 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,2 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,0 (3)	2,2 (2-2,5)	4,3 (4-4,5)
	Tag 5	3,2 (3-3,5)	2,7 (2-3)	2,8 (2,5-3)	2,7 (2-3)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2-3,5)	2,3 (2-2,5)	2,2 (2-2,5)	2,5 (0-4)
	Tag 8	3,0 (3)	2,3 (2-2,5)	2,5 (2-3)	2,3 (2-2,5)	2,5 (2-3)	2,3 (2-2,5)	2,0 (2)	1,5 (1,5)	4,3 (4-4,5)
	Tag 13	3,3 (3-3,5)	2,5 (2,5)	3,0 (3)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	3,8 (3,5-4)
Enddarm	Kontrolle	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	4,0 (4)
	Tag 2	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	4,0 (4)
	Tag 5	2,8 (2,5-3)	2,5 (2,5)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2,5)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	1,8 (1,5-2)	3,3 (3-3,5)
	Tag 8	3,5 (3,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	3,0 (3,0)	3,0 (3,0)	2,5 (2,5)	3,5 (3,5)
	Tag 13	3,5 (3,5)	3,0 (3)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2-3)	3,0 (2,5-3,5)	2,5 (2,5)	3,8 (3,5-4)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.

Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 21: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-2 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	2,9 (2,5-3,5)	2,4 (2-3)	2,7 (2,5-3)	2,4 (2-3)	2,8 (2,5-3)	2,4 (2-3)	2,3 (2-2,5)	1,8 (1,5-2,5)	3,5 (2-4)
	Tag 2	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	3,0 (3)	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	-
	Tag 5	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	2,0 (2)	2,0 (2)	1,5 (1,5)	1,5 (1,5)	-
	Tag 8	2,8 (2,5-3)	2,3 (1,5-3)	2,3 (2-2,5)	2,5 (2,5)	2,3 (2-2,5)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	1,5 (1,5)	-
	Tag 13	2,4 (2-2,5)	2,4 (2-2,5)	2,4 (2-2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,6 (2,5-3)	2,1 (2-2,5)	1,8 (1-2,5)	-
Enddarm	Kontrolle	2,6 (2-3,5)	2,2 (1,5-3)	2,5 (2-3,5)	2,2 (1,5-3)	2,3 (2-3)	2,2 (1,5-3)	2,2 (1,5-3)	1,8 (1,5-2)	2,2 (0-4)
	Tag 2	3,0 (3)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	3,0 (3)	2,0 (2)	1,5 (1,5)	-
	Tag 5	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	2,0 (2)	-
	Tag 8	3,0 (2,5-3,5)	2,3 (1,5-3)	2,5 (2,5)	2,3 (2-2,5)	2,3 (2-2,5)	2,8 (2,5-3)	2,3 (2-2,5)	1,8 (1,5-2)	-
	Tag 13	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	3,5 (3,5)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.

Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

3.4.4 Beta-Defensin-3

3.4.4.1 Bindung des für humanes Beta-Defensin-3 (hBD-3) spezifischen Antikörpers an Strukturen im Karpfendarm

Das Muster und die Intensitäten der Antikörperbindungen, wie sie für Beta-Defensin-3 festgestellt wurden, unterschieden sich nicht wesentlich von denen der Antikörper für Beta-Defensin-2. So waren auch hier keine Unterschiede zwischen den untersuchten Darmsegmenten feststellbar. Die Enterozyten wiesen ebenfalls ein deutlich gefärbtes Zytoplasma und etwas intensiver markierte Zellwände auf, wobei die Antikörper für Beta-Defensin-3 in nahezu allen untersuchten Gewebeproben etwas stärker an Strukturen im apikalen als im basalen Bereich der Enterozyten banden (Abbildung 26+27). Wie aus den Tabellen 22-25 hervorgeht, betraf dies alle Epithelbereiche (Faltenspitze, Faltenflanke und Faltengrund) beider Darmsegmente in allen untersuchten Altersgruppen, so dass sich auch die jeweiligen Epithelbereiche im Muster ihrer Antikörperbindungen nicht voneinander unterschieden. Die Antikörperbindungen in der Schleimauflage waren auch für Beta-Defensin-3 stärker als in den übrigen Gewebebereichen. Hier wurden sowohl bei den nicht infizierten, als auch bei den Karpfen unter Einfluss der KHV-Infektion Bindungsintensitäten bis 5,0 erreicht, wobei wiederum nur vereinzelt Individuen mit ungefärbter Schleimauflage auftraten. Die Zellwände und der Inhalt der Becherzellen blieben wie bei Beta-Defensin-2 ungefärbt. Lamina propria, Lamina submucosa und Tunica muscularis wiesen Markierungen gleicher Intensität wie das Epithel auf, wiederum mit einer besonders starken Anfärbung einzelner Zellen bzw. Zellgruppen in der Lamina propria und Lamina submucosa.

Ein Vergleich der nicht infizierten Karpfen deutete geringe Unterschiede der Bindungsintensitäten zwischen den jeweiligen Altersklassen an. So war in beiden Darmsegmenten in allen Bereichen des Epithels ein Rückgang der Bindungsintensitäten von den drei Monate alten bis zu den 15 Monate alten Individuen feststellbar (Tabelle 25). Die bindegewebigen Anteile folgten diesem Verlauf dagegen nicht einheitlich. Auch bei den Karpfen unter KHV-Infektion fanden sich altersbezogene Unterschiede zwischen den Bindungsintensitäten, während bei den jüngsten, drei Monate alten Individuen mit Intensitäten zwischen 3,0 und 4,5 im Mittel die intensivsten Markierungen auftraten (Tabelle 23), konnten bei den 10 (Tabelle 24) und 15 (Tabelle 25) Monate alten Karpfen mit Bindungsintensitäten zwischen 2,0 und 3,5, die nur in Ausnahmefällen überschritten wurden, in beiden

Darmsegmenten schwächere Markierungen nachgewiesen werden. Auffällig war bei allen Altersgruppen ein unter KHV-Infektion auftretender, leichter bis deutlicher Anstieg der Bindungsintensitäten am 2. Tag p.I. gegenüber den nicht infizierten Karpfen. Diese höheren Bindungsintensitäten blieben daraufhin mit kleineren Abweichungen bis zum Versuchsende konstant. Der beschriebene Anstieg war in beiden Darmsegmenten feststellbar und betraf alle untersuchten Epithelbereiche. Die einzige Ausnahme bildete das Enddarmsegment der 10 Monate alten Karpfen, in welchem ein leichter Rückgang der Bindungsintensitäten im Vergleich zu den nicht infizierten Karpfen auffiel. Schleimauflage und Bindegewebe reagierten in beiden Darmsegmenten und bei allen drei Altersgruppen unregelmäßig, wobei in der Schleimauflage durchgehend die bereits erwähnten höchsten Bindungsintensitäten zu verzeichnen waren.

Tabelle 22: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Versuch 1	3,6 (3-4,5)	2,7 (2-3)	3,1 (3-3,5)	2,7 (2-3)	3,1 (3-3,5)	2,7 (2-3)	2,6 (2-3)	2,2 (1,5-2,5)	3,0 (0-5)
	Versuch 2	2,6 (2-3)	2,4 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	2,4 (2-3)	2,6 (2-3)	2,5 (2-3,5)	2,3 (2-3)	1,8 (1,5-2,5)	4,0 (3-4,5)
	Versuch 3	2,5 (2,5)	2,0 (2)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,5 (3,5)
Enddarm	Versuch 1	3,5 (3-4,5)	3,2 (3-4)	3,3 (3-3,5)	3,2 (3-4)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-4)	2,9 (2,5-3)	2,5 (2,5)	4,5 (4-5)
	Versuch 2	3,3 (3,0-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	3,2 (3,0-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,0 (3)	2,7 (2,5-3)	2,7 (2-3)	2,2 (2-2,5)	4,0 (3,5-4)
	Versuch 3	3,2 (3-3,5)	2,2 (2-2,5)	3,0 (3)	2,2 (2-2,5)	3,0 (3)	2,2 (2-2,5)	2,3 (2-2,5)	2,2 (2-2,5)	3,7 (3,5-4)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 23: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	3,6 (3-4,5)	2,7 (2-3)	3,1 (3-3,5)	2,7 (2-3)	3,1 (3-3,5)	2,7 (2-3)	2,6 (2-3)	2,2 (1,5-2,5)	3,0 (0-5)
	Tag 2	4,3 (4-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,3 (4-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,3 (4-4,5)	4,0 (3,5-4,5)	3,5 (3,5)	3,0 (2,5-3,5)	2,5 (0-5)
	Tag 5	4,5 (4,5)	4,0 (4)	4,5 (4)	4,0 (4)	4,5 (4,5)	4,0 (4)	3,0 (3)	3,0 (3)	5,0 (5)
	Tag 13	4,3 (4-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,2 (3,4-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,2 (3,5-4,5)	4,0 (3-4,5)	3,3 (2,5-4)	2,8 (2,5-3,5)	3,3 (0-5)
Enddarm	Kontrolle	3,5 (3-4,5)	3,2 (3-4)	3,3 (3-3,5)	3,2 (3-4)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-4)	2,9 (2,5-3)	2,5 (2,5)	4,5 (4-5)
	Tag 2	4,3 (4-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,3 (4-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,3 (4-4,5)	4,0 (3,5-4,5)	3,5 (3,5)	3,0 (2,5-3,5)	2,5 (0-5)
	Tag 5	4,5 (4,5)	4,0 (4)	4,5 (4,5)	4,0 (4)	4,5 (4,5)	4,5 (4,5)	4,0 (4)	3,5 (3,5)	5,0 (5)
	Tag 13	4,3 (4-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,2 (3,5-4,5)	3,8 (3,5-4)	4,2 (3,5-4,5)	4,0 (3-4,5)	3,3 (2,5-4)	2,8 (2,5-3,5)	3,3 (0-5)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 24: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	2,6 (2-3)	2,4 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	2,4 (2-3)	2,6 (2-3)	2,5 (2-3,5)	2,3 (2-3)	1,8 (1,5-2,5)	4,0 (3-4,5)
	Tag 2	3,5 (3,5)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	4,8 (4,5-5)
	Tag 5	2,8 (2,5-3,5)	2,3 (2-3)	3,0 (2,5-3,5)	2,3 (2-3)	2,8 (2,5-3,5)	2,7 (2,5-3)	2,3 (2-3)	1,7 (1,5-2)	2,3 (0-4)
	Tag 8	3,5 (3,5)	3,5 (3,5)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	2,0 (2)	4,5 (4,5)
	Tag 13	3,3 (3-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,0 (2,5-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	2,0 (2,0)	4,0 (3,5-4,5)
Enddarm	Kontrolle	3,3 (3,0-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	3,2 (3,0-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,0 (3)	2,7 (2,5-3)	2,7 (2-3)	2,2 (2-2,5)	4,0 (3,5-4)
	Tag 2	3,3 (3-3,5)	2,5 (2-3)	3,0 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	2,8 (2,5-3)	2,3 (2-2,5)	2,0 (1,5-2,5)	1,5 (1-2)	4,0 (3,5-4,5)
	Tag 5	3,1 (3-3,5)	2,9 (2,5-3,5)	3,0 (3)	2,9 (2,5-3,5)	3,1 (3-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	2,1 (1,5-2,5)	3,6 (3-4)
	Tag 8	3,3 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,3 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,2 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	2,5 (2-3)	2,0 (1,5-2,5)	3,7 (3-4,5)
	Tag 13	2,3 (2-2,5)	2,3 (2-2,5)	2,3 (2-2,5)	2,3 (2-2,5)	2,0 (2)	2,5 (2,5)	1,8 (1,5-2)	1,5 (1,5)	3,8 (3,5-4)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 25: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Beta-Defensin-3 an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	2,5 (2,5)	2,0 (2)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,5 (3,5)
	Tag 2	2,8 (2,5-3)	2,5 (2-3)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2-3)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2-3)	2,2 (2-2,5)	1,8 (1,5-2,5)	3,3 (3-3,5)
	Tag 5	3,0 (2,5-3,5)	1,8 (1,5-2)	2,8 (2,5-3)	1,8 (1,5-2)	2,8 (2,5-3)	1,8 (1,5-2)	1,8 (1,5-2)	1,5 (1,5)	3,5 (3,5)
	Tag 8	3,2 (3-3,5)	2,3 (2-2,5)	3,2 (3-3,5)	2,3 (2-2,5)	3,2 (3-3,5)	2,5 (2,5)	3,0 (2,5-3)	2,7 (2,5-3)	3,8 (3,5-4)
	Tag 13	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,3 (3-3,5)	2,5 (2,5)	4,3 (4-4,5)
Enddarm	Kontrolle	3,2 (3-3,5)	2,2 (2-2,5)	3,0 (3)	2,2 (2-2,5)	3,0 (3)	2,2 (2-2,5)	2,3 (2-2,5)	2,2 (2-2,5)	3,7 (3,5-4)
	Tag 2	3,8 (3,5-4)	2,8 (2,5-3)	3,5 (3,5)	2,8 (2,5-3)	3,3 (3-3,5)	2,5 (2,5)	2,8 (2,5-3)	2,0 (2)	4,0 (3,5-4,5)
	Tag 5	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	3,5 (3,5)
	Tag 8	3,7 (3,5-4)	2,7 (2,5-3)	3,3 (2,5-4)	2,7 (2,5-3)	3,0 (2,5-3,5)	2,5 (2,5)	2,7 (2,5-3)	2,5 (2-3)	4,2 (4-4,5)
	Tag 13	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,2 (3-3,5)	3,0 (3)	3,2 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	1,3 (0-4)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

3.4.5 Lysozym

3.4.5.1 Bindung des Antikörpers spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm

Der für Lysozym spezifische Antikörper band wie die zuvor besprochenen Defensine an Strukturen sowohl im Epithel der untersuchten Darmsegmente als auch in deren Bindegewebsanteilen und in der Muskulatur. Im Epithel wurden sowohl Zellwände als auch Zytoplasma der Enterozyten markiert, wobei deren apikal gelegenen Bereiche zumeist etwas intensivere Markierungen aufwiesen als die übrigen Zellregionen. Lamina propria und Lamina submucosa reagierten individuell verschieden und waren entweder gleich stark oder etwas schwächer gefärbt als das Epithel. Häufig waren hier jedoch stark markierte granulär erscheinende Zellen anzutreffen, welche bisweilen auch verstreut im Epithel auftraten. Die ebenfalls hier befindlichen Becherzellen konnten entweder völlig ohne Markierung oder aber sehr stark markiert sein. Auffällig ist auch beim Lysozym-spezifischen Antikörper die besonders starke Anfärbung der Schleimauflage, welche sich in ihrer Intensität deutlich von jener der zellulären Anteile der Mucosafalten abhob (Tabellen 26-29). Die Bindungsmuster und -intensitäten der jeweiligen Epithelbereiche der Mucosafalten unterschieden sich dagegen nicht oder nur geringfügig voneinander, ebenso zeigte auch der Vergleich der beiden Darmsegmente keine Unterschiede auf.

