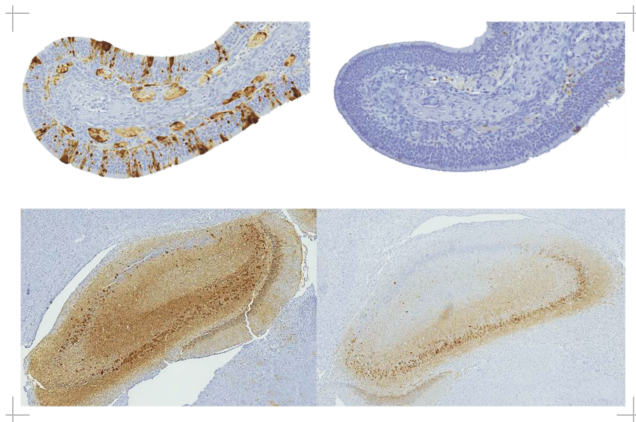


Sabrina Munsch

Charakteristik der intranasalen Infektion mit
neurotrophen Bornaviren unter Berücksichtigung
antiviraler Interventionsstrategien



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2021

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2021

© 2021 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christiane Herden

**Charakteristik der intranasalen Infektion mit neurotrophen Bornaviren unter
Berücksichtigung antiviraler Interventionsstrategien**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sabrina Munsch (geb. Becker)

Tierärztin aus Limburg an der Lahn

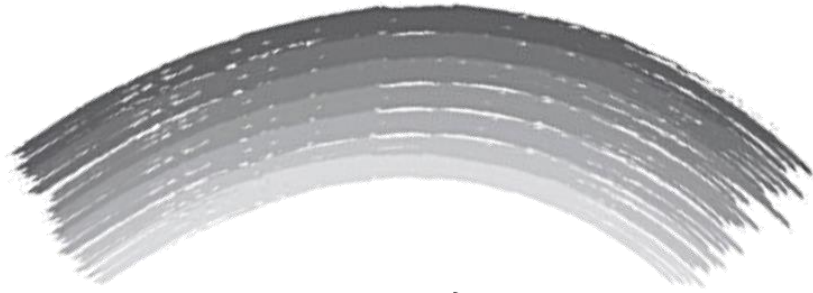
Gießen 2021

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. habil. C. Herden
Prof. Dr. F. Weber

Tag der Disputation: 25.08.2021



somewhere over the rainbow

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Kongressbeiträge präsentiert:

Becker S., Garten W., Steinmetzer T., Herden C. (2018). Inhibition of Borna disease viral spread by a furin inhibitor in vitro and in vivo. RNA virus persistence meeting: mechanisms and consequences, Institute of Virology, Medical Center - University of Freiburg, Freiburg im Breisgau, 2018.

Becker S., Garten W., Steinmetzer T., Herden C. (2018). Inhibition of Borna disease viral spread by a furin inhibitor in vitro and in vivo. National Symposium on Zoonoses Research. Joint meeting of the National Research Platform for Zoonoses and the Research Network of Zoonotic Diseases, Berlin, 2018.

Kupke A., Becker S., Wewetzer K., Ahlemeyer B., Eickmann M., Herden C. (2019). Intranasal Borna disease virus (BoDV-1) infection: insights into initial steps and potential contagiousity. International Journal of Molecular Sciences. 20(6). DOI: 10.3390/ijms20061318.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	4
2.1 DAS OLFAKTORISCHE SYSTEM	4
2.1.1 Anatomie und Physiologie	4
2.1.2 Intranasale Virusinfektionen des ZNS und ihre Mechanismen	14
2.2 DIE ENDOPROTEASE FURIN	15
2.2.1 Vorkommen und Funktion	15
2.2.2 Bekannte Furininhibitoren und ihre Anwendungsgebiete	18
2.3 DIE BORNASCHE KRANKHEIT	30
2.3.1 Bornaviren	31
2.3.2 Klinik	44
2.3.3 Wirtsspektrum, Epidemiologie und Pathogenese	46
2.3.4 Experimentelle BoDV-1-Infektion von Ratten	55
3 MATERIAL UND METHODEN	59
3.1 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL	59
3.1.1 Beschichtung der Deckgläschen	59
3.1.2 Kulturbedingungen	60
3.1.3 Präparation der Dissoziationskultur	60
3.1.4 Inhibitor-Anwendung an der Dissoziationskultur nach BoDV-1-Infektion	62
3.1.5 Nachweis viraler RNA mittels quantitativer real time RT-PCR	65
3.2 ROLF B1.T – KULTUR PERMANENTER ADULTER OLFAKTORISCHER HÜLLZELLEN DER RATTE	71
3.2.1 Kultur	72
3.2.2 Inhibitor-Anwendung nach BoDV-1-Infektion	74
3.2.3 Nachweis viraler RNA mittels quantitativer real time RT-PCR	76
3.3 EXPERIMENTELLE INTRANASALE INHIBITOR-ANWENDUNG BEI BoDV-1-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN	76
3.3.1 Intranasale BoDV-1-Infektion und Inhibitor-Anwendung bei adulten Ratten	76
3.3.2 Pathohistologische Untersuchung der Versuchstiere	81
3.3.3 Immunhistologische Untersuchung der Gewebe	82
3.3.4 Nachweis viraler und genomischer RNA mittels quantitativer real time RT-PCR in der Nase und im Gehirn	86
3.4 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG AUF ZELLTOD BEI EXPERIMENTELL INTRANASAL BoDV-1- UND MOCK-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN	88
3.4.1 Probenmaterial	88
3.4.2 Immunhistologischer Nachweis von aktivierter Caspase 3	88
3.4.3 Immunhistologischer Nachweis von AIF	89
3.4.4 Auswertung der Daten aus der immunhistologischen Untersuchung	90
3.4.5 Statistische Analyse der Daten aus der immunhistologischen Untersuchung	90
4 ERGEBNISSE	91
4.1 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL	91
4.1.1 Inhibitor-Anwendung nach BoDV-1-Infektion	91
4.1.2 Nachweis viraler genomischer RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA)	98
4.2 ROLF B1.T – KULTUR PERMANENTER ADULTER OLFAKTORISCHER HÜLLZELLEN DER RATTE	99

4.2.1	Immunhistologischer Nachweis von p75.....	99
4.2.2	Infektion mit BoDV-1	100
4.2.3	Einfluss der Beschichtung auf das Zellwachstum und die Infektionsrate	102
4.2.4	Inhibitor-Anwendung nach BoDV-1-Infektion.....	104
4.2.5	Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA	106
4.2.6	Vergleichende statistische Untersuchung zum Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA <i>in-vitro</i>	107
4.3	EXPERIMENTELLE INTRANASALE INHIBITOR-ANWENDUNG BEI BoDV-1-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN.....	109
4.3.1	Klinik der Versuchstiere.....	109
4.3.2	Pathohistologische Befunde	110
4.3.3	Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N	111
4.3.4	Nachweis viraler genomischer RNA und viraler messenger RNA in der Nase und im Gehirn der Versuchstiere	129
4.4	IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ZUM NACHWEIS DES ZELLTODS BEI EXPERIMENTELL INTRANASAL BoDV-1- UND MOCK-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN.....	134
4.4.1	Immunhistologischer Nachweis von aktivierter Caspase 3 und AIF	134
5	DISKUSSION	137
5.1	WIRKUNG DES FURININHIBITORS MI-0701 AUF DIE BoDV-1-INFEKTION <i>IN-VITRO</i>	139
5.2	WIRKUNG DES FURININHIBITORS MI-0701 AUF DIE BoDV-1-INFEKTION <i>IN-VIVO</i>	147
5.2.1	Vergleichende Klinik und pathohistologische Befunde von Nase und Gehirn der Versuchstiere	148
5.2.2	Effekte des Inhibitors MI-0701 auf die Infektionsrate im olfaktorischen System	149
5.2.3	Effekte des Inhibitors MI-0701 auf die Infektionsrate im Gehirn	150
5.2.4	Korrelation des Nachweises von BoDV-1-N, viraler genomischer RNA und viraler messenger RNA	152
5.3	IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ZUM NACHWEIS DES ZELLTODS.....	154
5.3.1	Einfluss der BoDV-1-Infektion auf den Zelluntergang im olfaktorischen Epithel	155
5.4	VERGLEICHENDE SCHLUSSBETRACHTUNG DER <i>IN-VITRO</i> - UND <i>IN-VIVO</i> -ERGEBNISSE	155
6	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	158
6.1	Zusammenfassung	158
6.2	Summary	162
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	166
8	ANHANG.....	215
8.1	LÖSUNGEN UND PUFFER	215
8.1.1	Histologie	215
8.1.2	Immunhistologie und Immunfluoreszenz	215
8.2	BEZUGSQUELLEN.....	217
8.3	TABELLEN	221
8.3.1	Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels	221
8.3.2	ROLF B1.T – KULTUR PERMANENTER ADULTER OLFAKTORISCHER HÜLLZELLEN DER RATTE	226

8.3.3	Experimentelle intranasale BoDV-1-Infektion und intranasale Inhibitor-Anwendung an Lewis-Ratten	228
8.3.4	Immunhistologische Untersuchung zum Vorkommen von Zelltod bei experimentell intranasal BoDV-1- und Mock-infizierten Lewis-Ratten.....	239
8.4	ABKÜRZUNGEN	241
8.5	TABELLENVERZEICHNIS.....	243
8.6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	244

1 EINLEITUNG

Das Borna disease virus 1 (BoDV-1; Spezies Mammalian 1 Orthobornavirus, Familie *Bornaviridae*) ist der Erreger der Bornaschen Krankheit, einer in bis zu 90 % der Fälle tödlich verlaufenden neurologischen Erkrankung bei Pferden, Schafen und anderen Säugetieren in Süd- und Ostdeutschland, Österreich, der Schweiz und Liechtenstein (ZWICK, SEIFRIED, 1925; ZWICK, 1939; BRIESE *et al.*, 1994; DE LA TORRE, 1994). Die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) ist das einzige bekannte natürliche Reservoir des BoDV-1 (HILBE *et al.*, 2006; BOURG *et al.*, 2013). Das Virus führt in diesem Wirt zu einer persistierenden Infektion mit einem außergewöhnlich breiten Gewebetropismus, aber ohne offensichtliche klinische Erkrankung (DÜRRWALD *et al.*, 2006; NOBACH *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu ist das Virus bei Fehlwirten wie Pferden und Schafen neurotrop und verursacht eine T-Lymphozyten-vermittelte Meningoenzephalomyelitis (ROTT, BECHT, 1995; LEBELT, HAGENAU, 1996). Das zoonotische Potenzial von BoDV-1 ist seit Jahrzehnten Gegenstand einer wissenschaftlichen Auseinandersetzung (ROTT *et al.*, 1985; RICHT *et al.*, 1997; SCHWEMMLE *et al.*, 1999; LIEB, STAEHELI, 2001; RICHT, ROTT, 2001; LUDWIG, 2008). Das Potenzial von Säugetier-Bornaviren rückte in Deutschland mit der Entdeckung des variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1; Spezies Mammalian 2 Orthobornavirus) im Jahr 2015 wieder in den Fokus der Wissenschaft, als es nach der Übertragung dieses Virus von exotischen Bunthörnchen auf den Menschen zu tödlichen Enzephalitiden kam (HOFFMANN *et al.*, 2015; TAPPE *et al.*, 2018). Im Jahr 2018 wurde dann das klassische BoDV-1 erstmals in Fällen von Patienten mit Enzephalitis nachgewiesen (FLI, 2018; KORN *et al.*, 2018; SCHLOTTAU *et al.*, 2018). Das Virus konnte neben aktuellen Krankheitsfällen auch in archivierten Fällen bestätigt werden (LIESCHE *et al.*, 2019; NILLER *et al.*, 2020). Eine spezifische Therapie gegen Bornavirus-Infektionen gibt es zum aktuellen Zeitpunkt nicht, sodass die Behandlung aus unterstützenden Maßnahmen mit intensivmedizinischer Betreuung besteht (RUBBENSTROTH *et al.*, 2019).