Eine altersabhängige, gerichtete Entwicklung der Bindungsintensitäten, wie sie für einige der vorangehend beschriebenen Antikörperreaktionen gezeigt werden konnte, trat im Falle von Lysozym weder bei den nicht infizierten Karpfen (Tabelle 26) noch bei den Karpfen unter KHV-Infektion auf, allerdings war im Faltenepithel beider Darmsegmente ein Anstieg der Bindungsintensitäten am 2. Tag p.I feststellbar. Dieser Anstieg trat in unterschiedlicher Deutlichkeit bei allen Altersgruppen auf, Ausnahmen bildeten nur die Falten spitzen in den Mitteldarmsegmenten der 3 Monate alten Individuen sowie das Epithel der Enddarmsegmente der 10 Monate alten Karpfen. Lamina propria und Lamina submucosa zeigten keine derartigen Tendenzen und wiesen Bindungen unregelmäßiger Intensität auf. Die Schleimauflage blieb unabhängig vom Infektionszustand durchgehend sehr stark gefärbt.

Tabelle 26: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm, Kontrollfische

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Versuch 1	3,8 (3-4,5)	2,8 (2,5-3,5)	3,3 (3-4)	2,7 (2-3,5)	3,1 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	2,6 (2-4)	2,4 (2-4)	4,6 (3,5-5)
	Versuch 2	3,4 (3-4,5)	2,9 (2,5-4)	3,1 (2,5-4)	2,8 (2,5-3,5)	3,1 (2,5-4)	2,9 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	1,9 (1,5-2,5)	3,1 (3,5-5)
	Versuch 3	3,0 (2,5-3,5)	2,4 (2-3)	2,7 (2-3,5)	2,3 (2-2,5)	2,6 (2-3)	2,4 (2-3)	2,6 (2,5-3)	2,7 (2,5-3)	3,6 (3-4)
Enddarm	Versuch 1	2,9 (2-3,5)	2,7 (1,5-3)	2,9 (2-3,5)	2,9 (1,5-2,5)	2,8 (1,5-3)	2,9 (1,5-3,5)	2,4 (2-2,5)	1,7 (0,5-2)	4,3 (4-4,5)
	Versuch 2	3,5 (2,5-4,5)	3,3 (2,5-4)	3,5 (2,5-4,5)	3,3 (2,5-4)	3,5 (2,5-4,5)	3,3 (2,5-4)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	4,5 (4,5)
	Versuch 3	3,1 (3-3,5)	2,5 (2,5)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2,5)	2,6 (2,5-3)	2,7 (2,5-3)	2,8 (2,5-3,5)	2,2 (2-2,5)	3,6 (3,5-4)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
 Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 27: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 1

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	3,8 (3-4,5)	2,8 (2,5-3,5)	3,3 (3-4)	2,7 (2-3,5)	3,1 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	2,6 (2-4)	2,4 (2-4)	4,6 (3,5-5)
	Tag 2	2,0 (0-4)	1,8 (0-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,0 (3)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	2,3 (2-2,5)	4,5 (4,5)
	Tag 5	3,8 (3,5-4)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	4,5 (4-5)
	Tag 13	3,8 (3,5-4,5)	3,5 (3-4)	3,5 (3,5)	3,4 (3-3,5)	3,5 (3,5)	3,4 (3-3,5)	2,9 (2,5-3,5)	2,6 (2-3,5)	4,6 (4,5-5)
Enddarm	Kontrolle	2,9 (2-3,5)	2,7 (1,5-3)	2,9 (2-3,5)	2,9 (1,5-2,5)	2,8 (1,5-3)	2,9 (1,5-3,5)	2,4 (2-2,5)	1,7 (0,5-2)	4,3 (4-4,5)
	Tag 2	3,5 (3,5)	3,5 (3,5)	3,5 (3,5)	3,5 (3,5)	3,5 (3,5)	3,5 (3,5)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	3,5 (3,5)
	Tag 5	3,8 (3,5-4)	3,0 (3)	3,5 (3,5)	3,0 (3)	3,3 (3-3,5)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,8 (2,5-3)	3,8 (3,5-4)
	Tag 13	3,6 (3-4,5)	3,0 (3)	3,3 (3-3,5)	2,9 (2,5-3)	3,3 (3-3,5)	3,3 (2,5-4,5)	2,9 (2,5-3)	2,5 (2-3)	4,3 (3,5-4,5)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
 Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 28: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 2

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	3,4 (3-4,5)	2,9 (2,5-4)	3,1 (2,5-4)	2,8 (2,5-3,5)	3,1 (2,5-4)	2,9 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	1,9 (1,5-2,5)	4,2 (3,5-5)
	Tag 2	3,8 (3-4,5)	3,3 (3-3,5)	3,8 (3-4,5)	3,3 (3-3,5)	3,8 (3-4,5)	3,3 (3-3,5)	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	4,3 (4-4,5)
	Tag 5	3,3 (2,5-4,5)	2,7 (2,5-3)	2,8 (2,5-3,5)	2,7 (2,5-3)	2,8 (2,5-3,5)	3,0 (3)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	5,0 (5)
	Tag 8	3,3 (3-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	3,2 (2,5-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	2,7 (1,5-3,5)	1,8 (1,5-2)	3,8 (3-4,5)
	Tag 13	3,2 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	2,8 (2,5-3)	2,7 (2,5-3)	2,7 (2,5-3)	2,8 (2,5-3,5)	2,5 (2,5)	1,8 (1,5-2)	5,0 (5)
Enddarm	Kontrolle	3,5 (2,5-4,5)	3,3 (2,5-4)	3,5 (2,5-4,5)	3,3 (2,5-4)	3,5 (2,5-4,5)	3,3 (2,5-4)	2,5 (2,5)	2,0 (2)	4,5 (4,5)
	Tag 2	3,8 (3-4,5)	3,3 (2,5-4)	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,5 (2-3)	2,3 (1,5-3)	4,0 (3,5-4,5)
	Tag 5	2,9 (2,5-3)	2,5 (2-3)	2,6 (2,5-3)	2,8 (2-3)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	2,5 (2-3)	2,1 (2-2,5)	4,0 (3-4,5)
	Tag 8	3,5 (2,5-4,5)	3,3 (3-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	3,3 (3-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	3,0 (2,5-3,5)	4,5 (4,5)
	Tag 13	3,0 (3)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,0 (2)	1,5 (1,5)	5,0 (5)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

Tabelle 29: Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes Lysozym an Strukturen im Karpfendarm, Versuch 3

Darmabschnitt	Probennahme	Lokalisation								
		Faltenspitze ap.	Faltenspitze bs.	Faltenflanke ap.	Faltenflanke bs.	Faltengrund ap.	Faltengrund bs.	L. propria	L. submucosa	Schleim
Mitteldarm	Kontrolle	3,0 (2,5-3,5)	2,4 (2-3)	2,7 (2-3,5)	2,3 (2-2,5)	2,6 (2-3)	2,4 (2-3)	2,6 (2,5-3)	2,7 (2,5-3)	3,6 (3-4)
	Tag 2	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,3 (3-3,5)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	3,3 (3-3,5)	2,5 (2,5)	2,3 (2-2,5)	4,0 (3,5-4,5)
	Tag 5	3 (3)	2,5 (2,5)	3 (3)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)
	Tag 8	3 (3)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	3 (3)	2 (2)	1,5 (1,5)	4 (4)
	Tag 13	3,2 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	2,8 (2,5-3,5)	2,5 (2-3)	3,0 (3)	3,3 (3-3,5)	2,5 (2-3)	2,2 (1,5-2,5)	3,3 (2-5)
Enddarm	Kontrolle	3,1 (3-3,5)	2,5 (2,5)	2,8 (2,5-3)	2,5 (2,5)	2,6 (2,5-3)	2,7 (2,5-3)	2,8 (2,5-3,5)	2,2 (2-2,5)	3,6 (3,5-4)
	Tag 2	3,5 (3,5)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	3 (3)	2,5 (2,5)	2 (2)	4,5 (4,5)
	Tag 5	3 (3)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	3 (3)	2,5 (2,5)	1,5 (1,5)	3,5 (3,5)
	Tag 8	3,2 (3-3,5)	2,5 (2-3)	3,2 (3-3,5)	2,5 (2-3)	2,8 (2,5-3)	3,2 (3-3,5)	2,7 (2,5-3)	1,8 (1,5-2,5)	4,0 (3,5-4,5)
	Tag 13	3,3 (3-3,5)	2,5 (2,5)	3,0 (3)	2,8 (2,5-3)	2,8 (2,5-3)	3,0 (3)	3,0 (3)	2,8 (2,5-3)	3,5 (3,5)

Angegeben sind die Mittelwerte Gruppen von jeweils vier Individuen. Werte in Klammern entsprechen Minimal- und Maximalwerten.
Ap. = apikal; bs. = basal, L. = Lamina

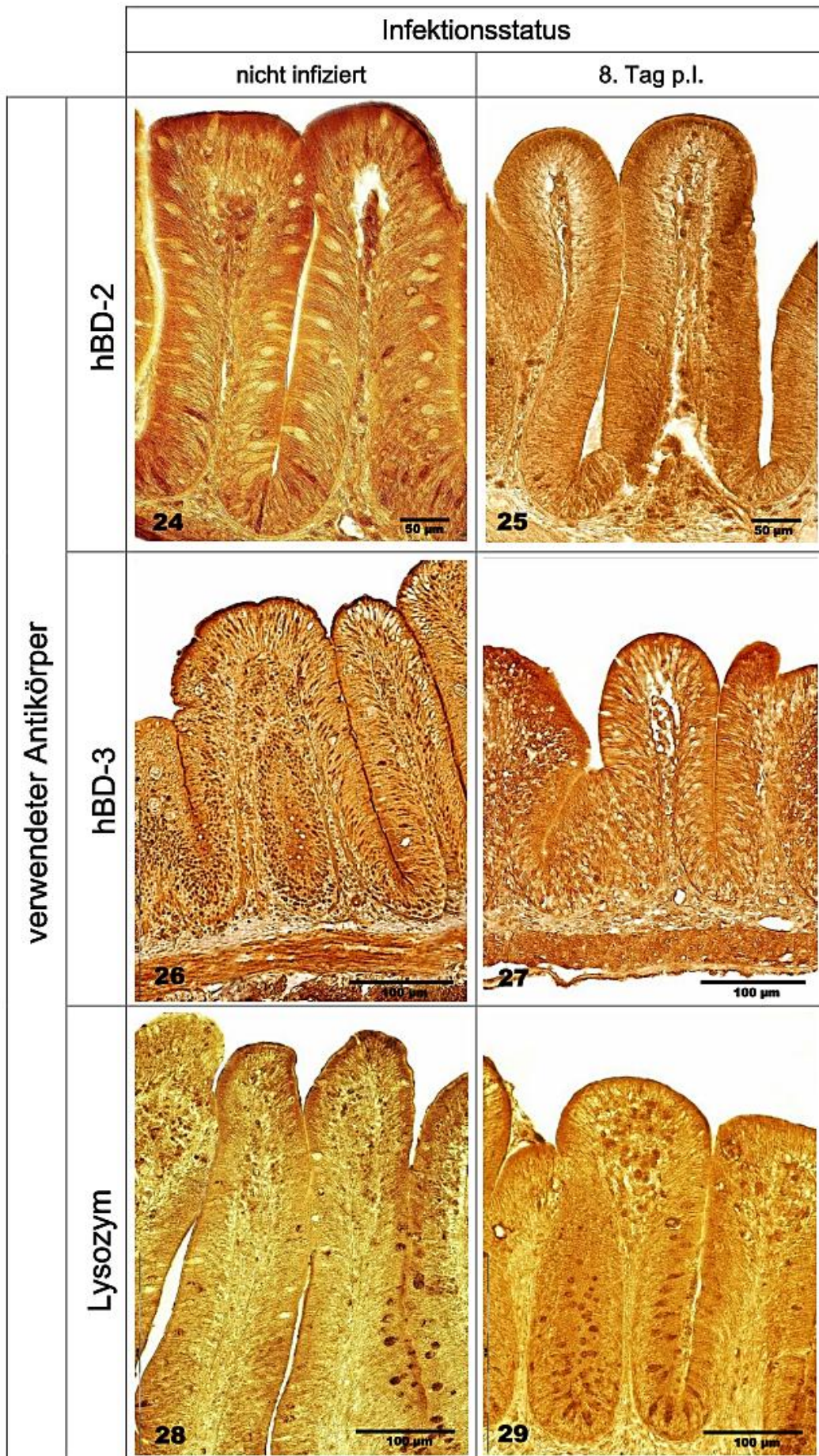


Abbildung 24-29: Bindungen der für humanes hBD-2, hBD-3 und Lysozym spezifischen Antikörper an Strukturen im Mitteldarmsegment von 10 Monate alten Karpfen

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde die Funktionalität der gastrointestinalen Immunbarriere des Karpfens im Hinblick auf Veränderungen in der Expression transmembranärer und antimikrobieller Proteine unter dem Einfluss einer Infektion mit dem Koi-Herpesvirus untersucht. Dieses Virus, welches in betroffenen Beständen hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten verursacht, dringt über die Haut in den Fisch ein (Costes et al., 2009). Im Zusammenhang mit der KHV-Infektion kommt es zu einer Zunahme von Infektionen mit sekundären Krankheitserregern (Bakterien, Parasiten), was vermuten lässt, dass unter dem Einfluß der Infektion auch die Immunbarriere der Tunica mucosa geschädigt wird. Aus diesem Grunde lag der Forschungsschwerpunkt in der vorliegenden Arbeit speziell auf solchen Proteinen, welche potentiell an der Immunbarriere des Darmes beteiligt sind. Bei Säugern spielen hierunter die konstitutiv oder induziert exprimierte antimikrobiellen Peptide eine wichtige Rolle als erste Verteidigungsinstanz der angeborenen (unspezifischen) Immunabwehr gegen das Eindringen von Pathogenen. Einen weiteren Bestandteil stellen die transmembranären Proteine dar, welche den Zusammenschluss des Epithelverbandes gewährleisten und eine wichtige Funktion bei der selektiven Kontrolle des parazellulären Transportes ausüben. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass eine vergleichbare Barrierefunktion auch bei Fischen vorliegt, wobei die einzelnen zellulären und molekularen Komponenten bei dieser großen Vertebratengruppe bisher nur wenig erforscht sind (DICKERSON, 2009). Die eigenen Untersuchungen konnten die Existenz einer solchen Immunbarriere bei den modernen Teleostei experimentell bestätigen. So waren immunhistochemisch Reaktionen von Antikörpern gegen die antimikrobiell wirkenden Peptide humanes Lysozym, humanes β -Defensin-2 (hBD-2) und humanes β -Defensin-3 (hBD-3) mit Strukturen im Karpfendarm nachzuweisen. Auch Antikörper gegen die Transmembranproteine humanes Claudin-1 und humanes Claudin-2 erbrachten deutliche Reaktionen im Darmgewebe. In Ermangelung fisch-spezifischer Antikörper musste für die Untersuchung der Expression auf entsprechende Säugerproteine zurückgegriffen werden. Dennoch war jeweils eine Reaktivität beobachtbar, welche zudem an solchen Stellen auftrat, an denen bei Säugern die zu markierenden Moleküle zu erwarten wären. Bei den antimikrobiellen Peptiden Lysozym, hBD-2 und hBD-3 betrifft dies vor allem Lokalisationen in der Schleimauflage, die Antikörper

gegen Claudin-1 und Claudin-2 reagierten primär mit Strukturen in der Zellmembran der Enterozyten. Untersuchungen der jüngeren Vergangenheit konnte die Existenz der in der vorliegenden Studie untersuchten Proteine bei Fischen auch molekularbiologisch bestätigen (LOH et al., 2004). Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen werden im Folgenden im Zuge der Besprechung der einzelnen Antikörperreaktionen ausführlich diskutiert.

Zur Bereitstellung von Darmgewebe KHV-infizierter Karpfen war zunächst eine künstliche Infektion von Versuchskarpfen notwendig. Hierfür wurde zellkulturbasierte Virussuspension direkt in das Mitteldarmlumen gegeben. Bereits nach zwei Tagen war das Virusgenom in den verschiedenen daraufhin untersuchten Organen nachweisbar. Diese Befunde bestätigen zum einen, dass ein Eintritt des Virus über den Darm generell möglich ist, zum anderen unterstreichen sie dessen schnelle systemische Ausbreitung, was auch in vorangegangenen Untersuchungen aufgezeigt werden konnte (GILAD et al., 2004). Erste äußerliche Reaktionen auf die Infektion, verbunden mit beginnenden epithelialen Veränderungen auf zellulärer Ebene, zeigten sich bei den drei Monate alten Karpfen ebenfalls bereits nach zwei Tagen. Diesem Zeitpunkt entsprachen die histopathologischen Befunde im infizierten Darmgewebe, wo sich vor allem bei den drei Monate alten Tieren deutliche Epithelschäden entwickelten. Bei den 10 und 15 Monate alten Karpfen waren diese Veränderungen dagegen geringgradiger ausgeprägt. Die stärksten Veränderungen traten aber in allen Altersgruppen ab dem 5. Tag p.I. auf, wobei die histopathologischen Veränderungen nicht mehr nur Schädigungen des Epithelgewebes, sondern nun auch vermehrt Umstrukturierungen in Lamina propria und Lamina submucosa einschlossen. Dieser Zeitpunkt des Auftretens der stärksten histopathologischen Veränderungen fällt zusammen mit einer deutlichen Verschlechterung des Allgemeinzustandes und einer Verstärkung der Krankheitssymptome bei den Versuchskarpfen sowie mit dem Einsetzen der ersten zytopathologischen Effekte in der Zellkultur (4. und 5. Tag p.I.). Auch wenn bei den älteren, 10 und 15 Monate alten Versuchskarpfen keine äußere Symptomatik mehr festgestellt werden konnte, so sprechen doch die weitgehend identischen histopathologischen Befunde des Darmgewebes aller Altersgruppen dafür, dass die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt bereits in ihre schwerste Verlaufsphase eingetreten war. Dennoch weisen die beobachteten Krankheitsgeschehen bei den verschiedenen Altersgruppen darauf hin, dass sich die Infektion abhängig vom Alter der

Versuchskarpfen unterschiedlich schwer entwickelt. So verlief sie bei den 15 Monate alten Karpfen äußerlich bereits nahezu symptomlos, während bei den drei Monate alten Tieren sogar Mortalitäten auftraten. Unterstützt wird dieser Befund durch die Beobachtung, dass in Vorversuchen dieser Untersuchung mit demselben KH-Virus infizierte, nur wenige Wochen alte juvenile Karpfen bereits am dritten Tag p.l. eine Mortalität von 100 Prozent aufwiesen sowie durch die Aussagen von PERELBERG et al. (2003), welche für Jungfische von 2,5 - 6 g Körpergewicht eine wesentlich stärkere Empfänglichkeit für das KH-Virus nachweisen konnten als für größere Individuen ab 230 g.

Die in der vorliegenden Studie untersuchten Proteine sowie weitere nahe verwandte Proteine derselben Familien und viele ihrer Lokalisationen und Funktionen werden aufgrund eingehender Untersuchungen beim Menschen und verschiedener weiterer Säugetiere immer besser verstanden und die betreffenden Erkenntnisse weiterhin intensiv vervollständigt (DHOPE et al., 2006; LINDE et al., 2008). Die Situation bei den Fischen unterscheidet sich hiervon grundlegend. Zu Beginn der eigenen Untersuchungen war unter den antimikrobiellen Peptiden einzig das Vorkommen von Lysozym in den Schleimhäuten von Fischen bestätigt (ELLIS, 2001), jenes von β -Defensin-2 und β -Defensin-3 wurde als sehr wahrscheinlich angesehen (ELLIS, 2001; LINDE et al., 2005; WAH et al., 2006; ZOU et al., 2007), ein endgültiger Nachweis stand jedoch noch aus. Claudine wurden etwa zeitgleich mit dem Beginn der eigenen Untersuchungen mit Hilfe molekularbiologischer Nachweismethoden erstmalig bei Fischen (hier beim hochentwickelten *Fugu rubripes*, LOH et al., 2004) gefunden. Aufgrund dieser Umstände standen für die immunhistochemischen Untersuchungen dieser Studie ausschließlich primäre Antikörper gegen Säugerproteine zur Verfügung, welche entsprechend den Angaben unter 2.6.1 verwendet wurden.

Defensine

In Bezug auf die Defensine wird heute davon ausgegangen, dass diese einen frühen evolutiven Ursprung haben, mit einer weiten Verbreitung innerhalb der Pflanzen, Tiere und Pilze (CASADEI et al., 2009). Im Vergleich zu Vögeln und Säugern besitzen Fische offensichtlich weniger Defensine, was den Gedanken bekräftigt, dass die Familie der Defensine rasch während der Vertebratenevolution expandierte. Allerdings gelang ein tatsächlicher Nachweis β -defensin-ähnlicher Gene bei Fischen

erst in jüngerer Vergangenheit, namentlich bei dem Cypriniden *Danio rerio* sowie bei zwei Tetraodontiformen. Bei diesen Genen handelt es sich um höheren Vertebraten homologe Sequenzen ursprünglicher β -Defensine, zu denen auch β -Defensin-2 und β -Defensin-3 zu zählen sind. Weiterführende Untersuchungen konnten darüber hinaus zeigen, dass die in Fischen identifizierten, Defensin-ähnlichen Peptide auch basierend auf ihrer Cysteinanordnung den Mitgliedern der β -Defensin-Familie von Vögeln und Säugern entsprechen (ZOU et al., 2007; FALCO et al., 2008; CASADEI et al., 2009). Diese Umstände sowie die Tatsache, dass eine jener Spezies, bei denen der Nachweis der ursprünglichen β -Defensine gelang, der dem Karpfen nahe verwandte Zebraäbrling ist, machen es sehr wahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Studie verwendeten Antikörper gegen Säuger-Defensine an solche Strukturen im Karpfendarm binden, die denen der β -Defensine von Säugetieren weitgehend entsprechen und aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit als Fisch- β -Defensine anzusprechen sind.

β -Defensine neigen zu breiten Expressionsmustern und werden bei Säugetieren in erster Linie von Epithelzellen, aber auch von Neutrophilen und Makrophagen als Präpropeptide synthetisiert und in Vesikeln im Zytoplasma gespeichert. Von hier aus können sie im Falle einer mikrobiellen Infektion rasch an die Zelloberfläche transportiert und – nunmehr in aktivierter Form – in das extrazelluläre Milieu entlassen werden (OREN et al., 2003; ELIAS & CHOI, 2005; HORNICKEl et al., 2011b). Daneben sind auch in darunter liegenden Gewebeschichten und einigen anderen Zelltypen, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung, ebenfalls β -Defensine nachweisbar (WAH et al., 2006; ZOU et al., 2007; FALCO et al., 2008; LINDE et al., 2008; CASADEI et al., 2009). Auch die Epithelien der Karpfendärme zeigten in den eigenen Untersuchungen für beide β -Defensine durchgehend starke Markierungen, die sich darüber hinaus auch auf die darunterliegenden Gewebe mesodermalen Ursprungs (mit Ausnahme von Fettgewebe) erstreckten. Diese Ergebnisse entsprechen den zuvor genannten Befunden bei Säugetieren. Unterschiede zu diesen ergaben sich allerdings in der Verteilung der Bindungsintensitäten. Während bei vergleichenden Untersuchungen am Oesophagusepithel von Säugetieren vor allem die lumennahen Epithelzellanteile und insbesondere das Stratum corneum intensiv markiert waren (HORNICKEl et al., 2011b), so waren bei Fischen die Zellkörper der Enterozyten einschließlich des Zytoplasmas relativ einheitlich ohne eine erkennbare Polarität gefärbt. Ein Befund, den auch bereits SCHOENNAGEL (2005)

für das Oesophagusepithel von Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Rotfeder (*Scardinius erythrophthalmus*) beschreibt. In den Darmquerschnitten der eigenen Versuchskarpfen erwies sich zusätzlich speziell die Schleimauflage als besonders intensiv markiert. Da der Mucus als äußerste Auflage des Fischdarmes in ständigem direkten und vor allem ersten Kontakt mit dem umgebenden Medium steht und die aktivierten β -Defensine in eben diese Schicht hinein sezerniert werden, wäre hier auch die intensivste Färbung zu erwarten und dieses Ergebnis ist somit folgerichtig. Untermauert wird dies durch die Erkenntnisse verschiedener Autoren, welche belegen, dass Schleimhäute generell beträchtliche Quellen für Defensine darstellen (ZHAO et al., 1996; O'NEIL et al., 1999; DIAMOND et al., 2000; WAH et al., 2006; ZOU et al., 2007). Die im Vergleich zu den Befunden bei Säugetieren sehr einheitliche aber nichtsdestoweniger starke Markierung des Darmepithels und der darunter befindlichen Gewebe der Karpfen kann mehrere Begründungen haben. Zum einen fehlt im Mittel- und Enddarm ein mechanischer Schutz in Form einer Verhornung, wie sie bei Säugetieren zumindest im Vorderdarmbereich auftreten kann [bei Fischen sind verhornende Epithelbereiche generell eine Ausnahme (HARDER, 1975; STARCK, 1983; FIEDLER, 1991; WESTHEIDE & RIEGER, 2004)]. Dies geht einher mit einem verminderten Schutz auch gegenüber kleineren mechanischen Verletzungen z.B. durch Nahrungsbestandteile, welche dann ein Eindringen sowohl von Bestandteilen der kommensalen Darmflora als auch von Pathogenen erleichtern würden. Gerade bei pflanzenfressenden Fischen wie dem Karpfen, denen ein Magen fehlt, gelangen oft noch weitgehend unverdaute Nahrungsbestandteile bis weit in den Mitteldarmabschnitt hinein. Dieser Umstand wiederum könnte eine effektive Barrierefunktion in Form einer stark präsenten unspezifischen Abwehr vorteilhaft erscheinen lassen, wofür auch die besonders starken Markierungen in der Schleimauflage sprechen. Andererseits stellt auch eine Verhornung nicht zwangsläufig einen statischen Schutz gegenüber mikrobiellen Angriffen dar, da Bakterien, Viren oder Pilze sich unter Umständen recht gut im Stratum corneum ansiedeln können (SCHOENNAGEL, 2005). Eine weitere mögliche Begründung für die gleichmäßig starken Markierungen besteht darin, dass die unspezifische Abwehr bei Fischen als ektotherme Organismen eine im Vergleich zu Säugetieren bedeutendere Rolle spielen könnte (WATTS et al., 2001; TORT et al., 2003). Das erworbene (spezifische) Immunsystem der Fische ähnelt in seinen grundlegenden