Das virale Glykoprotein der Bornaviren spielt eine besondere Rolle bei der Aufnahme von Viruspartikeln durch die Wirtszelle (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; PEREZ *et al.*, 2001; BAJRAMOVIC *et al.*, 2003). Es ist verantwortlich für die Anlagerung an

zelluläre Rezeptoren und ist involviert in die initiale Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Wie bei einigen anderen behüllten Viren, ist auch bei dem Borna disease virus 1 die Virusfusion und so auch die Infektiosität maßgeblich abhängig von der proteolytischen Spaltung eines Vorläufermoleküls durch Furin (KLENK, ROTT, 1988; RICHT *et al.*, 1998). Der Inhibitor MI-0701 ist ein Pentapeptid-Mimetikum von Furin (BECKER *et al.*, 2012) und wurde bereits erfolgreich in mit Influenzaviren, Alphaviren, Flaviviren sowie mit dem Borna disease virus 1 infizierten Zelllinien zur Hemmung der Spaltung des viralen Glykoproteins eingesetzt (BAYER, 2010; BECKER *et al.*, 2010; LABITZKE, 2011; KEHR, 2016; LENNARTZ *et al.*, 2016; HARDES *et al.*, 2017; KOURETOVA *et al.*, 2017).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des Furininhibitors MI-0701 auf die intranasale Infektion der Ratte mit dem Borna disease virus 1. Daten aus vorangegangenen *in-vitro*-Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf das zentrale Nervensystem (KEHR, 2016; LENNARTZ *et al.*, 2016), solche zu Untersuchungen am olfaktorischen System sind nicht vorhanden. *In-vivo*-Untersuchungen mit dem Inhibitor an BoDV-1-infizierten Tieren wurden bislang nicht durchgeführt. Das Promotionsvorhaben leistet somit einen essentiellen Beitrag zum Verständnis der initialen Phasen intranasaler Infektionen mit neurotrophen Viren und möglicher antiviraler Therapieansätze bislang unzulänglich behandelbarer neurotroper Virusinfektionen. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung der initialen Vermehrung des BoDV-1 sowie der initial infizierten Zellen des olfaktorischen Epithels. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf den die olfaktorischen Nervenfasern umhüllenden *olfactory ensheathing cells* (OEC) liegen, vorherige Untersuchungen ließen eine zentrale Bedeutung bei der Pathogenese der Bornaschen Krankheit vermuten (HARRIS *et al.*, 2009; KUPKE, 2016; KUPKE *et al.*, 2019).

Die Mechanismen der weiteren Virusverbreitung bei der BoDV-1-Infektion in das Gehirn sind bislang nur unzulänglich verstanden. Sowohl der kontrollierte als auch der unkontrollierte Zelltod haben eine wichtige Funktion in der Homöostase des olfaktorischen Epithels (MAGRASSI, GRAZIADEI, 1995). Auch virale Infektionen können dieses System beeinflussen und zu einem vermehrten Untergang der Zellen führen (BI *et al.*, 1995; GEIGER *et al.*, 1997; SAMMIN *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob auch die intranasale BoDV-1-Infektion einen Einfluss auf den Zelltod des olfaktorischen Epithels hat.

Die Wahrnehmung von Gerüchen ist einer der phylogenetisch ältesten Sinne des lebenden Organismus und dient im Tierreich, neben der Orientierung in der Umgebung und dem Auffinden und Erkennen von Nahrung, der intra- und interspezifischen Kommunikation (MASON, 1959; CHEAL, SPROTT, 1971; MORRIS, UDRY, 1978). Die olfaktorischen Nerven können aber auch durch ihre exponierte Lage und ihren direkten Zugang zum zentralen Nervensystem als Eintrittspforte von Viren wie zum Beispiel Influenzaviren (MORI *et al.*, 2002; ARONSSON *et al.*, 2003), Herpesviren (GOSZTONYI *et al.*, 2009; EL-HABASHI *et al.*, 2010), Tollwutviren (CONOMY *et al.*, 1977; LAFAY *et al.*, 1991) und auch Bornaviren (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988) ins Gehirn dienen. Auch das Ende 2019 entdeckte, neuartige Coronavirus SARS-CoV-2, das zu einem Ausbruch einer ungewöhnlichen Pneumonie und einer weltweiten Pandemie führte, kann nach bisherigen Untersuchungen neurotrop sein, das olfaktorische Epithel scheint als ein möglicher Teil der Infektionsroute zu dienen (DOSSANTOS *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2020; XU, LAZARTIGUES, 2020). Daher sind Untersuchungen der intranasalen Vermehrung von Viren, die das zentrale Nervensystem über das olfaktorische Epithel infizieren können, von hochaktueller Bedeutung.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 DAS OLFAKTORISCHE SYSTEM

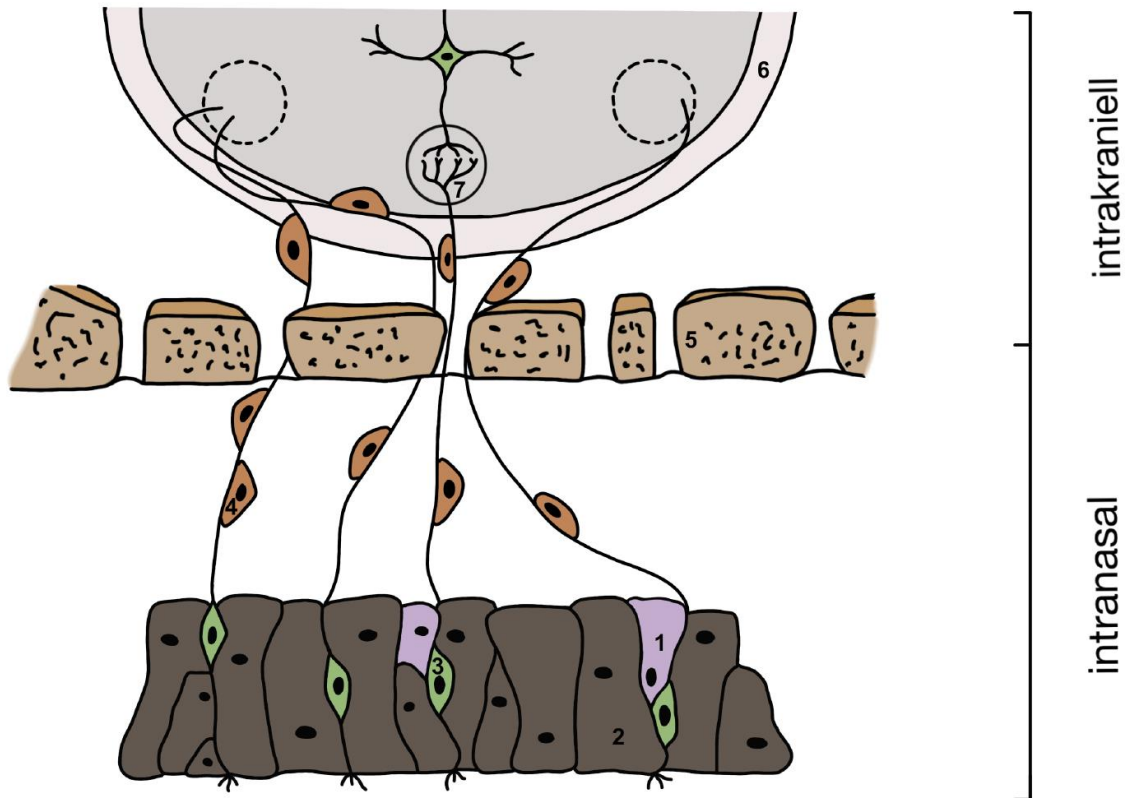
Die Wahrnehmung von Gerüchen ist einer der phylogenetisch ältesten Sinne des lebenden Organismus und dient im Tierreich, neben der Orientierung in der Umgebung und dem Auffinden und Erkennen von Nahrung, der intra- und interspezifischen Kommunikation (MASON, 1959; CHEAL, SPROTT, 1971; MORRIS, UDRY, 1978). Als Reize dienen flüchtige Substanzen in Gasform, welche bei Erreichen einer stoff- und speziesspezifischen Mindestkonzentration eine Erregung der Riechzellen im olfaktorischen Epithel auslösen (KARLSON, LUSCHER, 1959; LOMBARDI, VANDENBERGH, 1977). Die Empfindlichkeit des Geruchssinns korreliert mit der Gesamtgröße der Riechschleimhaut und damit mit der Zahl von Sinneszellen. Während die Riechschleimhaut beim Menschen eine Fläche von etwa 5 cm² hat, auf der sich etwa 15 Millionen Riechzellen befinden (ESCADA *et al.*, 2009) und er somit zu den Mikrosmatikern zählt, besitzen der Dackel circa 75 cm² und der Schäferhund als Makrosmatiker etwa 150 cm² Riechfläche mit 125 bzw. 250 Millionen Sinneszellen (JEZIERSKI *et al.*, 2016; JENKINS *et al.*, 2018).

2.1.1 Anatomie und Physiologie

Während der Hauptteil der Nasenhöhle (Cavum nasi) mit einem mehrreihigen, hochprismatischen und flimmertragenden respiratorischen Epithel (Flimmerepithel) ausgekleidet ist, sind die kaudalen Teile der Siebbein- und Nasenmuscheln sowie des Nasenseptums mit einem mehrreihigen, hochprismatischen und zilientragenden olfaktorischen Epithel (Riechepithel) überzogen (READ, 1908).

Das olfaktorische System kann anatomisch in einen peripheren und einen zentralen Abschnitt unterteilt werden, wobei beide Teile über die fenestrierte Lamina cribrosa des Siebbeins miteinander in Verbindung stehen (schematische Darstellung in Abb. 1).

Abb. 1: Schematische Darstellung des intranasalen/peripheren und intrakraniellen/zentralen Teils des olfaktorischen Systems

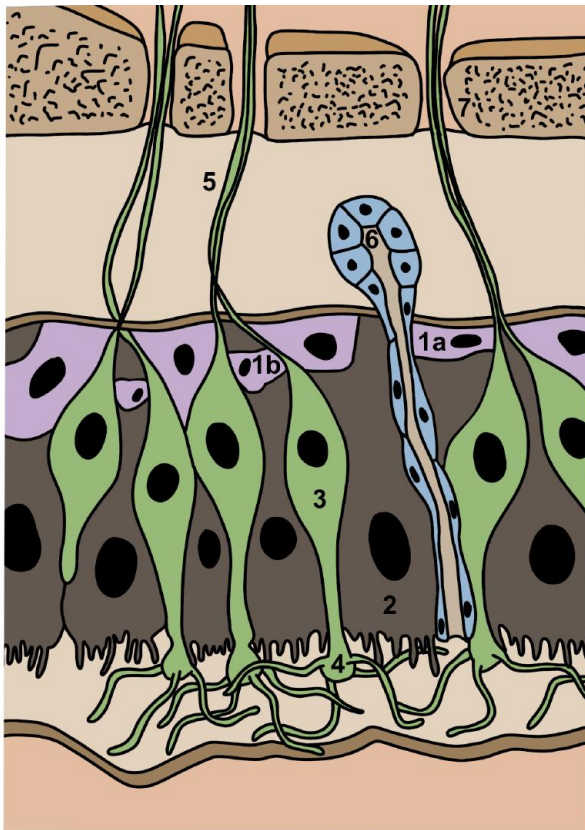


Bildbeschriftung: 1: Basalzelle; 2: Stützzelle; 3: olfaktorisches Neuron; 4: olfaktorische Hüllzelle; 5: Lamina cribrosa; 6: Bulbus olfactorius; 7: Glomerulum olfactorium

Das peripher gelegene olfaktorische Epithel hat die Aufgaben der Reizleitung, Geruchserkennung, Signalübertragung und der initialen Kodierung inne (CHOI, GOLDSTEIN, 2018) und setzt sich charakteristischerweise aus den folgenden drei Zelltypen zusammen (Abb. 2):

1. Basalzellen
2. Stützzellen
3. olfaktorische Neurone

Abb. 2: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels



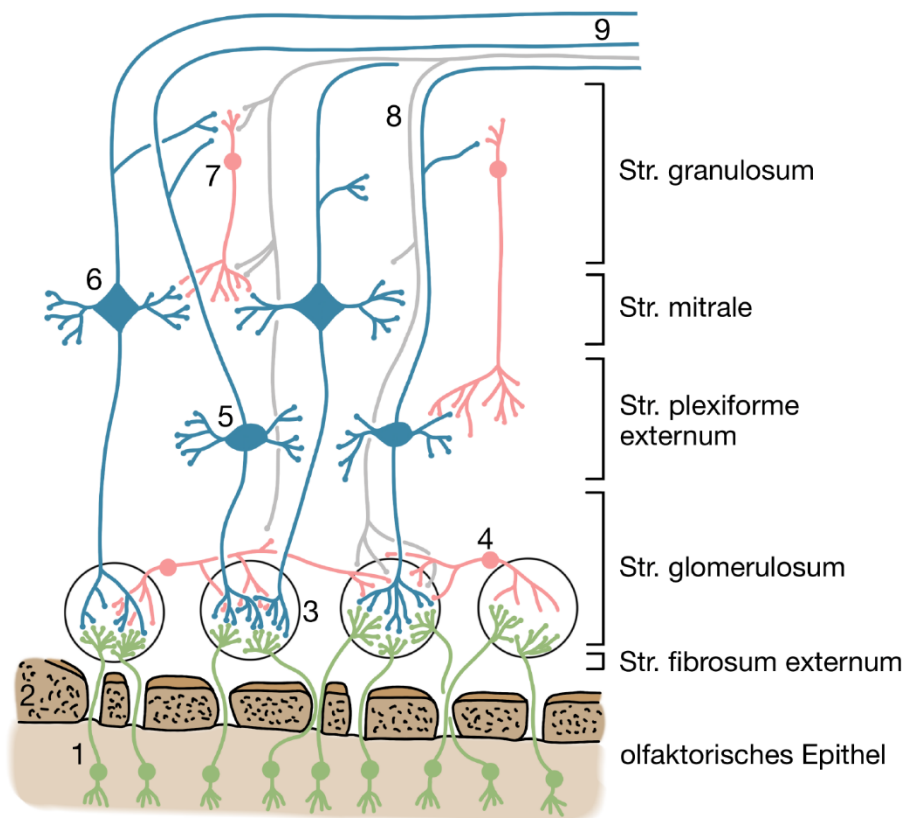
Bildbeschriftung: 1a: horizontale Basalzellen; 1b: proliferierende Basalzelle; 2: Stützzelle; 3: olfaktorisches Neuron; 4: olfaktorisches Vesikel mit olfaktorischen Zilien; 5: Axon des olfaktorischen Neurons Richtung Bulbus olfactorius; 6: Bowman Drüse; 7: Lamina cribrosa

Die der Basalmembran aufliegenden Basalzellen (*basal cells*) gestalten als undifferenzierte Stammzellen die Selbsterneuerung des Gewebes (SCHWOB *et al.*, 2017). Anhand ihrer Regenerationsfähigkeit werden zwei Arten von Basalzellen unterschieden, die proliferierenden Basalzellen (*globose basal cells*), welche permanent aktive Vorläuferzellen der olfaktorischen Neurone und Stützzellen darstellen und die horizontalen Basalzellen (*horizontal basal cells*), welche gewöhnlich mitotisch inaktiv sind und nur nach Schädigung des Epithels zur Teilung aktiviert werden (CHOI, GOLDSTEIN, 2018).

Die hochprismatischen Stützzellen tragen Mikrovilli und verleihen dem Epithel Stabilität und der Regio olfactoria durch ihre Pigmentierung den charakteristischen Gelbton (MOULTON, BEIDLER, 1967; MORRISON, COSTANZO, 1992).

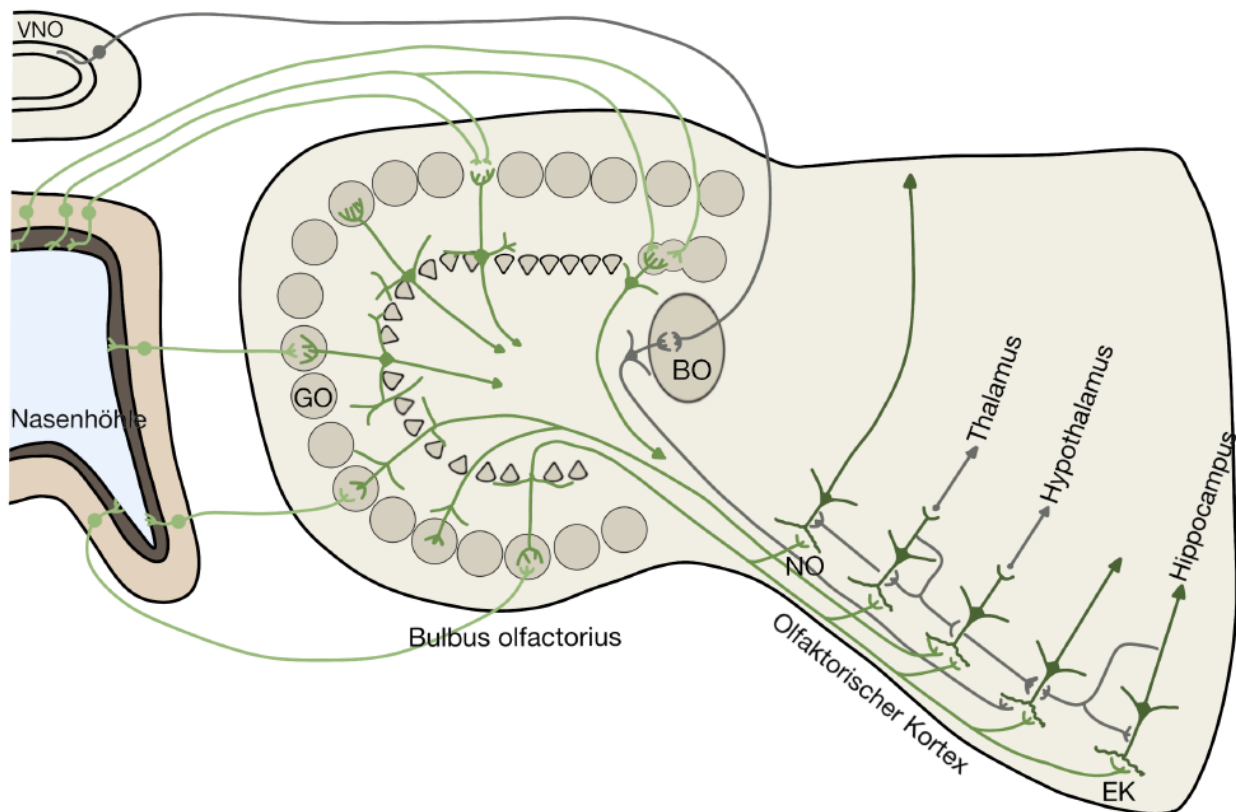
Die olfaktorischen Neurone (olfactory sensory neurons; OSNs) treten als primäre Sinneszellen mit den Odorantien in der Nasenhöhle in Kontakt und vermitteln Informationen von der Nasenhöhle zum Gehirn. Die Riechsinneszelle ist eine primäre bipolare Nervenzelle, die aufgrund ihrer rezeptorsekretorischen Eigenschaften häufig als Paraneuron gruppiert wird (FUJITA, 1977; FUJITA, KOBAYASHI, 1979). Mit den apikal orientierten dendritischen Fortsätzen, welche sich an der Epitheloberfläche zu zilientragenden olfaktorischen Vesikeln formieren, treten sie in Kontakt mit Duftstoffen. Diese Stoffe werden dort im von den Bowman-Drüsen sezernierten Mukus an spezielle Geruchsstoff-Bindungsproteine (odorant binding proteins; OBPs) gebunden und an den Rezeptoren, die von den ziliaren Membranen exprimiert werden, erkannt. Olfaktorische Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (heptahelikale Transmembranproteine), deren Aktivierung zur Depolarisation des Neurons führt (BUCK, AXEL, 1991; HOROWITZ *et al.*, 2014; CHOI, GOLDSTEIN, 2018). Die basal entlassenen, unmyelinisierten Axone der Riechsinneszellen ziehen, begleitet von olfaktorischen Hüllzellen (*olfactory ensheathing cells*: OECs, siehe 2.1.1.1), zusammen als Fila olfactoria (Riechfäden) durch die Lamina cribrosa des Siebbeins und endigen im Stratum glomerulosum des Bulbus olfactorius in dicht verästelten Endbäumchen, welche mit den Dendritenverzweigungen der Mitral- und Büschelzellen sowie der axonlosen Körnerzellen die kugeligen Glomerula olfactoria bilden (READ, 1908; ALLISON, 1953) (siehe Abb. 3). Riechsinneszellen haben eine durchschnittliche Lebensdauer von nur wenigen Wochen und werden fortwährend oder nach Schädigung durch Ausdifferenzierung von Basalzellen erneuert (FARBMAN, 1990; GOLDSTEIN, SCHWOB, 1996; LEUNG *et al.*, 2007). Ihre Verbindung zum zentralen Nervensystem wird so ständig neu gestaltet, wodurch sie in ihrer Funktion als Teil des adulten Nervensystems mit Regenerationspotential einzigartig im menschlichen und tierischen Organismus sind (CHOI, GOLDSTEIN, 2018; CRESPO *et al.*, 2019). Entsprechend ihrer anatomischen Lage mit direktem Kontakt zur Atemluft, sind die olfaktorischen Neurone stetig potentiellen Gefahren wie beispielsweise bakteriellen oder viralen Erregern oder auch Traumata ausgesetzt, die zu ihrer Degeneration oder ihrem Verlust führen können (KERN *et al.*, 2000; SEIDEN, 2004; CHOI, GOLDSTEIN, 2018).

Abb. 3: Schematische Darstellung des Bulbus olfactorius



Bildbeschriftung: 1: olfaktorisches Neuron; 2: Lamina cribrosa; 3: Glomerulum olfactorium; 4: äußere Körnerzelle; 5: Büschelzelle; 6: Mitralzelle; 7: innere Körnerzelle; 8: zentrifugale Fasern, 9: Tractus olfactorius

Während die Axone der peripheren Riechsinneszellen das erste von drei Neuronen der Riechbahn darstellen, werden die zweiten Neurone von den Mitral- und Büschelzellen als Projektionsneurone des Bulbus olfactorius nach ihrer Verschaltung in den Glomerula olfactoria gebildet. Die Axone ziehen gebündelt als Tractus olfactorius zum primären olfaktorischen Kortex (Cortex piriformis) sowie zum Nucleus olfactorius, zum Tuberculum olfactorium, zum Corpus amygdaloideum und zum Cortex entorhinalis. Die dritten Neurone projizieren für eine bewusste Geruchswahrnehmung im limbischen System vom Cortex piriformis unter anderem zum Thalamus und zum Hippocampus (siehe Abb. 4) (CORNWALL, PHILLIPSON, 1988; BUTLER, HODOS, 2005; DE LA ROSA-PRIETO *et al.*, 2015).

Abb. 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Merkmale der olfaktorischen Bahn

Bildbeschriftung: BO: Bulbus olfactorius; EK: entorhinaler Kortex (Cortex entorhinalis); GO: Glomerulum olfactorium; NO: Nucleus olfactorius; VNO: Vomerionasalorgan

Aufgrund der außergewöhnlich exponierten Lage des olfaktorischen Epithels gegenüber exogenen Faktoren wie Bakterien, Viren oder Pilzen, ist eine lokale Immunabwehr zum Schutz der Atemwege essentiell. Neben mechanischen Funktionen wie dem Flimmerepithel, welches Partikel in von lokalen Drüsen produziertem Mukus zum Nasopharynx transportiert (HILDING, 1967), spielt auch die gewundene Anatomie des sinonasalen Trakts eine wichtige Rolle (SHAARI *et al.*, 2006). Zusätzlich wirken Produkte der angeborenen Immunabwehr bei der lokalen Elimination von Pathogenen mit (SLEIGH *et al.*, 1988). Zu diesen Immunprodukten gehören neben reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO), die ebenfalls eine starke antimikrobielle Aktivität aufweisen, direkt antiorganische Verbindungen wie Defensine, Lactoferrin, Cathelicidine und Lysozym (PARKER, PRINCE, 2011).

Experimente von KALKALINKE *et al.* (2011) mit dem Vesikulären Stomatitis-Virus deuten zudem darauf hin, dass im Bulbus olfactorius ein Typ I Interferon-abhängiger Mechanismus zur Abwehr gegen eine virale Infektion existiert, dieser scheint jedoch abhängig von der Infektionsdosis zu sein (VAN DEN POL *et al.*, 2002). Zahlreiche indirekte Wege werden zudem aktiviert, welche durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen erworbene Immunreaktionen bedingen, indem sie Entzündungskaskaden auslösen (KNOWLES, BOUCHER, 2002). Zur Aktivierung der Abwehrmechanismen ist die Erkennung des Agens von wesentlicher Bedeutung, die genauen Mechanismen sind nicht vollständig verstanden. Toll-like Rezeptoren (TRLs) werden von Zellen der Atemwege exprimiert, erkennen pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) und bewirken eine proinflammatorische Immunantwort (HUME *et al.*, 2001). Auch sogenannte *solitary chemosensory cells* (SCC) (GULBRANSEN *et al.*, 2008; SAUNDERS *et al.*, 2014) können bei Stimulation zu einer Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Substanz P, vasoaktivem intestinalem Peptid (VIP) oder calcitonin gene-related peptide (CGRP) führen (MOSIMANN *et al.*, 1993; MENDONCA, DOLCI, 2005).

Der kontrollierte Tod neuronaler Zellen ist essentiell für die physiologische Entwicklung eines Nervensystems, aber auch verantwortlich für den Verlust von Neuronen, die durch neurodegenerative Erkrankungen, Ischämie oder Traumata geschädigt werden. In einem sich entwickelnden Embryo existieren besondere Regulationsmechanismen, um die Entwicklung und den Untergang von Neuronen zu steuern und eine normale Funktion zu gewährleisten. Postnatal ist das olfaktorische Epithel der einzige Teil des Nervensystems von Säugetieren, in dem viele dieser regulatorischen Mechanismen erhalten bleiben (CALOF *et al.*, 1996). Es gibt drei Haupttypen des morphologisch unterschiedlich in Erscheinung tretenden Zelltods, nämlich Apoptose, Autophagie und Parthanatos sowie untergeordnete Mechanismen wie Nekrose oder Nekroptose. Die drei Hauptformen können durch unterschiedliche und manchmal überlappende Signalwege ausgeführt werden, welche auf bestimmte Reize reagieren.