Mechanismen zwar demjenigen der Säugetiere, steht aufgrund seiner starken Temperaturabhängigkeit allerdings im Falle einer Infektion erst mit erheblicher zeitlicher Verzögerung zur Verfügung (ELLIS, 2001; WORKENHE et al., 2010). Hinzu kommt, dass die spezifische Immunabwehr auch in der Ontogenese eine geraume Zeit zur Entwicklung benötigt. Obwohl dieser Zeitraum bis zu ihrer vollständigen Entfaltung bei den einzelnen Fischarten deutlich variiert, entwickelt sie sich im Allgemeinen erst spät, weswegen viele Fische in den ersten Monaten nach dem Schlupf vollständig auf die unspezifische Immunabwehr angewiesen sind (NAM et al. 2010). Inwiefern der leichte Rückgang der Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für humanes β -Defensin-3 mit zunehmendem Alter der Karpfen in der vorliegenden Studie einen Hinweis auf eine sich entwickelnde spezifische Immunabwehr darstellen könnte, muss vorläufig im Unklaren verbleiben, zumal ein vergleichbarer Effekt für humanes β -Defensin-2 nicht festgestellt werden konnte. Hier wären weiterführende Untersuchungen mit adulten Karpfen möglicherweise aufschlussreich. Bezüglich der Antikörperproduktion durch die spezifische Abwehr berichtet ELLIS (2001) bei Forellen von einem Zeitbedarf von 4-6 Wochen nach erfolgter Infektion selbst bei optimalen Temperaturverhältnissen. Somit ist zu erwarten, dass die Komponenten der unspezifischen Abwehr bei Fischen – und hier womöglich insbesondere bei Juvenilen – eine größere Rolle spielen könnten als bei endothermen Vertebraten. Die eigenen Befunde unterstützen diese Annahme auch dahingehend, dass die starken Bindungsintensitäten der Antikörper spezifisch für hBD-2 und hBD-3 im Darm sowohl bei den infizierten als auch bei den nicht infizierten Individuen auftraten.

Antimikrobielle Peptide werden entweder konstitutiv exprimiert oder als Reaktion auf bestimmte Stressoren wie Infektionen oder Entzündungen induziert, so z.B. ein Teil der β -Defensine (ELIAS & CHOI, 2005; LINDE et al. 2008; HORNICKEL et al., 2011b). Eine konstitutive Expression lässt vermuten, dass bestimmte Gewebe die Fähigkeit besitzen, noch vor einer inflammatorischen Zellinfiltration eine mikrobielle Infektion abzuwehren (MEADA et al., 2009; WEN et al., 2009; NAM et al., 2010). Die eigenen Untersuchungsergebnisse deuten aufgrund der vorgefundenen Expressionsmuster ebenfalls auf eine hauptsächlich konstitutive Expression hin und unterstreichen damit die primäre Bedeutung der antimikrobiellen Peptide für die Aufrechterhaltung der Homöostase, zumal eine Hochregulierung nach erfolgter Infektion der Karpfen zumindest für hBD-2 nicht erkennbar ist. Neue Studien

berichten inzwischen von einer Induzierung von β -Defensin-Isoformen bei einer Plattfischart (*Paralichthys olivaceus*) innerhalb weniger Stunden nach Injektion des bakteriellen Infektionserregers *Edwardsiella tarda* und einer graduellen Rückkehr zum Ausgangszustand bereits ab 12 Stunden p.i. (NAM et al., 2010), so dass denkbar ist, dass ein solcher Effekt auch bei den infizierten Karpfen der eigenen Untersuchungen eintrat aber zum Zeitpunkt der ersten Probennahme nicht mehr erfasst werden konnte. Für hBD-3 war, abgesehen vom Enddarmsegment der 10 Monate alten Individuen, in allen Präparaten ein leichter Anstieg der Bindungsintensitäten am 2. Tag nach Infektion mit dem KH-Virus erkennbar. Für dieses β -Defensin wurde inzwischen eine antivirale Aktivität in humanen Keratozyten nachgewiesen (HOWELL et al., 2007). Eine Verbindung zwischen dem beobachteten Anstieg der Bindungsintensitäten von hBD-3 mit einer erhöhten Koi-Herpesvirus-Last im Darm infolge der hier erfolgten Infektion bedarf allerdings noch der Überprüfung.

Abschließend soll bei der Betrachtung der Expression der antimikrobiellen Peptide nicht unerwähnt bleiben, dass deren immunhistochemische Detektion technisch herausfordernd ist. Das Diffusionsvermögen der kleinen Peptide zusammen mit ihrer positiven Ladung kann sehr leicht in Artefakten oder in Pseudolokalisationen resultieren (WAH et al., 2001). Gleichzeitig ist allein auf der Grundlage der vorliegenden Untersuchungen nicht auszuschließen, dass die hier verwendeten Antikörper mit einem anderen, in den Darmgeweben der Karpfen massenhaft vorkommenden Molekül kreuzreagiert haben könnten und somit keinerlei Aussagen über die Verteilung der antimikrobiellen Peptide bei diesen Tieren ermöglichten. Ein solches Molekül müsste dann allerdings auch in verstärktem Maße in der Schleimauflage vorkommen, die dem erwarteten Auftreten von β -Defensinen entsprechend auch besonders intensive Markierungen aufwies. Die Wahrscheinlichkeit, dass mit den für humane antimikrobielle Peptide spezifischen Antikörpern aber in der Tat die entsprechenden Eiweiße in den Fischen markiert waren, wird noch erhöht durch die Ergebnisse des Western-Blottings. Hier konnte für die Antikörper gegen hBD-3 und Lysozym gezeigt werden, dass sie im Fischgewebe an Moleküle in demselben Größenbereich wie die antimikrobiellen Peptide binden.

Lysozym

Die Beschreibungen und Erläuterungen der Bindungsmuster für hBD-2 und hBD-3 sind zu großen Teilen auch auf die Bindungsmuster des Antikörpers gegen humanes Lysozym übertragbar. So waren auch hier in allen Geweben Markierungen zu beobachten, wobei im Epithel beider untersuchter Darmsegmente zumeist stärkere Markierungen als in den anderen zellulären Komponenten der Darmmukosa auftraten. Wie bereits bei den zuvor beschriebenen antimikrobiellen Peptiden, so sind die stärksten Markierungen auch beim Lysozym in der Schleimauflage zu finden. Im Gegensatz zur Situation bei den Defensinen ist das Vorkommen von Lysozym bei Fischen seit geraumer Zeit nachgewiesen (VLADIMIROV, 1968; FLETCHER & WHITE, 1976). Ebenso wie bei Säugern tritt es auch bei Fischen vor allem in solchen Geweben auf, die entweder einer intensiven bakteriellen Exposition unterliegen oder in ständigem Kontakt mit der Außenwelt stehen (ALEXANDER & INGRAM, 1992). Allerdings ist die Kinese der Lysozymsynthese und -sekretion derzeit noch nicht vollständig geklärt (BAYNE & GERWICK, 2001; SAURABH & SAHOO, 2008). Bei einigen Säugetieren wird das Enzym in speziellen Zellen der Dünndarm-Krypten, den Paneth-Zellen, synthetisiert und von diesen bis zu seiner Freisetzung in Vesikeln gespeichert (WEISS, 1983; TIZARD 2000). SVEINBJORNSSON et al. (1996) beschrieben eosinophile Granulozyten in der Lamina propria des atlantischen Lachses (*Salmo salar*) als strukturell und funktionell den Paneth-Zellen der Säugetiere sehr ähnlich und fanden Lysozym besonders in den Granula dieser Zellen lokalisiert. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden besonders intensiv markierte Gruppen granulär erscheinender Zellen in der Lamina propria gefunden, bei denen es sich um solche eosinophile Granulozyten handeln könnte. Sowohl von SVEINBJORNSSON et al. (1996) als auch im Zuge der eigenen Untersuchungen konnten jedoch auch in den Epithelzellen Strukturen nachgewiesen werden, mit denen die gegen Lysozym gerichteten Antikörper reagierten. Es ist allerdings unklar, ob Lysozym in Epithelzellen produziert wird. Es könnte durch Transzytose von der subepithelialen Lamina propria über die Epithelzellen hinweg transportiert werden (SCHOENNAGEL, 2007; SAURABH & SAHOO, 2008). Bezüglich eines Vergleiches der inneren Organe berichten verschiedene Autoren von den Nieren und Kopfnieren als die Organe mit den höchsten Lysozymvorkommen, in absteigender Reihenfolge gefolgt vom Verdauungstrakt, der Milz, dem Hautschleim, den Kiemen, der Leber und der Muskulatur (SAURABH & SAHOO, 2008, LIE et al.,

1989). Die bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Karpfendärmen gefundenen Bindungsmuster in Form von durchgängig starken Markierungen in allen am Faltenaufbau beteiligten Geweben mit besonders starker Markierung der Schleimauflage und ohne ausgeprägte Unterschiede zwischen nicht infizierten und infizierten Individuen deuten auch für Lysozym auf die schon für die β -Defensine beschriebene konstitutive Expression hin. Ebenso unterstreicht dieser Befund die wesentliche Bedeutung, die Lysozym in der unspezifischen Immunantwort bei Fischen innehat (ALEXANDER & INGRAM, 1992; TORT et al. 2003;) und die unter denselben Gesichtspunkten zu betrachten ist, wie diejenige der β -Defensine: als unmittelbar zur Verfügung stehender, schnell reagierender Abwehrmechanismus eines wechselwarmen Wirbeltieres, dessen spezifisches Immunsystem temperaturabhängig länger für die Entwicklung einer Antwort benötigt als die Komponenten des unspezifischen Immunsystems (MAGNADOTTIR, 2006). DEMERS & BAYNE (1997) sowie SAURABH & SAHOO (2008) beschreiben darüber hinaus eine höhere antibakterielle Wirksamkeit sowie ein breiteres Wirkungsspektrum des in Fischen gefundenen Lysozyms gegenüber dem der Säugetiere, was die wichtige Rolle des unspezifischen Immunsystems bei Fischen im Allgemeinen und jene des Lysozyms als daran maßgeblich beteiligter Abwehrmechanismus im Speziellen zusätzlich hervorhebt (GRINDE et al., 1988b & 1989).

Die Expression von Lysozym kann nicht nur konstitutiv erfolgen, sondern bei Kontakt mit potentiellen Pathogenen auch induziert werden. Ob der während der eigenen Untersuchungen beobachtete Anstieg der Bindungsintensitäten am 2. Tag p.I bei den Karpfen unter dem Einfluss einer KHV-Infektion tatsächlich eine Reaktion des Darmepithels auf Pathogene und damit eine Induzierung einer vermehrten Lysozym-Expression darstellt, muss zu diesem Zeitpunkt im Unklaren verbleiben, zumal die Stärke dieses Anstieges unabhängig von Alter und Gewicht der Karpfen uneinheitlich ausfiel. Dennoch ist eine gesteigerte Immunaktivität als Reaktion auf eine Konfrontation mit Pathogenen in unterschiedlichen Geweben auch von anderen Autoren beobachtet worden. Die hierfür beschriebenen Zeiträume variieren allerdings beträchtlich bzw. sind nur ungenau angegeben. Während TORT et al. (2003) bemerken, dass die Lysozymantwort „offenbar sehr schnell induziert werden kann“, beschreiben SIWICKI & STUDNICKA (1987) einen Anstieg der Lysozymaktivität im Serum von Karpfen an den Tagen 7 und 14 nach einer künstlichen Infektion mit

Pseudomonas alcaligenes und *Aeromonas punctata*. MÖCK & PETERS (1990) wiederum beschrieben allerdings auch einen Rückgang der Lysozymkonzentration im Forellenblut als Antwort auf Stresseinwirkung, der sich jedoch innerhalb von 24 Stunden wieder umkehrte. Widersprüchliche oder sehr unterschiedliche Angaben betreffen nicht nur die Induzierung der Lysozymantwort, sondern zum Teil auch die Lokalisation des Eiweißes selbst. So fand SCHOENNAGEL (2007) im Oesophagus von Karpfen kein und im Oesophagus von Forellen nur wenig Lysozym, während zuvor LINDSAY (1986) exakt hier das Hauptvorkommen von Lysozym im Gastrointestinaltrakt beschrieb. Eine potentielle Erklärung für solche divergenten Befunde liegt möglicherweise in der bereits früh festgestellten Variabilität der Lysozymaktivität, welche ihre Beurteilung zusätzlich erschwert. Diese ist bei Fischen unter anderem abhängig von Geschlecht, Alter, Größe, Jahreszeit, Wassertemperatur, pH, Infektionen und von der Anwesenheit von Giftstoffen und Stressoren (SAURABH & SAHOO, 2008). Während der eigenen Untersuchungen konnte eine Abhängigkeit der Lysozymexpression vom Alter bzw. Körpergröße der Karpfen, wie sie obenstehend für den allgemeinen Krankheitsverlauf beschrieben wurde, nicht festgestellt werden. Bezüglich der Problematik der Detektion des Fisch-Lysozyms mit Säuger-Antikörpern gilt das bereits bei der Diskussion der Ergebnisse für die β -Defensine gesagte (s.o.).