Die **Apoptose** wird ausgelöst, wenn Zelloberflächentodesrezeptoren wie Fas durch ihren Liganden gebunden werden (extrinsischer Weg) oder wenn proapoptotische Proteine der Bcl2-Familie die Permeabilisierung der mitochondrialen äußeren

Membran bewirken (intrinsischer Weg). Beide Pfade konvergieren bei der Aktivierung der Caspase-Protease-Familie, die letztendlich für den Abbau der Zelle verantwortlich ist (GALLUZZI *et al.*, 2012). Auch die olfaktorischen Neurone unterliegen der Apoptose, sowohl nach experimenteller Bulbektomie (MORRISON, COSTANZO, 1989), nach Nerven transektion (DOUCETTE *et al.*, 1983), bei normalem Umsatz (MAGRASSI, GRAZIADEI, 1995) und in der physiologischen Entwicklung (PELLIER, ASTIC, 1994). **Autophagie** definiert einen intrazellulären katabolischen Prozess, bei dem Teile des Zytosols und bestimmter Organellen von einer Doppelmembranstruktur (Autophagosom) umgeben werden, die schließlich abgebaut wird. Autophagie ist meist ein Überlebensmechanismus der Zelle bei Nährstoffmangel (KROEMER, LEVINE, 2008; SHEN *et al.*, 2012). Die Rolle dieser Art von Zelltod im olfaktorischen Epithel ist weitestgehend unklar (MEI *et al.*, 2020). **Parthanatos** ist eine Form des programmierten Zelltods, die sich von den anderen Zelltodprozessen unterscheidet, indem er durch die Akkumulation von poly-ADP-Ribose (PAR) und die nukleare Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus Mitochondrien verursacht wird. Das Enzym PARP1, welches z. B. durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird, führt dazu, dass AIF freigesetzt wird und in den Zellkern migriert, wo es dann zur DNA-Fragmentierung kommt (DEGTEREV, YUAN, 2008; VIRAG *et al.*, 2013). Die Rolle des Parthanatos im olfaktorischen Epithel ist bisher unklar, der genetisch veränderte Mausstamm „Harlequin“ (Hq), der eine Mutation im AIF-Gen trägt, zeigt unter anderem erhöhten oxidativen Stress im olfaktorischen Epithel (VAISHNAV *et al.*, 2008). Die **Nekrose** ist der klassische unkontrollierte Zelltod infolge eines irreversiblen, letalen Zellschadens. Sie ist charakterisiert durch eine schnelle Plasmamembranpermeabilisierung und einer lokalen Inflammation (MCCONKEY, 1998; KUMAR *et al.*, 2014).

2.1.1.1 Die Rolle der olfaktorischen Hüllzellen

Vergleicht man die Nervi olfactorii mit den anderen Kopfnerven, zeichnen sie sich durch die Besonderheit aus, dass ihre Axone nicht von Myelinscheiden umhüllt sind. Stattdessen werden die Axone ab dem Durchtritt durch die Basalmembran des olfaktorischen Epithels von einer für das olfaktorische System besonderen und für den Körper einzigartigen Art von Gliazellen begleitet, den *olfactory ensheathing cells*

(olfaktorische Hüllzellen, OECs). GASSER (1956) und DE LORENZO (1957) beschrieben diese Zellen erstmalig in den 1950ern als Schwann-Zell-ähnlich. Erst 1991 wurden sie dann aufgrund morphologischer und zytochemischer Eigenschaften von DOUCETTE (1991), VALVERDE und LOPEZ-MASCARAQUE (1991) und später von PIXLEY (1992a) als eigenständige, exklusiv im olfaktorischen System vorkommende Gliazellart definiert. Anatomisch begleiten die OECs die olfaktorischen Nervenfasern auf ihrem Weg zum Bulbus olfactorius bis zu dessen Stratum fibrosum externum, ihr Vorkommen in den olfaktorischen Glomeruli wird kontrovers diskutiert (VALVERDE, LOPEZ-MASCARAQUE, 1991; AU *et al.*, 2002; MILLER *et al.*, 2010); sicher ist nur, dass die terminalen Axone der Mitralzellen frei von sämtlicher glialer Umhüllung sind (RAMON-CUETO, AVILA, 1998). Ultrastrukturell handelt es sich bei den olfaktorischen Hüllzellen um spindel- bis sternförmige Zellen, deren unzählige Fortsätze die Bündel der olfaktorischen Axone umhüllen und die nach WILLIAMS *et al.* (2004) flüssigkeitsgefüllte, perineurale Kanäle bilden, ein anatomisches Modell findet sich bei LI *et al.* (2005a). Die Möglichkeit des Transfers infektiöser Agens wie z. B. Viren via dieser Kanäle wird diskutiert (LI *et al.*, 2005b; VAN RIEL *et al.*, 2015). Zytochemisch charakterisieren sich die Zellen durch die Expression astrozytärer Marker wie Vimentin, GFAP (glial fibrillary acidic protein) und S100 (FRANCESCHINI, BARNETT, 1996). Zusätzlich lassen sie sich, abhängig von der Ursprungsspezies und dem Alter (WEWETZER *et al.*, 2011) mit dem Schwann-Zell-Marker O4 (FRANCESCHINI, BARNETT, 1996) anfärben und exprimieren Neuropeptid Y (UBINK *et al.*, 1994), Nexin-1 (SCOTTI *et al.*, 1994) und den *low affinity nerve growth factor receptor* p75 (GONG *et al.*, 1994). Das Enzym CNPase (2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase), wird in den OECs der äußeren Nervenschicht des Bulbus olfactorius exprimiert (RADTKE *et al.*, 2011).

Die Hauptfunktion dieser der olfaktorischen Plakode entstammenden OECs (DOUCETTE, 1993) besteht darin, die olfaktorischen Nervenfasern auf ihrem Weg zum zentralen Nervensystem zu umhüllen und ein geeignetes Milieu für die Axone zu kreieren, um deren Wachstum zu unterstützen. Zusätzlich modellieren die Zellen durch die Expression selektiver Moleküle die Regeneration von Axonen im olfaktorischen System (DOUCETTE, 1993; RAMON-CUETO, AVILA, 1998; BOYD *et al.*, 2003) und sind als Quelle von Zytokinen und Interleukinen Teil der angeborenen Immunantwort, wodurch sie eine wichtige Rolle in der lokalen Immunabwehr gegen neurotrope Pathogene spielen (HARRIS *et al.*, 2009). Eine weitere Funktion der Hüllzellen ergibt

sich durch ihre Fähigkeit, Phagozytose betreiben zu können. So umhüllen sie den zellulären apoptotischen Debris, welcher aufgrund der kontinuierlichen Erneuerung des olfaktorischen Epithels im Rahmen des physiologischen Turnovers entsteht, in intrazytoplasmatischen „residual bodies“ (SU *et al.*, 2013). Aufgrund des ihnen zugeschriebenen hohen Regenerationspotentials haben die olfaktorischen Hüllzellen zuletzt ein hohes Maß an Aufmerksamkeit erreichen können.

Obwohl die olfaktorischen Hüllzellen *in-vivo* nicht in der Lage sind, Myelin zu bilden, können sie unter experimentellen Bedingungen, zum Beispiel bei der Kokultivierung mit dorsal root ganglion neurons, Myelinscheiden aufbauen (DEVON, DOUCETTE, 1992, 1995). Diese Eigenschaft macht die Zellen seit Jahrzehnten zu einem begehrten Forschungsobjekt der regenerativen Medizin und Neuropathologie. Pionierstudien aus den 1990er Jahren berichten, dass die Transplantation von OECs die axonale Regeneration im verletzten oder experimentell durchtrennten Rückenmark fördert (RAMON-CUETO, NIETO-SAMPEDRO, 1994; LI *et al.*, 1997; RAMON-CUETO *et al.*, 1998), wobei FRANKLIN *et al.* (1996) erstmals die Ausbildung von Myelinscheiden nach der Transplantation zeigen konnten. Aufgrund ihrer gesteigerten Migrationsneigung und der Fähigkeit, die wachsenden Axone zu unterstützen, eignen sich die OECs der Lamina propria für Regenerationsstudien besser als jene des Bulbus olfactorius (RICHTER *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2015; SCHROEDER *et al.*, 2016). Mehrere Autoren berichten über eine erfolgreiche und unbedenkliche Transplantation der Zellen in den tierischen oder menschlichen Körper nach Nervenschädigung (FRANKLIN *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997; IMAIZUMI *et al.*, 2000; RAMON-CUETO *et al.*, 2000) mit anschließender Verbesserung der neurologischen Symptome (LIMA *et al.*, 2010). Der praktische Nutzwert dieser Art von Transplantation zur Behandlung von Pathologien des zentralen Nervensystems wie Morbus Parkinson, Amyotropher Lateralsklerose (ALS) oder bei Schlaganfällen bleibt noch offen und ist Gegenstand der aktuellen Forschung (MACKAY-SIM *et al.*, 2008; CHOU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015; SCHROEDER *et al.*, 2016).

2.1.2 Intranasale Virusinfektionen des ZNS und ihre Mechanismen

Die olfaktorischen Nerven können, wie bereits erwähnt, durch ihre exponierte Lage und ihren direkten Zugang zum zentralen Nervensystem als Eintrittspforte für Viren, Neurotoxine und andere Xenobiotika ins Gehirn dienen. Auf gleichem Weg können sie jedoch auch als Zugang für therapeutische Substanzen genutzt werden, um so die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen (DOTY, 2008).

Viren verschiedenster Familien sind in der Lage, das olfaktorische System als Weg der Infektionsausbreitung bis in das zentrale Nervensystem zu nutzen. Für Viren wie beispielsweise Influenzaviren (MORI *et al.*, 2002; ARONSSON *et al.*, 2003; IWASAKI *et al.*, 2004; SCHRAUWEN *et al.*, 2012; VAN DEN BRAND *et al.*, 2012), Herpesviren (GOSZTONYI *et al.*, 2009; EL-HABASHI *et al.*, 2010; HARBERTS *et al.*, 2011), Paramyxoviren (RUDD *et al.*, 2006; DUPS *et al.*, 2012; MUNSTER *et al.*, 2012), das Vesikuläre Stomatitis Virus (SABIN, OLITSKY, 1938; REISS *et al.*, 1998; DETJE *et al.*, 2015), Tollwutviren (CONOMY *et al.*, 1977; LAFAY *et al.*, 1991), Adenoviren (YAMADA *et al.*, 2009), das West-Nil-Virus (MONATH *et al.*, 1983), das La-Crosse-Virus (BENNETT *et al.*, 2008) und Bunyaviren (MORI *et al.*, 2005) ist es bekannt, dass sie die olfaktorischen Nerven als Infektionsroute benutzen. Eine Übersicht ist bei MORI (2015) zu finden. Die Mechanismen dieser Virusverbreitung sind bislang nur unzulänglich verstanden. Als Möglichkeit wird neben der direkten Infektion der olfaktorischen Neurone über zellgebundene Rezeptoren mit nachfolgendem anterogradem Virus-Transport zum Bulbus olfactorius (VAN RIEL *et al.*, 2015; DURRANT *et al.*, 2016) auch die Diffusion viraler Partikel entlang der von olfaktorischen Hüllzellen geformten Kanäle diskutiert (OBERDORSTER *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005a). Die anschließende Verbreitung im zentralen Nervensystem kann dann beispielsweise über transsynaptischen Transport (IWASAKI *et al.*, 1985; SMITH, 2012) oder via Mikrofusion (YOUNG, RALL, 2009) geschehen. Die Schädigung des Nervensystems bei viraler Infektion kann durch eine primäre Entzündung, durch ausgelöste Immunprozesse oder durch eine Kombination aus beidem entstehen, dabei reichen die klinischen Symptome von nervalen Dysfunktionen bis hin zu schweren Meningoenzephalitiden und neurodegenerativen Erkrankungen (DOTY, 2008; DE CHIARA *et al.*, 2012; HEMACHUDHA *et al.*, 2013; VAN RIEL *et al.*, 2015). Auch für neurotrope Bornaviren wurde bereits in den 80er Jahren unter anderem von

CARBONE *et al.* (1987) und MORALES *et al.* (1988) eine olfaktorische Infektionsroute postuliert. Die Ergebnisse der eigenen *in-vivo*-Untersuchungen weisen ebenfalls auf eine intraaxonale Virusmigration hin (siehe 2.3.1.4).

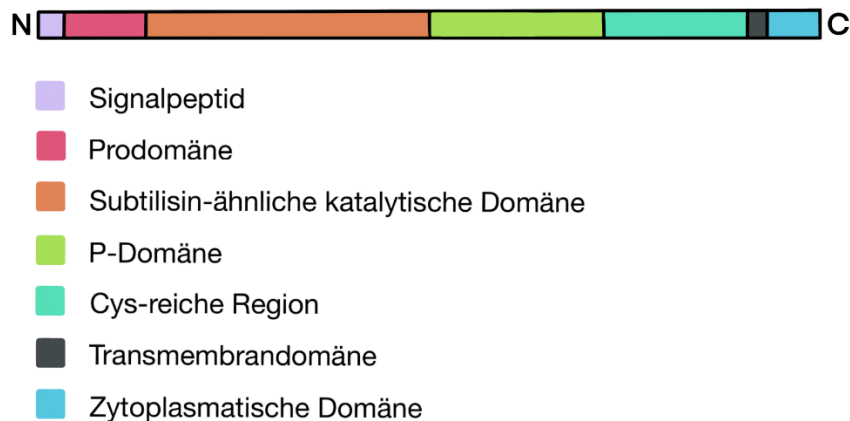
2.2 DIE ENDOPROTEASE FURIN

2.2.1 Vorkommen und Funktion

Furin ist eine Propeptidase und wurde 1989 als erster humaner Vertreter dieser Unterart von Proteasen entdeckt (FULLER *et al.*, 1989). Die Bezeichnung Propeptidase leitet sich dabei von den biochemischen Reaktionen ab, die diese Art von Enzym katalysiert. Sie sind für die posttranslationale proteolytische Reifung zahlreicher Vorläuferproteine, sogenannter Propeptide, zuständig. Die proteolytischen Enzyme lassen sich in Serin-, Metallo-, Cystein-, Aspartyl- und Threoninproteasen einteilen, wobei die rund 200 verschiedenen Serinproteasen etwa 1 % aller menschlichen Proteine ausmachen (TURK, 2006). Die meisten dieser Serinproteasen besitzen eine chymotrypsin- oder subtilisinartige Faltung. Furin selbst ist eine Serinprotease mit einem subtilisinartigen Faltungsmuster. Das Typ-I-Transmembranprotein kommt in allen Wirbeltieren und vielen wirbellosen Tieren vor (SEIDAH *et al.*, 1998; THACKER, ROSE, 2000; THOMAS, 2002), das entsprechende Gen wird ubiquitär im Körper exprimiert. Die Präproform des Enzyms entsteht als 794 Aminosäuren lange Vorstufe am rauen endoplasmatischen Retikulum. Sie besteht aus dem luminalen aminoterminalen Signalpeptid, der Prodomäne, der Subtilisin-ähnlichen katalytischen Domäne, der P-Domäne, der Cys-reichen Region, der Transmembrandomäne und der carboxyterminalen zytoplasmatischen Domäne (Übersicht in Abb. 5). Während das N-terminale Signalpeptid die Polypeptidkette in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums leitet und während der Translation abgespalten wird (ANDERSON *et al.*, 1997), wirkt die Prodomäne als intramolekulares Chaperon und ermöglicht die korrekte Faltung und Aktivierung der folgenden katalytischen Domäne (THOMAS, 2002). Im Anschluss daran findet am C-Terminus der Prodomäne die erste von insgesamt zwei intramolekularen, autokatalytischen Spaltungen statt (LEDUC *et al.*, 1992). Der Rest des ursprünglichen Propeptids wird über den Golgi-Apparat in das trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert. Dort findet im

sauren Milieu des TGN (pH 5,9) die zweite intramolekulare Spaltung statt (ANDERSON *et al.*, 1997). Die C-terminale, zytoplasmatische Domäne reguliert den Transport der nun aktiven Form zu intrazellulären Kompartimenten (Endosomen, Granula), zur Zellmembran oder zurück in das TGN (THOMAS, 2002).

Abb. 5: Schematische Darstellung der Präproform des Enzyms Furin [modifiziert nach IVANOVA (2017)]



Als Proproteinkonvertase aktiviert Furin viele endogene Vorläufer von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Enzymen, aber auch Pathogenitätsfaktoren viralen oder bakteriellen Ursprungs (THOMAS, 2002; PASQUATO *et al.*, 2013). Furin spaltet seine Substrate an multibasischen Sequenzen, in der Regel hinter Arginin, die Spaltstelle wird häufig als R-X-K/R-R bezeichnet, es können jedoch auch Variationen dieses Motives erkannt werden (BRAUN, SAUTER, 2019; VAN LAM VAN *et al.*, 2019). Beispiele für körpereigene Furinsubstrate sind Serumproteine, Gerinnungsfaktoren wie Pro-Faktor IX und X, Rezeptoren, Wachstumsfaktoren wie Pro-insulin-like growth factor (IGF) und Hormone (ROCKWELL *et al.*, 2002). Viele durch Proproteinkonvertasen katalysierte Reaktionen sind komplex und derzeit nur unvollständig untersucht. Die essentielle Bedeutung des Furins legten murine Knockout-Studien dar, hier führte eine gezielte Abschaltung des Gens bereits nach elf Tagen zum embryonalen Tod. Es ist bekannt, dass diverse Substrate des Furins eine wichtige Rolle in der Gewebsdifferenzierung und vor allem in der Vaskulogenese spielen (ELICES *et al.*, 1990; DUBOIS *et al.*, 1995; SEIDAH *et*

al., 1996; CUI *et al.*, 1998; CONSTAM, ROBERTSON, 2000; BERGERON *et al.*, 2003).

Neben physiologischen Funktionen ist Furin auch durch die Spaltung körpereigener sowie zellfremder Substrate in zahlreiche pathophysiologische Prozesse involviert (BENNETT *et al.*, 2000). Während Furin nachweislich in einigen Tumoren wie Plattenepithelkarzinomen, Glioblastomen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen überexprimiert ist (MBIKAY *et al.*, 1997; THOMAS, 2002), kann es als Wirtsprotease auch exogene Substrate wie bakterielle Toxine und virale Glykoproteine spalten (THOMAS, 2002; BONTEMPS *et al.*, 2007; PASQUATO *et al.*, 2013; COUTURE *et al.*, 2015). Auch die Mehrheit der viralen Glykoproteine enthält die Konsensussequenz R-X-K/R-R, die durch die Protease am C-terminalen Argininrest gespalten wird. Die Strukturen multibasischer Spaltstellen wurden mit der Spaltbarkeit mehrerer viraler Glykoproteine korreliert (GARTEN *et al.*, 1994), darunter unter anderem das Hämagglutinin der pathogenen aviären Influenzaviren (KAWAOKA, WEBSTER, 1988; VEY *et al.*, 1992), das F-Protein des Simian-Virus 5 (PATERSON *et al.*, 1989), das F-Protein des humanen Parainfluenzavirus Typ 3 (ORTMANN *et al.*, 1994) und das Glykoprotein B des humanen Cytomegalievirus (SPAETE *et al.*, 1990). Eine Übersicht inklusive der bekannten Spaltstellen findet sich bei GARTEN *et al.* (1994) und BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER *et al.* (2018).

Für bakterielle Toxine wie das Anthrax-Toxin, das Aerolysin von *Aeromonas hydrophila* und das *Clostridium septicum*- α -Toxin ist bekannt, dass sie durch extrazelluläres, membrangebundenes Furin der Wirtszelle prozessiert und so aktiviert werden. Bei all diesen Toxinen kommt es nach einer Interaktion mit Furin zum Eintritt der aktiven Form in das Zytosol, wo sich der toxische Wirkmechanismus einstellt (KLIMPEL *et al.*, 1992; GORDON *et al.*, 1997; ABRAMI *et al.*, 1998; THOMAS, 2002; PASQUATO *et al.*, 2013). Bei Abwesenheit von Furin kann das Toxin seine letale Wirkung verlieren (KLIMPEL *et al.*, 1992). Das Diphtherie- oder das Shigatoxin werden dagegen intrazellulär in den frühen Endosomen aktiviert, auch Influenza-Hämagglutinine und Vorläuferproteine einiger Flavi-, Filo- und Paramyxoviren werden im trans-Golgi-Netzwerk durch Furin gespalten (THOMAS, 2002; PASQUATO *et al.*, 2013).

Wie bereits erwähnt, sind Furin-vermittelte Spaltungen auch für die Infektiosität und Pathogenität vieler Viren notwendig. Furin aktiviert die fusogenen Oberflächenproteine verschiedenster Viren wie die der hochpathogenen Influenzaviren, der Masernviren, des Ebolavirus und einiger Flaviviren wie dem Dengue-Virus und dem West-Nil-Virus (PASQUATO *et al.*, 2013). Neueren Untersuchungen zufolge können auch Vertreter der Familie Alphaviridae auf diese Weise aktiviert werden (HARDES *et al.*, 2017). Behüllte Viren binden dabei zunächst über entsprechende Rezeptoren an die Zellmembran. Anschließend kommt es Furin-vermittelt entweder zur direkten Fusion der Virushülle mit der Zellmembran (z. B. bei Paramyxoviren und Bornaviren) oder erst nach endozytotischer Aufnahme zur Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran (z. B. bei hochpathogenen Influenzaviren). Nach der Fusion wird das virale Erbgut in die Wirtszelle freigesetzt.

Aufgrund seiner vielfältigen Funktionen in zahlreichen pathologischen Prozessen ist Furin ein attraktives Zielmolekül zur Wirkstoffentwicklung. Obgleich eine dauerhafte Hemmung möglicherweise zu Nebenwirkungen führt, ist eine kurzzeitige oder mittelfristige Therapie furinabhängiger Infektionen durchaus denkbar.

2.2.2 Bekannte Furininhibitoren und ihre Anwendungsgebiete

Anhand ihres Molekulargewichts und ihrer chemischen Struktur unterscheidet man die Furinhemmstoffe in Makromoleküle, Peptidderivate und nicht-peptidische Verbindungen (BASAK, 2005; BONTEMPS *et al.*, 2007). Während sich Makromoleküle meist von natürlich vorkommenden Hemmstoffen anderer Proteasen ableiten und deutliche inhibitorische Eigenschaften besitzen, machen ihr hohes Molekulargewicht und ihre eingeschränkte Stabilität sie zu einem wenig praktikablen Wirkstoff. Peptidderivate leiten sich von der Prodomäne der Proproteinkonvertasen ab. Durch rekombinante Expression in *Escherichia coli* wird die Prodomäne des Furins erhalten. Synthetisch hergestellte Prodomänen zeigen eine niedrige Hemmkonstante (K_i) (BASAK *et al.*, 2010) und zählen zu den effektivsten Verbindungen, die bisher bekannt sind (GARTEN *et al.*, 1994; JEAN *et al.*, 1998; JIAO *et al.*, 2006). Nicht-peptidische Derivate gelten in der Wirkstoffentwicklung aufgrund ihrer möglichen oralen Bioverfügbarkeit und einer stärkeren Wirksamkeit auch auf intrazelluläre Agentien als

vielversprechende Leitstruktur (JIAO *et al.*, 2006), sind bislang jedoch nur wenig erforscht.

Die bisher bekannten wirksamsten Furininhibitoren sind Peptidderivate, deren Struktur auf der Sequenz der Prodomäne des Furins basiert (BASAK *et al.*, 2009). Als einer der ersten Inhibitoren für Furin wurde im Jahr 1992 das decanoylierte Chlormethylketon Dec-RVKR-CMK entwickelt (HALLENBERGER *et al.*, 1992). Das substratanaloge Derivat agiert irreversibel mit dem Enzym und war zu jener Zeit einer der effektivsten Inhibitoren. Aufgrund seiner Instabilität in Lösungen eignete sich diese Struktur nur wenig für die Entwicklung von Wirkstoffen, wurde jedoch vielfach für initiale biochemische Testungen und Untersuchungen zur furinkatalysierten Spaltung eingesetzt (GARTEN *et al.*, 1994). Im Jahre 1995 konnten durch die Arbeiten von ANGLIKER (1995) erste sehr potente, reversibel bindende Peptidmimetika synthetisiert werden. In Anlehnung an die multibasische Furinerkennungssequenz mit dem Konsensusmotiv –Arg-X-Arg/Lys-Arg-X– (ROCKWELL *et al.*, 2002) wurden durch strukturelle Veränderungen zahlreiche neue substratanaloge Inhibitoren des Furins dargestellt (BECKER *et al.*, 2010; BECKER, 2011; BECKER *et al.*, 2011; BECKER *et al.*, 2012; HARDES, 2014; HARDES *et al.*, 2015; HARDES *et al.*, 2017). Bei den Modifikationen der Pentapeptidmimetika konnte die Verwendung decarboxylierter Arginin- oder Lysinmimetika sowie einiger weiterer basischer Gruppen in der P1-Position eine wirksame Furinhemmung erzielen (WILEY *et al.*, 1995; GUSTAFSSON *et al.*, 1996; STEINMETZER, STURZEBECKER, 2004). Auch die Positionierung von zyklischen Strukturen oder Aminomethylpiperidin-Derivaten als P1-Gruppe war vergleichsweise wirksam. Mit einem K_i -Wert von 0,81 nM stellt sich das 4-Aminomethylbenzamidin (4-Amba-Derivat) als effektivster Hemmstoff für Furin heraus (BECKER, 2011). Verbindungen mit einem Arginin an der P2- und der P4-Position - wie es auch in nahezu allen natürlichen Furinsubstraten zu finden ist - zeigen eine hohe Substrataffinität. Die Begründung liegt in der Verbindung der Guanidinogruppe des Arginins und der S4-Tasche des Furins durch Wasserstoffbrückenbindungen. Der Austausch zu Lysin, speziell in der P4-Position, führt zu einem beträchtlichen Affinitätsverlust. Die Messung der Inhibitoren zeigte, dass als basische Aminosäure neben Valin auch Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin als P3-Rest eine gute Bindung zur S3-Tasche des Furins haben und so eine effektive Hemmung vermitteln. Zur Optimierung der Zellgängigkeit und der Stabilität der Substanzen und, um sie als

Wirkstoff *auch in-vivo* verwenden zu können, wurden die Verbindungen an der P5-Position mit einer ungesättigten Fettsäure acyliert (BECKER, 2011; KATAYAMA *et al.*, 2011). Eine Steigerung der inhibitorischen Eigenschaften konnte letztlich noch durch die Einführung einer endständigen Guanidinomethyl-Gruppe erreicht werden. Verbindungen dieser Art sind die bisher wirksamsten, reversibel bindenden, niedermolekularen Furininhibitoren (BECKER, 2011). Dabei sind die Verbindungen MI-0701 (4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Arginin-Valin-Arginin-4-Aminobenzylamid) und MI-1148 (4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Arginin-Tertiärleucin-Arginin-4-Amidinobenzylamid) sowie MI-1599 (4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Canavanin-Tertiärleucin-Lysin-4-Amidinobenzylamid) die wirksamsten Vertreter dieser Gruppe (HARDES *et al.*, 2015; HARDES *et al.*, 2017; IVANOVA *et al.*, 2017; VAN LAM VAN *et al.*, 2019; PILGRAM *et al.*, 2020).