Claudine

Wie bereits einleitend dargestellt, wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich zu Komponenten des unspezifischen Immunsystems auch die Beteiligung des epithelialen Zellzusammenschlusses an Barrierefunktion und Aufrechterhaltung der Homöostase im Fischdarm untersucht. Dies geschah am Beispiel der Transmembranproteine Claudin-1 und Claudin-2. Als solche stellen Claudine strukturell elementare Bestandteile von Tight junctions dar, denen in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle bei Herstellung und Instandhaltung der Zell-Zell-Kontakte des geschlossenen Zellverbandes von Epithelien sowie regulatorische Funktionen in Bezug auf den parazellulären Ionentransport zugeschrieben werden (KOLLMAR et al., 2001; COLEGIO et al. 2002; BAGHERIE-LACHIDAN et al. 2009). Seit ihrer Identifizierung im Jahre 1998 wurden Aufbau und Funktion dieser Eiweiße primär an Säugetieren erforscht. Auf verschiedenen Wegen gelang der Existenznachweis von Claudinen und ihrer codierenden Gene auch bei Fischen,

unter anderem beim Kugelfisch *Takifugu* und beim Zebrafisch (*Danio rerio*) (VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006). Doch trotz der großen Bedeutung von Tight junctions bei der Festlegung der charakteristischen Eigenschaften von Epithelien und der Präsenz zahlreicher Claudin-Gene bei Fischen fehlen eingehende Untersuchungen dieser Proteinfamilie bei Nicht-Tetrapoden bisher weitestgehend (TIPSMARK et al., 2008a), was eine Diskussion auf der Grundlage wissenschaftlicher Daten erschwert. Deshalb wurden Claudin-1 und -2 für die eigenen Untersuchungen aufgrund jener Eigenschaften ausgewählt, die ihnen den Erkenntnissen aus Studien an Säugetieren folgend zugeschrieben werden. So handelt es sich bei Claudin-1 um ein ubiquitär exprimiertes Protein, dessen Vorkommen in nahezu allen daraufhin untersuchten Epithelien, so auch im Darm, nachgewiesen werden konnte und das bei Säugetieren eine entscheidende Bedeutung für den epidermalen Zellzusammenschluß und die Barrierefunktion besitzt (GREGORY et al., 2001; VAN ITALLIE & ANDERSON, 2004 & 2006). Claudin-2 hingegen tritt offenbar nur in begrenzten, teilweise entwicklungsabhängigen Zeiträumen in bestimmten Organen (unter anderem ebenfalls im Darm von Säugetieren) auf, wo es neueren Erkenntnissen zufolge eine regulatorische Komponente der Tight junction-Permeabilität darstellt und aufgrund ionenselektiver Eigenschaften Einfluß auf den parazellulären Transport ausübt (ESCAFFIT et al., 2005). KRAUSE et al. (2008) folgerten, dass schließlich die Kombination verschiedener Claudine und ihrer individuellen Eigenschaften in einem Epithel bestimmend ist für dessen Barrierefunktion sowie für seine resultierende Ionenselektivität und Transportfunktion.

Studien an Säugetieren erbrachten substantielle Hinweise darauf, dass die Ionen-Leitfähigkeit von Tight junctions durch pathologische Stimuli, darunter Zytokine, Hypoxie und bakterielle Toxine beeinflusst wird (POWELL, 1981; NURSAT et al., 2000; SEARS, 2000; WIT et al., 2003; VAN ITALLE & ANDERSON, 2004). Speziell als eine Reaktion auf Pathogene und während entzündlicher Reaktionen kann es zu einer verstärkten Internalisierung von Claudinen kommen. Bei einem solchen Vorgang separieren sich die Claudinmoleküle vom Occludin und den Zonula occludens-1-Molekülen (ZO-1) und werden im Zytoplasma in mit Claudinen angereicherten Vesikeln gespeichert (FINDLEY & KOVAL, 2009). Solche Abläufe gehören zu den normalen Austausch- und Umbauprozessen, welchen die Tight junctions und damit einhergehend die Claudine in einem gesunden Epithel fortwährend unterliegen (VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006). Durch bakterielle

Toxine kann allerdings eine verstärkte, in überproportionalem Umfang ablaufende Internalisierung in Gang gesetzt werden (FUJITA et al., 2000; HOPKINS et al., 2003; FEDWICK et al., 2005), die dann in geschwächten Zell-Zell-Kontakten sowie einer gesteigerten, möglicherweise schädlichen Permeabilität des Epithels mündet (FINDLEY & KOVAL, 2009). Darüber hinaus ist es unter solchen Gegebenheiten auch möglich, dass die normalerweise kommensalische Darmflora in tiefere Gewebsschichten vordringen und hier pathogen wirken kann. Eines der Ziele der eigenen Untersuchungen war es daher, anhand der hierfür ausgewählten Claudine 1 und 2 zu überprüfen, ob bei Karpfen unter dem Einfluß einer KHV-Infektion Veränderungen in der Claudinexpression auftreten können und ob aufgrund der Befunde Rückschlüsse auf infolgedessen veränderte Barriereigenschaften des Darmepithels bei Fischen möglich sind.

Für den immunhistochemischen Nachweis der Claudine wurden, wie bereits bei den β -Defensinen und beim Lysozym, Antikörper gegen die entsprechenden Proteine bei Säugetieren (Maus) verwendet. Auch für diesen Nachweis standen keine Antikörper gegen Fisch-Claudine zur Verfügung. Dennoch konnten sowohl in den Därmen der nicht infizierten Karpfen als auch bei den Karpfen unter KHV-Infektion eindeutige Markierungen festgestellt werden. Die eigenen Ergebnisse sowie Befunde aus methodisch vergleichbaren Studien anderer Autoren (TIPSMARK et al, 2008a) weisen deutlich darauf hin, dass es sich bei den mit Hilfe der Antikörper im Karpfendarm markierten Strukturen um Proteine handelt, welche den Claudinen bei Säugetieren gleichen und dass falsch-positive Reaktionen weitgehend ausgeschlossen werden können. So markierten die Antikörper ausschließlich Strukturen in den Zellwänden der Darmepithelzellen. Das Zytoplasma sowie sämtliche subepitheliale Gewebe blieben ungefärbt. Dies entspricht einem für die Markierung von an der Bildung von Tight junctions beteiligten Proteinen zu erwartenden Bindungsmuster, was DHAWAN et al. (2005) sowie ESCAFFIT et al. (2005) für Claudin-2 und Claudin-4 im humanen Intestinum bestätigen. TIPSMARK et al. (2008) konnten mit Hilfe von Western Blotting bestätigen, dass die von ihnen verwendeten Antikörper gegen Säuger-Claudin-3 und -4 an solche Proteine im Epithel von Fischkiemen banden, welche sich exakt im selben Größenbereich wie die entsprechenden Claudine bei Säugetieren befanden. Die in der erwähnten Veröffentlichung verwendeten Abbildungen sowie auch die Befunde und Abbildungen in CLELLAND et al. (2010) bezüglich Markierungen von Claudin-3 im Darm von

Tetraodon gleichen zudem in hohem Maße den Bindungsmustern, wie sie auch in den eigenen Untersuchungen beobachtet werden konnten. Ein weiterer Hinweis auf die mögliche Verwendbarkeit von Antikörpern gegen Säuger-Claudine auch bei Fischen ergibt sich nicht zuletzt aus der Tatsache, dass Claudine offenbar hochgradig konservierte Eiweiße darstellen, die sich während der Vertebratenevolution nur in lokal begrenztem Umfang veränderten und bei allen Spezies große strukturelle und molekulare Ähnlichkeiten aufweisen (TURKSEN & TROY, 2002), weswegen damit zu rechnen ist, dass entsprechende Antikörper sowohl bei Säugetieren als auch bei Fischen übereinstimmende Epitope vorfinden. Sowohl bei den Karpfen unter KHV-Infektion als auch bei den nicht infizierten Individuen konnten, wie unter 3.4 dargestellt, in beiden untersuchten Darmabschnitten Markierungen der Antikörper für Claudin-1 und Claudin-2 gefunden werden. Diese Markierungen sind dabei allgemein als schwach bis mäßig einzustufen, wobei die Bindungsintensitäten bei den infizierten Karpfen jene der nicht infizierten leicht übertrafen. Weitere Unterschiede ergaben sich in Abhängigkeit von Alter und Gewicht der verwendeten Individuen. So konnte bei den infizierten und nicht infizierten Karpfen ein deutlicher Rückgang der Bindungsintensitäten mit zunehmendem Alter und Gewicht beobachtet werden. Bereits bei den 10 Monate alten Karpfen waren die Markierungen deutlich geringer als bei den drei Monate alten Individuen. Bei den ohnehin schwächer markierten, nicht infizierten Karpfen konnten bei 15 Monate alten Individuen insbesondere für Claudin-2 schließlich nahezu keine Markierungen mehr nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Befund, dass in noch älteren Karpfen nur sehr wenige Kopien von Claudin-2 codierender mRNA mittels PCR nachweisbar waren (SYAKURI, mündliche Mitteilung). Auch im Darm von Säugetieren ist Claudin-2 vor allem bei jugendlichen, in der Entwicklung befindlichen Individuen in den Krypten und Villus-Zellen des Dünndarmes sowie in undifferenzierten Colonepithelzellen exprimiert, während es im adulten Darm vollkommen fehlt (ESCAFFIT et al., 2005). Eine erneute Expression wurde allerdings in sich regenerierenden Epithelien beobachtet, wie sie zum Beispiel im Falle einer Colitis ulcerosa-Erkrankung auftreten. Hier kam es zu einer starken Hochregulierung von Claudin-2 in den betroffenen Epithelbereichen (PRASAD et al. 2005, ZEISSIG et al. 2007, WEBER et al. 2008). In den eigenen Untersuchungen wurde in Übereinstimmung mit den Befunden bei Säugern im Karpfendarm eine verstärkte Bindung des Claudin-2 spezifischen Antikörpers bei mit KHV infizierten

Individuen festgestellt. Auch bei diesen Individuen erfolgte eine Regeneration des Darmgewebes nach Schädigung im Verlauf der Infektion. Übergreifend betrachtet deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Claudin-2 möglicherweise primär in sich regenerierenden oder in der Entwicklung befindlichen Epithelien exprimiert wird und mit zunehmender Differenzierung des Gewebes bzw. voranschreitendem Alter des Individuums immer seltener auftritt. Allerdings kann über die Gründe hierfür, die potentiell in der spezifischen Funktionalität des Claudin-2 (s.o.) zu suchen sind und die weiterführender Untersuchungen bedürfen, an dieser Stelle nur gemutmaßt werden.

Bis einschließlich Tag 5 p.I. mit KHV war in den untersuchten Darmabschnitten aller Altersgruppen ein deutlicher Rückgang der Bindungsintensitäten der Claudin-bindenden Antikörper zu beobachten. Ein Vergleich mit den histopathologischen Befunden im selben Zeitraum zeigt eine ebenfalls deutliche Degradation des Epithelgewebes mit teilweise erheblichen Beschädigungen. Eine Schwächung der Zell-Zell-Verbindungen und somit eine Beeinträchtigung des epithelialen Zellverbandes unter Beteiligung einer herabgesetzten Claudinexpression erscheinen naheliegend. Hierbei könnte ebenfalls die bereits erläuterte gesteigerte Internalisierung der Claudin-Moleküle aufgrund pathologischer Reize eine Rolle spielen. Als solche wären vor allem bakterielle Toxine in Betracht zu ziehen, da sekundäre bakterielle Infektionen bei durch KHV geschwächten Karpfen eine häufige Begleiterscheinung darstellen (MEYER, 2007) und auch bei den Fischen der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden können. Bei gesunden Fischen findet eine regelmäßige Erneuerung des Epithelgewebes unter fortwährendem Ersatz der Enterozyten statt. Beim Graskarpfen (*Ctenopharyngodon idella*) benötigt eine solche Epithelerneuerung einen Zeitraum von 10 bis 15 Tagen bei einer Temperatur von 20°C (STROBAND & DEBETS, 1978) und bei Karpfen wurde bei 20°C eine Epithelerneuerung innerhalb von 3 Tagen beobachtet (HEMMER et al. 1998). Während der eigenen Untersuchungen war auch bei den KHV-infizierten, 10 und 15 Monate alten Karpfen eine individuell unterschiedlich weit fortgeschrittene Regeneration der Darmmukosa bis zum 13. Tag p. I. zu beobachten. Obwohl artabhängige Unterschiede zu erwarten sind, scheint somit auch Fischen in einer Ausnahmesituation, wie sie eine durch Erkrankungen geschädigte Darmmukosa darstellt, eine Regeneration in einem vergleichbaren Zeitraum möglich zu sein. Hervorzuheben ist allerdings, dass das Epithel der jüngeren Karpfen stärker und

länger durch sich vermehrendes Virus geschädigt wurde, weswegen das Darmgewebe bis zum Versuchsende bei den bis dahin überlebenden Individuen in einem stark geschädigten Zustand verblieb.