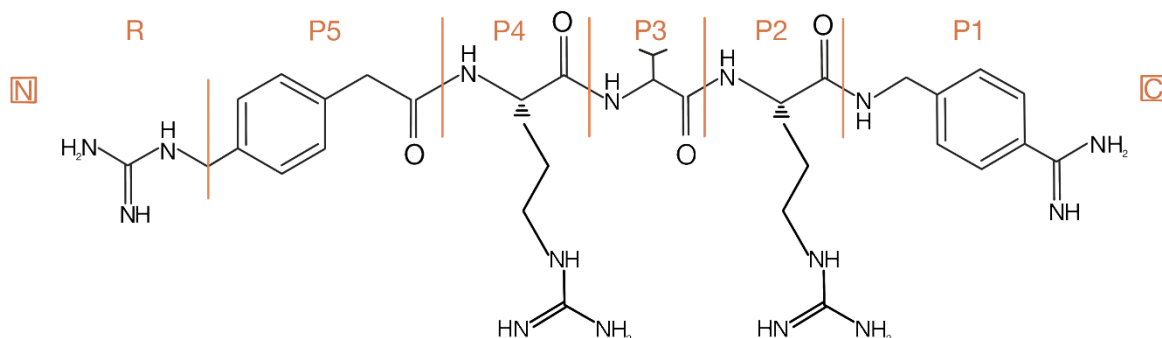
Bei Untersuchungen zur Prüfung der Zytotoxizität einiger dieser Stoffe konnten keine signifikanten toxischen Effekte im relevanten Konzentrationsbereich nachgewiesen werden (BECKER, 2011).

2.2.2.1 Der Inhibitor MI-0701

2.2.2.1.1 Allgemeines

Der peptidomimetische Inhibitor MI-0701 ist einer jener beschriebenen Pentapeptidmimetika und zeigt sich ultrastrukturell als 4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Arginin-Valin-Arginin-4-Aminobenzylamid (Strukturformel in Abb. 6). Mit einem K_i -Wert von 16 pM hat diese Verbindung eine besonders hohe Affinität zu seinem Substrat Furin (BECKER *et al.*, 2012). Die Analyse der atomaren Struktur in Verbindung mit Furin zeigte unzählige polare Wechselwirkungen, welche zu dieser hohen Affinität beitragen (DAHMS *et al.*, 2014; HARDES *et al.*, 2015).

Abb. 6: Schematische Darstellung der Strukturformel des Furininhibitors 4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Arginin-Valin-Arginin-4-Aminobenzylamid (MI-0701)



N: N-Terminus des Inhibitors; C: C-Terminus des Inhibitors; Px: Position 1-5; R=Rest

Die Wirksamkeit dieser Verbindung konnte erstmals 2011 demonstriert werden, als die Viruslast in Zellkulturen, die zuvor mit Geflügelpestviren infiziert wurden, abhängig von der eingesetzten Dosis um bis zu 100 % gesenkt werden konnten (BECKER, 2011). Die Verbindung ist nachweislich in reinem Wasser sowie in gängigen Zellkulturmedien über mindestens 96 Stunden stabil und kann sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* verwendet werden. Zytotoxizitätsuntersuchungen haben eine dosisabhängige Überlebensrate der Zellen von etwa 80-85 % nach 24 sowie geringfügig niedrigere Werte nach 48 Stunden gezeigt (BECKER, 2011). Dies ist als nicht signifikanter toxischer Effekt in relevanten Konzentrationsbereichen zu werten. Der IC₅₀-Wert der Verbindung MI-0701 liegt in Versuchen mit Influenzaviren H7N1 zwischen 1 und 10 µM (BECKER, 2011).

Basierend auf den aktuellen Untersuchungen, ist eine multibasische Struktur für eine hohe Affinität des Inhibitors zu seinem Substrat Furin zwingend erforderlich (COUTURE *et al.*, 2011). Alle bisher bekannten und potenten synthetischen Furininhibitoren enthalten mindestens drei oder mehr basische Reste, welche die zelluläre Bioverfügbarkeit einschränken und sie ungeeignet für eine orale Verabreichung machen. Gleichwohl ist eine parenterale Applikation dieser Inhibitoren möglich.

Obgleich die Verbindungen mit einem 4-Amba-Rest an Position 1 in Zellkulturversuchen keine nennenswerte Zytotoxizität bei Konzentrationen bis zu 50 µM gezeigt haben, wurde eine relevante Toxizität bei *in-vivo*-Untersuchungen mit der Verbindung MI-1148 (4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Arginin-tert-Leucin-

Arginin-4-Aminobenzylamid) an Mäusen beobachtet. Während z. B. eine intraperitoneale Applikation von 2,5 mg/kg Körpergewicht toleriert wurde, starben 100 % der Tiere nach einer Behandlung mit 5 mg/kg MI-1148 (GAGNON *et al.*, 2014; IVANOVA *et al.*, 2017). Dabei traten alle Todesfälle innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation ohne wahrnehmbare spezifische Symptome auf, was die Autoren auf eine akute Toxizitätswirkung zurückführen. Aussagen über Langzeiteffekte sind anhand dieser Studie nicht zu treffen (IVANOVA *et al.*, 2017). Da man davon ausgeht, dass bei Dosierungen in diesem Bereich insbesondere der multibasische Charakter der Strukturen sowie die Benzamidin-Gruppe an Position 1 für die Toxizität verantwortlich sind, wurden weitere Verbindungen synthetisiert (IVANOVA *et al.*, 2017). Es konnte eine geringere Toxizität erreicht werden, jedoch war auch die inhibitorische Wirkung eingeschränkt, verglichen mit vorherigen Substanzen.

2.2.2.1.2 *In-vitro* Einsatz des Inhibitors MI-0701 an ausgewählten Beispielen

Influenza-A-Virus

Die Infektiösität des Influenzavirus hängt von der korrekten Spaltung des oberflächlichen Glykoprotein-Vorläufers HA0 in die funktionellen Untereinheiten HA1 und HA2 ab. Im Falle der hochpathogenen aviären Influenzaviren H5N1 und H7N1 findet diese Spaltung durch Furin oder eine Proproteinkonvertase PC5/6 während des Transports des Hämagglutinins vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran statt (KLENK, GARTEN, 1994; GARTEN, KLENK, 2008). Die weiter fortschreitende Resistenzbildung der Virusstämme gegenüber den üblichen M2-Blockern (Amantadine, Rimantadine) macht die Notwendigkeit weiterer Wirkstoffgruppen deutlich (HUSSAIN *et al.*, 2017). *In-vitro*-Versuche an MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney-Zellen) zeigten eine deutliche dosisabhängige Reduktion der Virusverbreitung nach Zugabe des Inhibitors MI-0701. Getestet wurden Konzentrationen von 0,1 bis 50 µM über einen Zeitraum von 72 Stunden (BECKER *et al.*, 2010; BECKER *et al.*, 2012; LU *et al.*, 2015). Weitere Untersuchungen konnten zudem eine synergistische und signifikant höhere Wirkung bei kombinierten Behandlungen der infizierten Kulturen mit dem Neuraminidase-Hemmer Oseltamivir und dem Virostatikum Ribavirin zeigen (NGUYEN *et al.*, 2012). Bei der Zugabe von

Konzentrationen des Inhibitors MI-0701 bis 400 μM zeigte sich kein zytotoxischer Effekt auf die Kultur (LU *et al.*, 2015).

Bacillus anthracis - Anthrax-Toxin

Milzbrand ist eine Infektion durch *Bacillus anthracis*. Die bakteriellen Toxine werden als Vorläufer synthetisiert und durch Furin oder eine Furin-ähnliche Proproteinkonvertase aktiviert (LIU *et al.*, 2014a). *In-vitro*-Untersuchungen an Kulturen aus murinen Makrophagen (*murine macrophage* J774A.1) konnten einen dosisabhängigen, inhibitorischen Effekt des MI-0701 herausstellen. Es wurden dabei Konzentrationen von 0,05 bis 100 μM über eine Zeitdauer von 3 Stunden getestet. Die Zugabe von Inhibitor-Konzentrationen bis 100 μM zeigte keine wahrnehmbaren zytotoxischen Effekte (HARDES *et al.*, 2015). Aus diesem Grund stellt der Inhibitor neben Antibiotika und dem kürzlich erprobten Antikörper Raxibacumab einen zusätzlichen kurativen Ansatz in der Therapie von Infektionen mit diesem Bakterium dar (MAZUMDAR, 2009; ARTENSTEIN, OPAL, 2012).

Corynebacterium diphtheriae - Diphtherie-Toxin

Eine Infektion mit dem *Corynebacterium diphtheriae* kann bei Menschen lebensbedrohliche Erkrankungen verursachen. Nach TSUNEOKA *et al.* (1993) wird auch das Diphtherie-Toxin dieses Bakteriums durch Furin gespalten und so in den aktiven Zustand überführt. Studien an infizierten Vero-Zellen zeigten beim Einsatz einer Konzentration von 0,1 bis 100 nM MI-0701 nach 3 Stunden eine signifikante, dosisabhängige Hemmwirkung (HARDES *et al.*, 2015).

Kanines Staupevirus

Das kanine Staupevirus führt als Vertreter der Familie der Paramyxoviridae zu Krankheitsfällen mit hoher Mortalität. Empfänglich sind viele Familien der Hundeartigen (Canoidea) wie Hunde, Bären, Marder oder Kleinbären sowie auch Familien der Katzenartigen (Feloidea), wie Großkatzen (APPEL *et al.*, 1994; HARDER, OSTERHAUS, 1997). Bevor die virale Hüllmembran mit der Zielzelle fusioniert, muss

das Protein F0 durch Furin gespalten werden (VON MESSLING *et al.*, 2004; BEINEKE *et al.*, 2009). Untersuchungen an Zellkulturen spezifischer Vero-Zellen, sogenannter *Vero dogSLAMtag cells*, zeigten über einen Untersuchungszeitraum von drei Tagen nach dem Einsatz von MI-0701 bereits bei niedrigen Konzentrationen von 0,5 µM signifikant reduzierte Virus-Titer (HARDES *et al.*, 2015).

Aufgrund der hohen strukturellen Konservierung des F-Proteins der Paramyxoviren, können wahrscheinlich auch andere humanpathogene Viren dieser Familie mit Furin-Spaltstellen auf ähnliche Weise gehemmt werden. Neben Masern- und Mumps-Viren, zwei Erreger der weltweit wichtigsten Kinderkrankheiten, sind auch Parainfluenzaviren und das humane Respiratorische Synzytial-Virus Pathogene mit ähnlichem Wirkmechanismus und so potentiell Substrate für einen Furininhibitor (HARDES *et al.*, 2015).

Alphaviren

Auch Vertreter der Familie Alphaviridae wie das Chikungunya-Virus, das Ross-River-Virus und das Semliki-Forest-Virus werden durch eine Furin-medierte Spaltung viraler Hüllproteine biologisch aktiviert und ihre Rezeptorbindung und Membranfusion so ermöglicht (ZHANG *et al.*, 2003; OZDEN *et al.*, 2008). *In-vitro*-Untersuchungen an *baby hamster kidney cells* (BHK-21) zeigten 24 Stunden nach einer Infektion mit dem Semliki-Forest-Virus dosisabhängig eine deutliche Reduktion der Viruslast, ohne einen signifikanten zytopathischen Effekt zu verursachen. Untersucht wurden Konzentrationen der Verbindung MI-0701 von 0,25 bis 25 µM. Analoge Ergebnisse zeigten sich auch bei den Untersuchungen mit dem human-pathogenen Chikungunya-Virus (HARDES *et al.*, 2017).

Flaviviren

Die Gattung der Flaviviren umfasst behüllte Viren, die durch Arthropoden als Vektor unter anderem auf Säugetiere übertragen werden. Vertreter dieser Gattung verursachen wichtige Erkrankungen bei Tieren und Menschen, wie beispielsweise Gelbfieber oder die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), aber auch Dengue-Fieber oder West-Nil-Fieber. Eine Spaltung des Oberflächenproteins M durch Furin

ermöglicht den Flaviviren die Fusion mit der Wirtszelle und bedingt so ihre Infektiösität (CHAMBERS *et al.*, 1990; SUTHAR *et al.*, 2013). *In-vitro*-Untersuchungen an immortalisierten, humanen Leberzellen (Huh7) mit dem Dengue-2-Virus und dem West-Nil-Virus zeigten bei Inhibitor-Konzentrationen von 3 bis 50 μM eine dosisabhängige Reduktion der Viruslast (KOURETOVA *et al.*, 2017).