Claudine und ihre Kontakt- und Porenfunktionen sind ebenfalls hochdynamisch, was beispielsweise durch die kurze Halbwertszeit von Claudin-4 von etwa 4 Stunden veranschaulicht wird (KRAUSE et al., 2008). Auch sie werden im gesunden Epithel offenbar ständig ersetzt, umgebaut und neu arrangiert (IVANOV et al., 2004). Wie bereits geschildert, wird Claudin-2 besonders in sich regenerierenden Epithelien exprimiert, doch auch für Claudin-1 waren bei den 10 und 15 Monate alten Karpfen einhergehend mit der Reorganisation des Darmepithels in beiden Segmenten ansteigende Bindungsintensitäten zu beobachten. Allerdings benötigt die Regulierung der Claudinexpression auch bei gesunden Fischen eine gewisse Anlaufzeit, während der es zu veränderten Permeabilitätseigenschaften des Epithels kommen kann. Auch während des Auf- und Umbaus von Tight junctions kann sich durch deren vorübergehendes Aufbrechen der Ionenfluß über das Epithel hinweg ändern und die parazelluläre Passage auch ungeladener Moleküle in beide Richtungen die Folge sein (KRAUSE et al., 2008; TIPSMARK et al., 2008a). Im Zusammenhang mit einem durch eine KHV-Infektion beeinträchtigten Epithel mit großflächigen Schädigungen und einem zunächst gestörten Claudin-Turnover sind somit über unbestimmte Zeiträume hinweg auch Ionenverluste über das Epithel denkbar. Dies ist von besonderem Interesse vor dem Hintergrund, dass Süßwasserfische von Natur aus einem permanenten Ionenverlust über ihre hochpermeablen Epithelien (vor allem Kiemen und Darm) ausgesetzt sind, welchem sie durch osmo- und ionenregulatorische Mechanismen entgegenwirken müssen (EVANS et al., 2005). Der Gastrointestinaltrakt übernimmt bei Knochenfischen dabei eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts. Während er bei Salzwasserfischen für eine Aufnahme von Wasser aus dem Lumen und eine Aufkonzentrierung von Salzen bis hin zu aktiver Sekretion zweiwertiger Kationen im posterioren Abschnitt sorgt, sind die Verhältnisse bei Süßwasserfischen nahezu umgekehrt. Hier spielt besonders die Aufnahme von Salzen aus den im Darmlumen suspendiert vorliegenden Nahrungsbestandteilen eine wesentliche Rolle, während überschüssiges Wasser über die Nieren (und zu geringen Teilen über den Darm) abgeführt wird (BUCKING & WOOD, 2006; MARSHAL & GROSELL, 2006; CLELLAND et al., 2010). Die Beteiligung von Claudinen an der Ionenregulation ist

dabei für die Kiemenepithelien bereits nachgewiesen worden und auch für die Darmmukosa anzunehmen (TIPSMARK et al., 2008a & 2008b). Während allerdings bei Säugetieren entwicklungs- und gewebsspezifische Expressionsmuster von Claudinen in bestimmten Organen auftreten (TSUKITA & FURUSE, 1999; VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006; KRAUSE et al., 2008), liegen über die räumliche Verteilung von Tight-junction-Proteinen entlang des Gastrointestinaltraktes bei Fischen noch keinerlei Kenntnisse vor (CLELLAND et al., 2010). Ionenbalance und –aufnahme sind bei Fischen entlang des Intestinums jedoch nicht einheitlich (LORETZ, 1995), wobei CLELLAND et al. (2010) den anterioren Anteilen eine höhere Durchlässigkeit als dem in Bezug auf die Tight junctions dichteren posterioren Segment attestieren. Die in den eigenen Untersuchungen beobachteten, gegenüber den Mitteldarmsegmenten etwas stärkeren Markierungen besonders des Antikörpers gegen Claudin-1 in den Enddarmsegmenten auch bei den nicht infizierten Karpfen, könnten daher ein Ausdruck dieser unterschiedlichen Permeabilität beider Segmente sein. In den untersuchten Darmabschnitten der Karpfen unter dem Einfluß einer KHV-Infektion war dagegen vor allem ein starker Anstieg der Markierungen des Antikörpers gegen Claudin-2 festzustellen, bei den 15 Monate alten Individuen bereits ab dem 2. Tag p.i. Wie bereits dargestellt, ist für Claudin-2 eine ausgeprägte Ionenselektivität sowie eine Beteiligung an der Bildung hoch-leitender Kationenporen nachgewiesen worden, wodurch dieses Protein die Eigenschaften des Membranwiderstandes von Epithelien maßgeblich beeinflusst (FURUSE et al., 1998; VAN ITALLIE & ANDERSON, 2006). Dies äußert sich dadurch, dass die Durchlässigkeit für Ionen bei verstärkter Präsenz von Claudin-2 in einem Epithel erhöht wird. De facto steigert sich die transepitheliale Permeabilität durch einen verstärkten parazellulären Transport. ANGELOW et al. (2008) prognostizierten, dass Claudin-2 in den Nierenubuli sehr wahrscheinlich für einen großen Teil der parazellulären Reabsorption von Na^+ verantwortlich ist. Hierin könnte eine funktionelle Parallele zu den in den eigenen Untersuchungen gefundenen Ergebnissen bestehen. So war auffällig, dass es besonders bei den älteren, 10 und 15 Monate alten Karpfen nach erfolgter Infektion zunächst zu einem Abfall der Bindungsintensitäten der Antikörper gegen Claudin-1 kam, worauf bald ein deutlicher Anstieg der Bindungsintensitäten für Claudin-2 erfolgte. Möglicherweise kam es im Zuge des Verlustes von Claudin-1 zu physiologisch relevanten Ionenverlusten, denen mit einer Hochregulierung von Claudin-2 als erste Gegenmaßnahme vor der

Zeit fordernden Wiederherstellung der epithelialen Integrität begegnet werden sollte. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Befunde von NEGENBORN (2007), welche für ca. 10 Monate alte Karpfen einen deutlichen Verlust u.a. von Natrium- und Kalzium-Ionen im Blutplasma während der ersten Tage nach erfolgter KHV-Infektion feststellen konnte, der allerdings von den erkrankten Karpfen gegen Ende der 14-tägigen Versuchsphase teilweise wieder aufgefangen werden konnte. Bei NEGENBORN (2007) konnten die im Blutplasma fehlenden Ionen im Urin nachgewiesen werden, was somit einen Ionenverlust über Nieren und Harnwege beschreibt. Da aber, wie obenstehend beschrieben, auch der Darm eine Rolle im Ionenhaushalt der Fische spielt, sind vergleichbare Vorgänge für dieses Organ ebenfalls denkbar. So beschreiben auch CLELLAND et al. (2010), dass eine Regulierung der epithelialen Permeabilität durch differentielle Claudin-Expression, hier in Kombination mit einer modulierten Natrium-Kalium-ATPase-Aktivität, ein eingehendes Beispiel dafür darstellt, auf welche Weise diese komplementären Transportprozesse im Fischdarm zur Aufrechterhaltung der Homöostase allgemein und zur Aufrechterhaltung der Ionenbalance im Speziellen zusammenwirken können. Abschließend sei noch einmal angesprochen, dass bei den 10 und 15 Monate alten Individuen eine Regeneration des intestinalen Epithels beobachtet werden konnte. Diese trat bei den 10 Monate alten Karpfen erst gegen Ende des Beobachtungszeitraumes auf, während dies (einhergehend mit einer bedeutend schnelleren Hochregulierung des Claudin-2) bei den 15 Monate alten Individuen bereits deutlich früher (spätestens ab Tag 5 p.l.) erfolgte. Bei letztgenannten waren darüber hinaus auch die Gewebeschäden geringgradiger. Bei den drei Monate alten Karpfen konnte demgegenüber keine solche Regeneration festgestellt werden, die Darmgewebe dieser Individuen blieben bis zum Versuchsende deutlich geschädigt. Die Ursachen hierfür könnten möglicherweise in einer zunehmenden Ausprägung des adaptiven Immunsystems zu finden sein, welches den älteren Individuen immer mehr zugutekommt (s. o.). Während die jüngsten Karpfen sich noch vollständig auf ihre angeborene, unspezifische Immunabwehr verlassen müssen und diese im Falle einer KHV-Infektion schließlich überwunden werden kann, so ist es möglich, dass bei den älteren Individuen in ansteigendem Maße bereits Komponenten des adaptiven Immunsystems (das sowohl für die individuelle Entwicklung als auch für Reaktionen auf pathogene Einwirkungen mehr Zeit benötigt) unterstützend hinzutreten, welche für eine effektivere Eindämmung der Infektion und der damit einhergehenden

Schädigungen verantwortlich sein könnten. Zur Klärung dieser Fragestellungen würden allerdings weiterführende Studien benötigt, welche sich eingehend mit der Entwicklung der Homöostase bei Karpfen unter dem Einfluß einer KHV-Infektion und den beteiligten Immunkomponenten auch in Abhängigkeit vom bestehenden Alter der Individuen auseinandersetzen.

Abschlussbemerkung

Zusammenfassend kann aus den in der vorliegenden Arbeit besprochenen Untersuchungen geschlußfolgert werden, dass unter KHV-Infektion kein wesentlicher Einfluß auf die Expression der antimikrobiellen Peptide Beta-Defensin-2 und -3 sowie Lysozym, wohl aber eine Modulation der transmembranären Proteine Claudin-1 und Claudin-2 erkennbar war. Zudem waren pathologische Veränderungen des Epithelgewebes in allen untersuchten Altersgruppen zu erkennen, die sich in zum Teil massiven Beschädigungen und Zellverlusten im Epithelverband sowie in deutlicher Proliferation der bindegewebigen Anteile ausdrückten. Aus diesen Erkenntnissen kann auf eine damit vermutlich einhergehende Beeinträchtigung der Infektionsbarriere der intestinalen Mukosa geschlossen werden. Zusammen mit dem bei Fischen erst mit beträchtlicher Verzögerung antwortenden spezifischen Abwehrsystem besteht unter diesen Umständen die Möglichkeit der Überwindung der aus Komponenten der unspezifischen Immunabwehr und Zell-Zell-Verbindungen des Epithelverbandes bestehenden Barrierefunktion als vorderste Frontlinie zur Erregerabwehr und infolgedessen eines verstärkten Auftretens von Sekundärinfektionen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse unterstreichen somit die bereits von Studien an Säugetieren bekannte Bedeutung der hier untersuchten antimikrobiellen Peptide und Transmembranproteine auch für das Immunsystem der Fische.

LITERATURVERZEICHNIS

ALEXANDER, J.B., G. A. INGRAM (1992):

Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish.
Annual Rev. of Fish Diseases 249-279

ANGELOW, S., R., A. AHLSTROM, S. L. YU (2008):

Biology of Claudins.
Am J Physiol Renal Physiol 295: F867–F876

ARIAV, R., S. TINMAN, I. PAPERNA, u. I. BEJERANO (1999):

First report of newly emerging viral disease of *Cyprinus carpio* species in Israel.
Proceedings of EAFP 9 th International Conference.
Diseases of Fish and Shellfish, Rhodes, Greece

BAGHERIE-LACHIDAN, M., S. I. WRIGHT, S. P. KELLY (2009):

Claudin-8 and -27 tight junction proteins in puffer fish *Tetraodon nigroviridis*
acclimated to freshwater and seawater.
J Comp Physiol B 179: 419-431

BAYNE, C. J., L. GERWICK (2001):

The acute phase response and innate immunity of fish.
Developmental & Comparative Immunology 25, Issues 8-9: 725-743

BLOOM, M. (1998):

Koi immune system suppressing disease (KISS).
Tagungsband der VII. Tagung der deutschen Sektion der European Association of
Fish Pathologists (EAFP), Schmollenberg-Grafschaft

BOECK, P. (Hrsg.) (1989):

Romeis – Mikroskopische Technik.
17. Aufl., Urban u. Schwarzenberg. München, Wien.

BRETZINGER, A., T. FISCHER-SCHERL, M. OUMOUNA, R. HOFFMAN, u. U.
TRUYEN (1999):

Mass mortalities in koi, *Cyprinus carpio*, associated with gill and skin disease.
Bull. Eur. Assoc. Fish Path. 19 (5): 182-185

BUCKING, C., WOOD, C. M. (2006):

Gastrointestinal processing of Na⁺, Cl⁻, and K⁺ during digestion: implications for
homeostatic balance in freshwater rainbow trout.
Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 291: R1764-R1772.

CASADEI, E., T. WANG, J. ZOU, J. L. GONZALEZ VECINO, S. WADSWORTH, C. J. SECOMBES (2009):
Characterization of three novel β -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).
Molecular Immunology 46: 3358-3366

CLELLAND, E. S., P. BUI, M. BAGHERIE-LACHIDAN, S. P. KELLY (2010):
Spatial and salinity-induced alterations in claudin-3 isoform mRNA along the gastrointestinal tract of the puffer fish *Tetraodon nigroviridis*.
Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 155: 154-163

COLEGIO, O.R., C. M. VAN ITALLIE, H. J. M. C. CREA, C. RAHNER, J. M. ANDERSON (2002):
Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells.
Am J Physiol Cell Physiol 283: C14-C147

COLEGIO, O.R., ITALLIE, C. V., RAHNER, C., ANDERSON, J. M. (2003):
Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture.
Am J Physiol Cell Physiol 284: C1346-C1354.

COSTES, B., V. STALIN RAJ, B. MICHEL, G. FOURNIER, M. THIRION, L. GILLET, J. MAST, F. LIEFFRIG, M. BREMONT, A. VANDERPLASSCHEN (2009):
The Major Portal of Entry of Koi Herpesvirus in *Cyprinus carpio* Is the Skin.
Journal of Virology 83 (7): 2819-2830

DEMERS N.E., C.J. BAYNE (1997):
The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout.
Developmental and Comparative Immunology 21: 363-373.

DHAWAN, P., A. B. SINGH, N. G. DEANE, Y. R. NO, S-R. SHIOU, C. SCHMIDT, J. NEFF, M. K. WASHINGTON, R. D. BEAUCHAMP (2005):
Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer.
Journal of Clinical Investigation 115 (7): 1765-1776

DHOPLE, V., A. KRUKEMEYER, A. RAMAMOORTHY (2006):
The human beta-defensin-3, an antibacterial peptide with multiple biological functions.
Biochimica et Biophysica Acta 1758: 1499-1512

DIAMOND, G., V. KAISER, J. RHODES, J. P. RUSSEL, C. L. BEVINS (2000):
Transcriptional regulation of beta-defensin gene expression in tracheal epithelial cells.
Infect. Immun. 73: 5053-5064

DICKERSON, H.W: (2009):

The Biology of Teleost Mucosal Immunity.

In: Fish Defenses Vol. 2: Pathogens, Parasites and Predators,

Edited by Giacomo Zaccane , C . Perriere , A . Mathis and B . G . Kapoor

Science Publishers 2009, 1-42

ELIAS, P. M., E. H. CHOI (2005):

Interactions among stratum corneum defensive functions.

Experimental Dermatology 14: 719-726

ELLIS, A. E. (1999):

Immunity to bacteria in fish.

Fish & Shellfish Immunology 9: 291-308

ELLIS, A.E. (2001):

Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria.

Developmental and Comparative Immunology 25: 827-839

ESCAFFIT, F., F. BOUDREAU, J.-F. BEAULIEU (2005):

Differential Expression of Claudin-2 Along the Human Intestine: Implication of GATA-4 in the Maintenance of Claudin-2 in Differentiating Cells.

Journal of Cellular Physiology 203: 15-26

EVANS D. H., PIERMARINI, P. M., CHOE K. P. (2005):

The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste.

Physiol Rev 85: 97-177

FALCO, A., V. CHICO, L. MARROQUI, L. PEREZ, J. M. COLL, A. ESTEPA (2008):

Expression and antiviral activity of a β -defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences.

Molecular Immunology 45: 757-765

FEDWICK, J. P., LAPOINTE, T. K., MEDDINGS, J. B., SHERMAN, P. M., BURET, A. G. (2005):

Helicobacter pylori activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability.

Infect. Immun. 73: 7844-7852

FIEDLER, K. (1991):

Lehrbuch der speziellen Zoologie, Band II, Teil 2: Fische.

Gustav Fischer Verlag. Frankfurt/M.

FINDLEY, M.K., M. KOVAL (2009):

Regulation and Roles for Claudin-family Tight Junction Proteins.

IUBMB Life, 61(4): 431-437

FLETCHER, T.C., P. T. GRANT (1968):

Glycoproteins in the external mucous secretions of the plaice (*Pleuronectes platessa* L.) and other fishes.

Biochem. J. 106, 12 p

FLETCHER T. C., A. WHITE (1976):

The Lysozyme of the plaice *Pleuronectes platessa*.

Comp. Biochem. Physiol. 55B: 207-210

FUJITA, K., KATAHIRA, J., HORIGUCHI, Y., SONODA, N., FURUSE, M., TSUKITA, S. (2000):

Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein.

FEBS Lett. 476: 258-261.

FURUSE, M., K. FUJITA, T. HIIRAGI, K. FUJIMOTO, S. TSUKITA (1998):

Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with no Sequence Similarity to Occludin.

Journal of Cell Biology, 141 (7): 1539–1550

FURUSE, M., HATA, M., FURUSE, K., YOSHIDA, Y., HARATAKE, A. (2002):

Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice.

J. Cell Biol. 156: 1099-1111

GILAD, O., S. YUN, M. A. ADKINSON, K. WAY, N. H. WILLITS, H. BERCOVIER, u. R. P. HEDRICK (2003):

Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi.

J. Gen. Virol. 84: 2661-2668

GILAD, O., S. YUN, F. J. ZAGMUTT-VERGARA, C. M. LEUTENEGGER, H. BERCOVIER, R. HEDRICK (2004):

Concentrations of a koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR.

Diseases of Aquatic Organisms 48: 101-108

GÓMEZ, G. D., J. L. BALCÁZAR (2008):

A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish.

FEMS Immunol Med Microbiol 52: 145-154

GONZALEZ-MARISCAL, L., A. BETANZOS, P. NAVA, B.E. JARAMILLO (2003):
Tight junction proteins.

Progress in Biophysics & Molecular Biology 81: 1-44

GREGORY, M., J. DUFRESNE, L. HERMO, D.G. CYR (2001):
Claudin-1 Is Not Restricted to Tight Junctions in the Rat Epididymis.
Endocrinology 142 (2): 854-863

GRINDE, B., J. JOLLES, P. JOLLES (1988a):
Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
Eur. J. Biochem. 173: 269-273

GRINDE, B., O. LIE, T. POPPE, R. SALTE (1988b):
Species and Individual Variation in Lysozyme Activity in Fish of Interest in
Aquaculture.
Aquaculture 68: 299-304

GRINDE, B. (1989):
Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial
agent against fish pathogens.
Journal of Fish Diseases 12: 95-104

GUANI-GUERRA, E., T. SANTOZ-MENDOZA, S. O. LUGO-REYES, L. M. TERÁN
(2010):
Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health
and disease.
Clinical Immunology 135: 1-11

HARDER, W. (1975):
Anatomy of Fishes
Schweizerbartsche Verlagsbuchhandlung. Stuttgart.

HEDRICK, R. P., O. GILAD, S. YUN, J. SPANGENBERG, G. MARTY, R.
NORDHAUSEN, M. KEBUS, H. BERCOVIER, u. A. ELDAR (2000):
A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of
common carp.
J. Aquat. Animal Health 12: 44-55

HEMMER, N., D. STEINHAGEN, W. DRORMMER, W. KOERT ING (1998):
Changes of intestinal epithelial structure and cell turnover in carp *Cyprinus carpio*
infected with *Goussia carpelli* (Protozoa: Apicomplexa).
Dis Aquat Org. 34: 39-44

HOFFMANN, R., M. EL-MATBOULI, S. ESSBAUER u. TH. FISCHER-SCHERL
(2000):
Ausbruch der „Koi-Seuche“ bei Teichkarpfen.
8. Tagung der Deutschen Sektion der EAAP, Potsdam

HOPKINS, A. M., WALSH, S. V., VERKADE, P., BOQUET, P., NUSRAT, A. (2003):
Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure
and epithelial barrier function.
J. Cell Sci. 116: 725-742.

HORNICKEL, I.N. (2009):
Investigations on the innate immunity of the oesophagus epithelium of
domesticated mammals.
Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover. Dissertation.

HORNICKEL, I., KACZA, J., SCHNAPPER, A., BEYENBACH, M.,
SCHOENNAGEL, B., SEEGER, J., MEYER, W. (2011):
Demonstration of substances of innate immunity in the esophagus epithelium of
domesticated mammals. Part I – methods and comparative fixation evaluation.
Acta Histochem. 113: 163-174.

HOWELL, M.D., J. E. STREIB, D. Y. M. LEUNG (2007):
Antiviral Activity of Human β -Defensin-3 Against Vaccinia Virus
J. Allergy. Clin. Immunol. 119 (4): 1022-1025

IVANOV, A. I., NUSRAT, A., PARKOS, C. A. (2004):
The epithelium in inflammatory bowel disease: potential role of endocytosis of
junctional proteins in barrier disruption.
Novartis. Found. Symp. 263: 115-24

JOLLES, P., JOLLES, J. (1984):
Whats new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday.
Mol. Biochem. 63: 165-189.

HAUTZER, N.W., WITTKUHN, J.F., MCCAUGHEY, W.T. (1980):
Trypsin digestion in immunoperoxidase staining.
J. Histochem. Cytochem. 28: 52-53

KOLLMAR, R., S. K. NAKAMURA, J. A. KAPPLER, A. J. HUDSPETH (2001):
Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia.
Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 10196-10201

KRAUSE, K., L. WINKLER, S. L. MUELLER, R. F. HASELOFF, J. PIONTEK, I. E.
BLASIG (2008):
Structure and function of claudins.
Biochimica et Biophysica Acta 1778: 631- 645

LAL-NAG, M., P. J. MORIN † (2009):
The claudins.
Genome Biology 10: 235

LIE, O., O. EVENSEN, A. SORENSEN, E. FROYSADAL (1989):
Study on lysozyme activity in some fish species.
Dis. Aquat. Org., 6: 1-5.

LINDE, A., C. R. ROSS, E. G. DAVIS, L. DIB, F. BLECHA, T. MELGAREJO
(2008):
Innate Immunity and Host Defense Peptides in Veterinary Medicine.
J. Vet. Intern. Med. 22: 247-265

LINDSAY, G. J. H. (1986):
The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) defence.
Aquaculture 51: 169-173

LOH, Y. H., A. CHRISTOFFELS, S. BRENNER, W. HUNZIKER, B. VENKATESH
(2004):
Extensive Expansion of the Claudin Gene Family in the Teleost Fish *Fugu rubripes*.
Genome Research 14: 1248-1257

LORETZ, C.J. (1995):
Electrophysiology of ion transport in teleost intestinal cells.
In: Wood, C.M., Shuttleworth, T.J. (Eds.): Cellular and Molecular Approaches to
Fish Ionic Regulation.
Academic Press, New York: 25-56.

MAGNADÓTTIR, B. (2006):
Innate immunity of fish (overview).
Fish & Shellfish Immunology 20: 137-151

MARSHALL, W.S., GROSELL, M. (2006):
Ion transport, osmoregulation, and acid–base balance.
In: Evans, D.H., Claiborne, J.B. (Eds.), The Physiology of Fishes, 3rd ed. Taylor
and Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 177-210.

MEADA, K.G., R. HIGGS, A. T. LLOYD, S. GILES, C. O'FARELLY (2009):
Differential antimicrobial peptide gene expression patterns during early chicken
embryological development.
Dev. Comp. Immunol. 33: 516-524

MEYER, K. (2007):
Untersuchungen zur Übertragung von Koi-Herpesvirus-Infektionen durch
symptomlose Carrierfische.
Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation

MINSON, A. C, A. DAVISON, R EBERLE, R. C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN, D. J. MC GEOCH, P. E. PELLET, B. ROIZMANN u. M. J. STUDDERT (2000):
Family Herpesviridae. In: Virus taxonomy: Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses, Academic Press, San Diego, 203-225

MÖCK, A., G. PETERS (1990):
Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution.
Journal of Fish Biology 37: 873-885

NAM, B.-H., J.-Y. MOON, Y.-O. KIM, H.J. KONG, W.-J. KIM, S.-J. LEE, K.-K. KIM (2010):
Multiple β -defensin isoforms identified in early developmental stages of the teleost *Paralichthys olivaceus*.
Fish & Shellfish Immunology 28: 267-274

NEGENBORN, J. (2009):
Klinisch-chemische Parameter im Blut und Urin von Karpfen unter Infektion mit dem Koi-Herpesvirus.
Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation

NEUKIRCH, M. (2003):
Herpesvirus bedingte Koi-Seuche.
KLAN Koi-Magazin 11 (4): 49-57

NUSRAT, A., J.R. TURNER, J.L., MADARA (2000):
Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279: G851-G857

O'NEIL, D. A., E. M. PORTER, D. ELEWAUT, G. M. ANDERSON, L. ECKMANN, T. GANZ, M F. KANGOFF (1999):
Expression and regulation of human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.
Journal of Immunology 163: 6718-6724

OREN, A., T. GANZ, L. LIU, T. MEERLOO (2003):
In human Epidermis, beta-defensin-2 is packed in lamellar bodies.
Experimental and Molecular Pathology 74: 180-182

OURTH, D. D. (1980):
Secretory IGM, Lysozyme and Lymphocytes in the skin mucus of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*.
Developmental and Comparative Immunology 4: 65-74

PASTORET, P.P., P. GRIEBEL, H. BAZIN, A. GOVAERTS (Eds.) (1998):
Handbook of vertebrate immunology.
Academic Press. San Diego, London.

PAULSEN, S. M., R. E. ENGSTAD †, B. ROBERTSEN (2001):
Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages
treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide.
Fish & Shellfish Immunology 11: 23-37

PERELBERG, A., M. SMIRNOV, M. HUTORAN, A. DIAMANT, Y. BEJERANO, M.
KOTLER (2003):
Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio*
in Israel.
The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh 55 (1): 5-12.

PIKARSKY, E., A. RONEN, J. ABRAMOWITZ, B. LEVAVI-SIVAN, M. HUTORAN,
Y. SHAPIRA, M. STEINITZ, A. PERELBERG, D. SOFFER, u. M. KOTLER (2004):
The pathogenesis of the acute viral disease in fish induced by the carp interstitial
nephritis and gill necrosis virus (CNGV).
J. Virol. 78: 9544-51

POWELL, D.W. (1981):
Barrier function of epithelia.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 241: G275-G288

PRASAD, S., R. MINGRINO, K. KAUKINEN, K. L. HAYES, R. M. POWELL, T. T.
MACDAONALD, J. E. COLLINS (2005):
Inflammatory processes have differential effects on claudins 2,3 and 4 in colonic
epithelial cells.
Laboratory Investigation 85: 1139-1162

PRESS, C. Mc L., Ø. EVENSEN (1999):
The morphology of the immune system in teleost fishes.
Fish & Shellfish Immunology 9: 309-318

QUINONES-MATEU, M. E., M.M. LEDERMAN, Z. FENG, B. CHAKRABORTY, J.
WEBER, H. R. RANGEL, M. L. MAROTTA, M. MIRZA, B. JIANG, P. KISER, K.
MEDVIK, S. F. SIEG, A. WEINBERG (2003):
Human epithelial β -defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication.
AIDS 2003, 17: F39-F48

RAKERS, S., M. GEBERT, S. UPPALAPATI, W. MEYER, P. MADERSON, A. F.
SELL, C. KRUSE, R. PAUS, (2010):
'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology.
Experimental Dermatology.

SAURABH, S., P. K. SAHOO (2008):

Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system.
Aquaculture Research 39: 223-239

SCHNEEBERGER, E. E., LYNCH, R. D. (2004):

The tight junction: A multifunctional complex.
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 286: C1213-C1228

SCHOENNAGEL, B. (2005):

Vergleichende Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Oesophagus-Epithels bei Vertebraten in Bezug zur Ernährungsweise, unter besonderer Berücksichtigung der Haussäugetiere.
Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation.