Borna disease virus 1 (BoDV-1)

Das virale Glykoprotein (GP) der Bornaviren spielt eine besondere Rolle bei der Aufnahme von Viruspartikeln durch die Wirtszelle (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; PEREZ *et al.*, 2001; BAJRAMOVIC *et al.*, 2003). Es ist verantwortlich für die Anlagerung an zelluläre Rezeptoren und ist involviert in die initiale Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Wie bei einigen anderen behüllten Viren, ist auch bei dem Borna disease virus 1 die Virusfusion und so auch die Infektiösität maßgeblich abhängig von der proteolytischen Spaltung eines Vorläufermoleküls durch Furin (KLENK, ROTT, 1988; RICHT *et al.*, 1998). Das virale Glykoprotein weist mit den Positionen 249, 364 und 386 insgesamt drei potentielle Furin-Erkennungssequenzen auf, wobei nach RICHT *et al.* (1998) lediglich Position 249 für die Endoprotease zugänglich ist. Die posttranslationale Spaltung des zuvor glykosylierten 94 kDa schweren Glykoproteins (gp94) resultiert in zwei Proteinen mit ähnlicher Molekülmasse, dem 27 kDa schweren N-terminalen (gp51) und dem 29 kDa schweren C-terminalen (gp43) Fragment (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; RICHT *et al.*, 1998; HERDEN *et al.*, 2013). Während das N-terminale Spaltprodukt GP1 für die Erkennung des Virusrezeptors und den Viruseintritt in die Wirtszelle verantwortlich ist (PEREZ *et al.*, 2001), mediiert das C-terminale GP2 die pH-abhängige Fusion des Virus mit der Endosomenmembran (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998). Erst dann kann das virale Ribonukleoprotein in das Zytoplasma der Wirtszelle und von dort in den Kern transportiert werden, wo die RNA-Replikation und die Transkription stattfinden (CUBITT, DE LA TORRE, 1994). Untersuchungen von CLEMENTE *et al.* (2007) zeigten, dass das Glykoprotein ausschließlich durch Furin gespalten wird und nicht auch durch eine andere Endoprotease. Mehrere Autoren konnten zeigen, dass sich das BoDV-1 nach initialer, rezeptorabhängiger Infektion wahrscheinlich hauptsächlich über Zell-zu-Zell-Kontakte verbreitet (CLEMENTE, DE LA TORRE, 2007; HERDEN *et*

al., 2013; LENNARTZ *et al.*, 2016). Auch dafür, das konnten LENNARTZ *et al.* (2016) nachweisen, ist eine proteolytische Spaltung des viralen Glykoproteins durch Furin von maßgeblicher Bedeutung.

Der **Inhibitor MI-0701** wurde bereits erfolgreich in persistent BoDV-1-infizierten Zelllinien wie Vero- und MDCK-Zellen zur Hemmung der Spaltung des viralen Glykoproteins eingesetzt (BAYER, 2010; LABITZKE, 2011; HARDES *et al.*, 2015; LENNARTZ *et al.*, 2016). Eine konzentrationsabhängige Verringerung des Anteils an GP1 bei gleichzeitiger Erhöhung von GP2 konnte von BAYER *et al.* (2010) nachgewiesen werden. Weiterhin konnten sie in einem Fusionstest zeigen, dass der Einsatz des Inhibitors die Fusionsaktivität des Virus signifikant um nahezu 100 % reduzieren kann (BAYER, 2010). Eine Hemmwirkung war auch bei dem Einsatz in akut infizierten, primären Astrozytenkulturen von KEHR (2016) zu verzeichnen, nach Zugabe des Hemmstoffs konnte keine signifikante Virusausbreitung detektiert werden. Eine Inhibitorapplikation zog zudem in allen bisherigen Untersuchungen keine Veränderung der Zellmorphologie mit sich (BAYER, 2010; LABITZKE, 2011; KEHR, 2016). Auch in primären neuroglialen Mischkulturen der Ratte wurde eine derartige Hemmung bestätigt. Der Inhibitor wurden in einer Konzentration von 10 μ M zugegeben, es ließ sich in Bezug auf die Astrozyten nach 8 bzw. 14 Tagen eine Reduktion der Infektionsrate um 76 % bzw. 77 % verzeichnen (LENNARTZ *et al.*, 2016). Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen der Virusausbreitung und dem räumlichen Bezug der Zellen zueinander herausgestellt werden. Weiterhin zeigte sich, dass im Gegensatz zum inhibitorischen Effekt auf Astrozyten keine Reduktion der Infektionsrate auf Neurone des ZNS zu vernehmen war, hohe Dosen (25 μ M) führten sogar zu einem prozentualen Rückgang der Neurone in den Kulturen (LENNARTZ *et al.*, 2016).

2.2.2.2 Weitere antivirale Wirkstoffe mit Effekt auf die BoDV-1-Infektion *in-vitro*

Diverse weitere pharmazeutische Wirkstoffe wurden bis heute bezüglich ihrer potentiellen inhibitorischen Wirkung auf eine Infektion mit dem Borna disease virus 1 untersucht. Dabei zielen die Wirkmechanismen der eingesetzten Substanzen auf unterschiedliche Phasen der Virusinfektion ab.

Die Wirkung von **Amantadin**, einem bekannten Influenza-Virostatikum, wird kontrovers diskutiert. Amantadin soll bei RNA-Viren das Eindringen und die Freisetzung der viralen Nukleinsäure verhindern. Während BODE et al. (1997) initial eine erfolgreiche Inhibition der Virusausbreitung *in-vitro* sowie *in-vivo* bei einem Menschen mit depressivem Syndrom propagieren, zeigen die Ergebnisse von HALLENSLEBEN et al. (1997), CUBITT et al. (1997) und STITZ et al. (1998b) keine merkliche Reduktion der viralen RNA-Level *in-vitro* und *in-vivo* nach Gabe von Amantadin.

Weiterhin haben Studien den inhibitorischen Effekt des synthetischen Nukleosid-Analogons **Ribavirin (1-beta-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-carboxamid)** auf die BoDV-1-Infektion untersucht. Als Wirkmechanismus geht man von einer Inhibition der Replikation einer Reihe von RNA- und DNA-Viren aus. Nach der Aufnahme in die Zelle und einer enzymatischen Modifikation reduziert der Wirkstoff den verfügbaren Nukleotid-Pool und bewirkt eine Inhibition des posttranslationalen Cappings der mRNA (RANKIN et al., 1989; PATTERSON, FERNANDEZ-LARSSON, 1990) sowie der viralen Polymerase (FERNANDEZ-LARSSON et al., 1989; FERNANDEZ-LARSSON, PATTERSON, 1990). Eine Behandlung mit Ribavirin reduzierte die Produktion von zellfreien Viren sowie die Level der viralen RNA-Transkripte in persistent BoDV-1 infizierten Zelllinien (MIZUTANI et al., 1998). Dabei war die effektive Wirkung von Ribavirin insofern eingeschränkt, als nach dem Abbruch der Behandlung auch der inhibitorische Effekt alsbald aufgehoben wurde (JORDAN et al., 1999). Vergleichbare Trends konnten 2015 auch durch *in-vitro*-Studien mit dem parrot bornavirus 4 aufgezeigt werden (MUSSER et al., 2015). Untersuchungen *in-vivo* konnten diese vielversprechenden *in-vitro*-Ergebnisse nicht bestätigen. Obgleich nach intranasaler Infektion adulter Ratten und intrazerebraler Applikation von Ribavirin weder eine Veränderung des Virustiters, des Levels der Nukleinsäuren noch in der Virusausbreitung festgestellt werden konnte, konnten deutliche Verbesserungen der klinischen Symptome erzielt werden (SCHLABERG, 2003). Die Ribavirin-Applikation zeigte bei Ratten einen Effekt auf das Wirtsimmunsystem und die Immunantwort nach erfolgter BoDV-1-Infektion im Sinne einer reduzierten Mikrogliaproliferation, einer Reduktion der infiltrierenden perivaskulären und parenchymatösen CD4+ - und CD8+-Zellen und einem erhöhten Interleukin- und Interferon-Niveau im zentralen Nervensystem (SOLBRIG et al., 2002). Vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die

Mikrogliaaktivierung konnten auch *in-vivo*-Studien mit neonatalen Rennmäusen zeigen (LEE *et al.*, 2008).

Bei dem Nukleosid-Analogon **1-beta-D-Arabinofuranosylcytosin** (Ara-C) handelt es sich um einen Wirkstoff, der die zelluläre sowie die virale Polymerase hemmt und in die DNA inkorporiert werden kann (FURTH, COHEN, 1968; COZZARELLI, 1977). Die Arbeiten von VOLMER *et al.* (2005) lassen eine direkte Inhibition des viralen Replikationskomplexes als Wirkmechanismus bei Bornaviren vermuten. Untersuchungen zeigten, dass Ara-C die Produktion von zellfreiem Virus sowie die Verbreitung des Virus in persistent infizierten Zellen und in infizierten Kulturen von Neuronen hemmen konnte, dies war mit geringeren Leveln von viraler RNA und einer reduzierten Proteinsynthese verbunden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Ara-C auch die Virusreplikation *in-vivo* in Gehirnen infizierter Ratten inhibierte und so die Ausprägung einer klinischen Krankheit verhinderte (BAJRAMOVIC *et al.*, 2002). Da Studien eine zytotoxische Wirkung des Ara-C aufzeigten, was seinen Einsatz als potentiell Therapeutikum limitierte, wurde nach weniger schädlichen Substratäquivalenten gesucht. Das Nukleosid-Analogon **2'-Fluoro-2'-deoxycytidin** (2'-FdC) zeigte sich dabei als attraktiver Kandidat (BAJRAMOVIC *et al.*, 2004). Die inhibitorische Wirkung ist vergleichbar mit der von Ara-C, die Zytotoxizität um ein Vielfaches geringer (BAJRAMOVIC *et al.*, 2004).

In-vivo-Untersuchungen mit einem speziellen Antikörper, welcher gegen das Adhäsionsmolekül α_4 Integrin gerichtet ist, konnten eine Reduktion der klinischen Symptome experimentell infizierter Ratten zeigen. Basierend auf der Annahme von PLANZ *et al.* (1995), dass aktivierte, BoDV-1-spezifische T-Lymphozyten α_4 Integrin exprimieren, wurde die Eignung eines **Anti- α_4 -Integrin-Antikörpers** untersucht, die Entwicklung einer infektionsbedingten Entzündungsreaktion zu verhindern (RUBIN *et al.*, 1998). Behandelte Ratten zeigten zudem geringere Gewichtsverluste und eine signifikant milder ausgeprägte Entzündungszellinfiltration im Gehirn in der histologischen Untersuchung. Ein statistisch signifikanter Unterschied in den erhobenen Virustitern zeigte sich hingegen nicht, sodass dem Antikörper vorzugsweise eine komplementäre, immunmodulierende Aufgabe bei einer antiviralen Therapie zukommen könnte.

Das Immunsuppressivum **Cyclosporin A**, ein zyklisches Peptid, zeigt unter bestimmten Bedingungen einen signifikanten, präventiven Effekt auf die Veränderungen im Gehirn BoDV-1-infizierter Versuchstiere sowie auf die Ausbildung klinischer Symptome. Durch eine gezielte Calcineurin-Inhibition wird die Ausschüttung zahlreicher Zytokine sowie die Aktivierung und Vermehrung von T-Lymphozyten gehemmt (HUAL *et al.*, 2002). Die Entwicklung von antiviralen Antikörpern wurde generell durch die Behandlung mit Cyclosporin A verhindert. Untersuchungen zeigen, dass die Applikation des Immunsuppressivums lediglich einen prophylaktischen Effekt auf eine persistente BoDV-1-Infektion bei Säugetieren zu haben scheint, nicht jedoch einen therapeutischen (STITZ *et al.*, 1989). Bei experimentellen Infektionen mit dem PaBV-2 konnte eine tägliche, orale Dosis von 0,2 mg in Studien von HAMEED *et al.* (2018) trotz des Nachweises großer Virusmengen die klinische Manifestation einer neuropathischen Drüsenmagendilatation (Proventricular Dilatation Disease, PDD) verhindern.

Der experimentelle Einsatz von **monoklonalen Antikörpern** gegen das virale Glykoprotein gp43 an der Oberfläche zeigt eine Inhibition des Fusionsprozesses mit der Wirtszelle (FURRER *et al.*, 2004). Für Antikörper gegen das Glykoprotein des BoDV-1 konnte *in-vitro* und *in-vivo* gezeigt werden, dass sie eine neutralisierende Aktivität besitzen (CUBITT, DE LA TORRE, 1994; HATALSKI *et al.*, 1995; STITZ *et al.*, 1998a).

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine akute BoDV-1-Infektion unterschiedlicher Zelllinien eine Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade zur Folge hat. Dabei handelt es sich um einen mehrstufigen Signaltransduktionsweg, der unter anderem an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und auch am programmierten Zelltod beteiligt ist. Die Inhibition dieses Signalweges durch den MEK-spezifischen Hemmstoff **U0126 (1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,3-bis[2-Aminophenylthio]butadien)** zeigte sich durch selektive Blockierung der Aktivität von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (FAVATA *et al.*, 1998). Es zeigte sich, dass eine Aktivierung der Signalkaskade essentiell für die zelluläre Verbreitung des BoDV-1 zu sein scheint und ihre Inhibition entsprechend zu einer verminderten Verbreitung des Virus beiträgt. Die Behandlung von persistent BoDV-1-infizierten Zellen führte nicht zu einer Verringerung des Virustiters, was darauf hinweist, dass die U0126-Behandlung

die Virusreplikation nicht beeinflusst, sondern die Ausbreitung von BoDV-1 von Zelle zu Zelle hemmt (PLANZ *et al.*, 2001).