SEARS, C. L. (2000):

Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions V. Assault of the tight junction by enteric pathogens.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 279: 1129-1134

SHEPHARD, K. L. (1994):

Functions for fish mucus.
Reviews in Fish Biology and Fisheries 4: 401-429

SIWICKI, A., M. STUDNICKA (1987):

The phagocytic ability of neutrophils and serum lysozyme activity in experimentally infected carp, *Cyprinus carpio* L.
J. Fish Biol. 31 (Supplement A): 57-60

STARCK, D. (1983):

Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere auf evolutionsbiologischer Grundlage.
Band 3: Organe des aktiven Bewegungsapparates, der Koordination, der Umweltbeziehung, des Stoffwechsels.
Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

STROBAND, H.W.J., F.M.H. DEBETS (1978):

The Ultrastructure and Renewal of the Intestinal Epithelium of the Juvenile Grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.).
Cell Tiss. Res. 187: 181-200

SVEINBJORNSSON, B. R. OLSEN, S. PAULSEN (1996):

Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.
Journal of Fish Diseases 19: 349-355

TIPSMARK, C.K., D.A. BALTZEGAR, O. OZDEN, B.J. GRUBB, R.J. BORSKI (2008a):

Salinity regulates claudin mRNA and protein expression in the teleost gill.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294: R1004-R1014

TIPSMARK, C. K., P. KIILERICH, T.O. NILSEN, L. O. E. EBBESSON, S. O. STEFANSSON, S. S. MADSEN (2008b):

Branchial expression patterns of claudin isoforms in Atlantic salmon during seawater acclimation and smoltification.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294: R1563-R1574

TIPSMARK, C.K., . JØRGENSEN, N. BRANDE-LAVRIDSEN, M. ENGELUND, J. H. OLESEN, S.S. MADSEN (2009):

Effects of cortisol, growth hormone and prolactin on gill claudin expression in Atlantic salmon.
General and Comparative Endocrinology 163: 270-277

TIZARD, I. R. (2000):

Veterinary Immunology.

6. Aufl., W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.

TORT, L., J. C. BALASCH, S. MACKENZIE (2003):

Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses.
Revisión 22(3): 277-286

TSUKITA, S., M. FURUSE (1999):

Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players?
Trends in Cell Biology (9): 268-273

TSUKITA, S., M. FURUSE (2000):

The Structure and Function of Claudins, Cell Adhesion Molecules at Tight Junctions.

Annals of the New York Academy of Sciences 915: 129-135

TURKSEN K., T. C. TROY (2001):

Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium.

Dev. Dyn. 222: 292-300

TURKSEN, K., T.-C. TROY (2002):

Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6.
Development. 129: 1775-1784

VAN DER MAREL, M., N. CASPARI, H. NEUHAUS, W. MEYER, M.-L. ENSS, D. STEINHAGEN (2010):

Changes in skin mucus of common carp, *Cyprinus carpio* L., after exposure to water with high bacterial load.

Journal of Fish Diseases 33: 431-439

VAN ITALLIE, C. M., J.M. ANDERSON (2004):

The Molecular Physiology of Tight Junction Pores.

Physiology 19: 331-338

VAN ITALLIE, C. M., J.M. ANDERSON (2006):

Claudins and epithelial paracellular transport.

Annu. Rev. Physiol. 68: 403-429

VERSCHUERE, L., G. ROMBAUT, P. SORGELOOS, W. VERSTRAETE (2000):

Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture.

Microbiology and Molecular Biology Reviews 64/4: 655-671

VLADIMIROV, V. L. (1968):

Immunity in fish.

Bull. Off. Intl. Epizoo. 69: 1365-1372

WAH, J., A. WELLEK, M. FRANKENBERGER, P. UNTERBERGER, U. WELSCH, R. BALS, (2006):

Antimicrobial peptides are present in immune and host defense cells of the human respiratory and gastrointestinal tracts.

Cell Tissue Res. 324: 449-456

WALSTER, C. I. (1999):

Clinical observations of severe mortalities in koi carp, *Cyprinus carpio*, with gill disease.

Fish Vet. J. 3: 54-58

WALTZEK, T. B., G. O. KELLEY, D. M. STONE, K. WAY, L. HANSON, H.

FUKUDA, I. HIRONO, T., AOKI, A. J. DAVISON u. R. P. HEDRICK (2005):

Koi herpesvirus represents a third cyprinid herpesvirus (CyHV-3) in the family Herpesviridae.

J. Gen. Virol. 86, 1659-1667

WANG, Z., S. ZHANG (2010):

The role of lysozyme and complement in the antibacterial activity of zebra fish (*Danio rerio*) egg cytosol.

Fish & Shellfish Immunology 29: 773-777

WATTS, M., B. MUNDAY, C.M. BURKE (2001):

Immune responses of teleost fish.

Aust Vet J 79 (8): 570-574

WEBER, C. R., S. C. NALLE, M. TRETIAKOVA, D. T. RUBIN, J. R. TURNER (2008):
Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation.
Laboratory Investigation 88: 1110-1120

WEISS, L. (1983):
Histology. Cell and Tissue Biology.
5. Aufl., Elsevier Science Publishing Co., New York.

WEN, H., X. LAN, T. CHENG, N. HE, K. SHIOMI, Z. KAJIURA (2009):
Sequence structure and expression pattern of a novel anionic defensin-like gene from silkworm (*Bombyx mori*).
Mol. Biol. Rep. 36: 711-716

WESTHEIDE, W., R. RIEGER (2010):
Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere. 2. Aufl.
Spektrum Akademischer Verlag. München.

WITT, K.A., K. S. MARK, S. HOM, T.P. DAVIS (2003):
Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: 2820-2831

WORKENHE, S. T., M. L. RISE, M. J. T. KIBENGE, F. S. B. KIBENGE (2010):
The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses.
Molecular Immunology, doi:10.1016/j.molimm.2010.06.009

ZEISSIG, S., N. BÜRCEL, D. GÜNZEL, J. RICHTER, J. MANKERTZ, U. WAHNSCHAFFE, A. J. KROESEN, M. ZEITZ, M. FROMM, J.-D. SCHULZKE (2007):
Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease.
Gut 56: 61-72

ZHAO, C., I. WANG, R. I. LEHRER (1996):
Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells.
FEBS Lett. 396: 319-322

ZHAO JG, ZHOU L, JIN JY, ZHAO Z, LAN J, ZHANG YB (2009):
Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF- κ B and Sp1 of a medaka b-defensin.
Dev Comp Immunol 33: 624-637

ZOU, J., C. MERCIER, A. KOUSSOUNADIS, C. SECOMBES (2007):
Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish.
Molecular Immunology 44: 638-647

CURRICULUM VITAE

Zur Person

Geburtstag und –ort: 06. Juli 1975, Hannover
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Berufliche Erfahrungen

1998 – heute Tierärztliche Hochschule Hannover, Lehrtätigkeiten:

Vorlesung „Biologie der Fische“ im Rahmen der Wahlpflichtveranstaltung für Studierende der Veterinärmedizin

Betreuung des Grundstudium-Kurses „Spezielle Zoologie I – Wirbeltierbestimmungskurs“ für den Studiengang Biologie

Vorlesung und Betreuung des Grundstudium-Kurses „Spezielle Zoologie II – anatomisches Grundpraktikum“ für die Studiengänge Biologie, Biochemie und Tiermedizin

Planung, Vorbereitung und Betreuung des Hauptstudium-Kurses „Vergleichende Anatomie der Vertebraten“ für den Studiengang Biologie

Planung, Vorbereitung und Betreuung des Hauptstudium-Kurses „Mikrokosmen als limnologische Modellsysteme“ für den Studiengang Biologie

Leitung von diversen Exkursionen zur einheimischen Fauna und zur Gewässerökologie im Rahmen des Biologiestudiums

Mitwirkung bei der Planung, Vorbereitung und Durchführung von Hauptpraktikumskursen zur Populationsökologie

2007 Gewässerökologisches Monitoring des Arnumer Sees im Auftrag des „Naturerholungspark Arnumer See“

2002 – 2003 Mitwirkung bei der Erstellung gewässerökologischer Gutachten in den Bereichen Ichthyofauna, Herpetofauna und Makrozoobenthos

2001 – 2002 Durchführung von Kartierungen von Amphibien- und Libellenvorkommen für die Erstellung ökologischer Gutachten. Büro für angewandte Biologie, Hesse, als freier Mitarbeiter

Vorträge, Publikationen

Fortbildungsveranstaltung „Fischkrankheiten und Fischhaltung“ für Veterinäre und Fischhalter (2007+2008), Vortrag: „Der Teich im Wandel der Jahreszeiten“.

Vortrag im Rahmen der Lehrveranstaltung „Vergleichende Anatomie der Vertebraten“ für den Studiengang Biologie (2005-2007): „Gefährdung des Europäischen Aals (*Anguilla anguilla*) durch den Schwimmblasenparasiten *Anguillicola crassus*“.

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie in Köln 2003; Vortrag: „Nutzung flussangebundener Abgrabungsgewässer durch die Ichthyofauna“.

Hübner, A.; Meyer, K.; Steinhagen, D.(2006): Experimentelle Infektion von Karpfen mit dem Koi-Herpesvirus. In: Wahli, T.; Segner, H.; Schmidt-Posthaus, H.; Bernet, D. (Hrsg.) Gesunde Fische überall: CD zur/Tagungsband zur XI. Gemeinschaftstagung der Deutschen, der Österreichischen und der Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP) [CD-ROM] Murten, Schweiz, 11.-13.10.2006; Bern: Zentrum für Fisch- und Wildtiermedizin, Universität Bern, 2007, S. V 27;217-222

Hübner, A. (2003): Flussangebundene Abgrabungsgewässer: Eignung als Ersatzgewässer für Auen? Nutzung flussangebundener Abgrabungsgewässer durch die Ichthyofauna. DGL Tagungsband 2003

Studium

03/2005 – lfd.

Promotionsstudium am Institut für Parasitologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Promotionsthema: Untersuchungen an der Schleimhaut von Fischen als Infektionsbarriere

06/2001 – 06/2003

Diplomarbeit zum freilandökologischen und fischereibiologischen Thema:

„*Untersuchungen zum Jungfischauftreten in drei Kiesseen an der Nienburger Mittelweser – Einfluss von Uferstrukturen und Makrophyten auf Wachstum und Verbreitung. - Cyprinidae -*“ (Note 1,0)

10/1996 – 06/2003

Studium der Biologie an der Leibniz Universität Hannover
Abschluss „Diplom-Biologe“, Note „sehr gut“ (1,1)

06/2001

Diplomprüfung

Fächerkombination: Zoologie (Note 1,0)
Ökologie (Note 1,3)
Paläontologie (Note 1,3)
Hydrobiologie (Note 1,0)

Wehrdienst

10/1995 – 07/1996

1. Feldjägerbataillon 720, Sanitätsdienst

Schulbildung

07/1988 – 06/1995

Gymnasium Sarstedt

Abschluss: Abitur

Note: „gut“ (2,0)

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. Dieter Steinhagen danke ich sehr herzlich nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern auch für seine große Hilfsbereitschaft, die freundschaftliche Atmosphäre und seine nicht enden wollende Geduld, die er mir während meiner Zeit als Doktorand entgegen gebracht hat. Sein hervorragender fachlicher Rat sowie sein Vertrauen und Zuspruch waren für mich eine große Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Wilfried Meyer danke ich für die Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Dissertation und für die Möglichkeit, einen entscheidenden Teil meiner Arbeit in der Arbeitsgruppe Histologie anfertigen zu dürfen sowie für die von ihm entgegengebrachte unvoreingenommene Unterstützung, Herzlichkeit und manchen wertvollen Rat.

Bei Marion Gähle und Doris Walter möchte ich mich bedanken für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Histologie, die unerschöpfliche Hilfsbereitschaft bei der Herstellung der Präparate und Reaktionen sowie nicht zuletzt für die ausgesprochen angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit, die mir unvergesslich bleiben wird.

Birgit Luckardt danke ich für die Zeit der Einarbeitung im Labor, ihre stetige Hilfe und für manches anregende Gespräch.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Fischkrankheiten, insbesondere Dr. Verena Jung-Schroers, Marian van der Marel, Dr. Agnes Baumer, Dr. Henner Neuhaus, Dr. Kirsten Meyer, Dr. Uta Reimers, Dr. Julia Negenborn, Karina Retter, Patricia Lowles, sowie Mikolaj Adamek, den „Jameses“, Harry George, Graham Brogden, Sandra Oortgiese und Andreas Hustedt danke ich für eine wunderbare Zeit und für die interessante und produktive Zusammenarbeit von Biologen und Tiermedizinern.

Besonders Marc Fabian und Christian Strube danke ich darüber hinaus für ihre Hilfe und Unterstützung sowie manches aufmunternde Gespräch und offene Ohr auch außerhalb des Dienstbetriebes.

Danksagung

Meinen Freunden und Kollegen René Focke, Oliver Schaper, Armin Blöchl, Mieke Braune, Sönke von den Berg und Andreas Hentrich danke ich für ihre langjährige Freundschaft, viele unvergessliche gemeinsame Erlebnisse und für jede Gelegenheit, auch der klassischen Biologie treu bleiben zu können.

Mein letzter und tiefster Dank gilt meiner Familie, die mir stets der wichtigste Rückhalt war, die nie an mir gezweifelt hat und ohne deren Unterstützung in allen Belangen ich den zurückliegenden Weg nicht hätte gehen können.

Dankeschön!

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben habe.

Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Ergebnisse der Western Blottings wurden von Graham Brogden (Institut für Pathologie, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung, TiHo Hannover) angefertigt.

Diese Dissertation wurde nicht bereits als Diplomarbeit verwendet und ist vor Abgabe nicht veröffentlicht worden.

Pattensen, 06. 01. 2012