Interferon- α/β (IFN) ist ein natürliches, immunstimulierendes Protein, welches vor allem eine antivirale Wirkung entfaltet und von vielen Zelltypen gebildet werden kann. HALLENSLEBEN *et al.* (1999) konnten zeigen, dass experimentell eingesetztes IFN ein wirksamer Inhibitor einer BoDV-1-Infektion ist. IFN konnte die meisten untersuchten Zelllinien sowohl vor einer primären Infektion schützen als auch die Viruslast in persistent infizierten Zellen reduzieren, eine vollständige Virus-Elimination blieb dabei jedoch aus. Die Wirkung scheint eine starke Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie zu haben. Auch **Interferon- γ** inhibiert nachweislich dosisabhängig die Vermehrung von BoDV-1 in zerebellären und hippocampalen organotypischen Slice-Kulturen. Dabei scheint der Schutz vor initialer Infektion deutlich wirksamer zu sein als die Behandlung bereits infizierter Zellen (FRIEDL *et al.*, 2004; HAUSMANN *et al.*, 2005; RICHTER *et al.*, 2009).

Neueste Untersuchungen zeigen, dass das Virostatikum **Favipiravir (T-705)** als Nukleosid-Mimetikum *in-vitro* die BoDV-1-Replikation sowie auch die Transkription in persistent infizierten Zellen effizient hemmen kann, auch nach dem Ende der Wirkstoffapplikation zeigten sich die Level der gemessenen viralen genomischen sowie messenger RNA - im Gegensatz zu den Daten der Ribavirin-Behandlung - gleichbleibend niedrig. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Favipiravir auch einen dosisabhängigen inhibitorischen Effekt auf die Replikation anderer Bornaviren, wie die des parrot bornavirus 4 (PaBV-4), hat (TOKUNAGA *et al.*, 2017). Die Untersuchungen deuteten auf eine effektivere Wirkung als bei einer vergleichbaren Behandlung mit Ribavirin hin (MUSSEY *et al.*, 2015; REUTER *et al.*, 2016; TOKUNAGA *et al.*, 2017). Als Wirkmechanismus geht man von einer Inhibition der viralen Polymerase aus (FURUTA *et al.*, 2013).

2.3 DIE BORNASCHE KRANKHEIT

Die Bornasche Krankheit (Borna Disease, BD) wird durch eine Infektion mit dem Borna disease virus 1 (BoDV-1) ausgelöst. Die Krankheit und das Virus wurden nach der sächsischen Stadt Borna benannt, in deren Umgebung Ende des 19. Jahrhunderts

zahlreiche Kavalleriepferde bei einem Krankheitsausbruch erkrankten. Ein Großteil der Pferde verstarb während dieses seuchenhaften Geschehens (ZWICK, 1939). In der Vergangenheit synonym verwendete Namen für die Bornasche Krankheit sind „Hitzige Kopfrkrankheit der Pferde“ (AUTENRIETH, 1823) zitiert nach (ZWICK, 1939), „Halbakute Gehirnentzündung“ (WÖRZ, 1858) oder „Schlafsucht der Pferde“ (WINKLER, 1883).

2.3.1 Bornaviren

Das 1909 von Joest und Degen entdeckte Borna disease virus 1 konnten Zwick et al. 1925 erstmals mit der Bornaschen Krankheit kausal in Zusammenhang bringen. Es gehört wie das Masernvirus, das Mumpsvirus und die Tollwutviren zu der Ordnung der *Mononegavirales*. Man unterscheidet bei Bornaviren nach neuester Taxonomie drei Genera (AMARASINGHE *et al.*, 2018). Während die beiden Vertreter des Genus *Carbovirus* bei australischen Rautenpythons (*Morelia spilota*) mit neurologischen Erkrankungen gefunden wurden (HYNDMAN *et al.*, 2018; LATNEY, WELLEHAN, 2020), wird ein Großteil der bekannten Bornaviren unter dem Genus *Orthobornavirus* in insgesamt 8 Spezies zusammengefasst (Übersicht in Tab. 1, siehe auch 2.3.3). Unter Verwendung metagenomischer Analysen konnte kürzlich ein neues Bornavirus in einem Wildkarpfen (*Hemiculter leucisculus*) identifiziert werden (SHI *et al.*, 2018). Analysen zeigten, dass das Virus eine neue Gattung – die des *Cultervirus* - in der Familie der Bornaviren darstellt, welche sich von den Orthobornaviren und den Carboviren unterscheidet. Die Spezies, in die das neuartige Wūhàn sharpbelly bornavirus (WhSBV) klassifiziert werden soll, wird als *Sharpbelly cultervirus* bezeichnet (RUBBENSTROTH *et al.*, 2018a).

Tab. 1: Taxonomie der Familie *Bornaviridae* [nach AMARASINGHE *et al.* (2018) und SHI *et al.* (2018)]

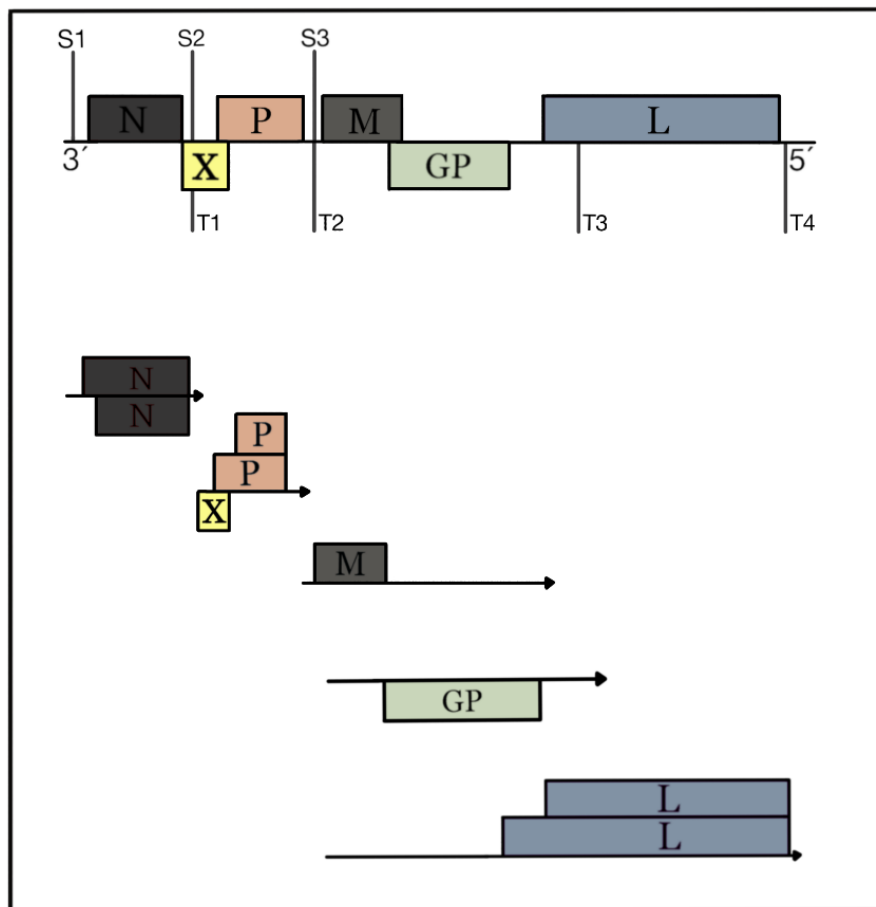
Genus	Spezies	Virus (Abkürzung)
<i>Carbovirus</i>	<i>Queensland carbovirus</i>	jungle carpet python virus (JCPV)
	<i>Southwest carbovirus</i>	southwest carpet python virus (SWCPV)
<i>Cultervirus</i>	<i>Sharpbelly cultervirus</i>	wūhàn sharpbelly bornavirus (WhSBV)
<i>Orthobornavirus</i>	<i>Elapid 1 orthobornavirus</i>	Loveridge's garter snake virus 1 (LGSV-1)
	<i>Mammalian 1 orthobornavirus</i>	Borna disease virus 1 (BoDV-1)
		Borna disease virus 2 (BoDV-2)
	<i>Mammalian 2 orthobornavirus</i>	variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1)
	<i>Passeriform 1 orthobornavirus</i>	canary bornavirus 1 (CnBV-1)
		canary bornavirus 2 (CnBV-2)
		canary bornavirus 3 (CnBV-3)
	<i>Passeriform 2 orthobornavirus</i>	estrildid finch bornavirus 1 (EsBV-1)
	<i>Psittaciform 1 orthobornavirus</i>	parrot bornavirus 1 (PaBV-1)
		parrot bornavirus 2 (PaBV-2)
		parrot bornavirus 3 (PaBV-3)
		parrot bornavirus 4 (PaBV-4)
		parrot bornavirus 7 (PaBV-7)
	<i>Psittaciform 2 orthobornavirus</i>	parrot bornavirus 5 (PaBV-5)
	<i>Waterbird 1 orthobornavirus</i>	aquatic bird bornavirus 1 (ABBV-1)
		aquatic bird bornavirus 2 (ABBV-2)

2.3.1.1 Virusaufbau und Genomorganisation

Viren der Familie *Bornaviridae* sind behüllte, nicht-segmentierte Viren mit einem einzelsträngigen, negativ orientierten, linearen Genom (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT, DE LA TORRE, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a). Bornaviren weisen eine einzigartige Genomorganisation innerhalb der Ordnung der *Mononegavirales* auf, aufgrund derer sie seit 1996 eine eigene Familie darstellen (PRINGLE, 1996). Das BoDV-1 machte zunächst den einzigen Vertreter dieser Familie aus, bis 2008 mit der Entdeckung eines aviären Bornavirus eine zweite Spezies gefunden wurde (HONKAVUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008). Im Laufe der Zeit konnten diverse andere Vertreter der Familie isoliert und charakterisiert werden (Übersicht in Tab. 1). Ausführliche Studien existieren bislang fast ausschließlich für das BoDV-1, ein vergleichbarer Genomaufbau wird jedoch für alle Vertreter des Genus *Orthobornavirus* angenommen. Die Genome der anderen beiden Genera scheinen hingegen Abweichungen in der Genreihenfolge zu haben (AMARASINGHE *et al.*, 2018; HYNDMAN *et al.*, 2018).

Als einzigartiges Charakteristikum in der Ordnung der *Mononegavirales* replizieren und transkribieren Bornaviren im Kern der infizierten Zelle (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT, DE LA TORRE, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a; CUBITT *et al.*, 1994b). Elektronenmikroskopisch können sphärische, behüllte Partikel einer Größe von 80 bis 100 nm mit einem elektronendichten Kern sowie einem helikal gewundenen, 4 nm großen Nukleokapsid dargestellt werden. Oberflächlich sind auf der Hüllmembran spike-ähnliche Fortsätze anzusprechen (RICHT *et al.*, 1993; ZIMMERMANN *et al.*, 1994; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; KOHNO *et al.*, 1999; KIERMAYER *et al.*, 2002). Das mit 8900 Nukleotiden relativ kurze Genom ist in drei Transkriptionseinheiten mit sechs offenen Leserahmen („open reading frames“, ORF) unterteilt. Es kodiert in 3′-5′-Orientierung für sechs virale Proteine: das Nukleoprotein (BoDV-1-N), das X-Protein (BoDV-1-X), das Phosphoprotein (BoDV-1-P), das Matrixprotein (BoDV-1-M), das Glykoprotein (BoDV-1-GP) und die RNA-anhängige RNA-Polymerase (BoDV-1-L) (DE LA TORRE, 2002a; HERDEN *et al.*, 2013). Wie in Abb. 7 dargestellt, finden sich die für die viralen Proteine kodierenden Gene in insgesamt 3 Transkriptionseinheiten (I-III). Transkriptionseinheit I geht von Startsignal S1 bis Terminationssignal T1, beinhaltet das Gen für das Nukleoprotein (BoDV-1-N) und hat den ersten von 6 ORFs inne. Darauf folgt die zweite Transkriptionseinheit, die von S2 bis T2 reicht, für das BoDV-1-X sowie das BoDV-1-P codiert und den ORF x1 sowie den ORF II beinhaltet. Weiter in 5′-Richtung schließt sich die Transkriptionseinheit III, begrenzt von S3 und T3, an. Sie codiert im ORF III für das BoDV-1-M und in ORF IV für das BoDV-1-GP, wobei die Leserahmen überlappen. Am Ende steht die Sequenz für die RNA-abhängige RNA-Polymerase (BoDV-1-L) im ORF V, die mit dem Terminationssignal T4 endet (BRIESE *et al.*, 1994; DE LA TORRE, 1994; SCHNEEMANN *et al.*, 1995). Ein weiteres Terminationssignal (T6) wurde beschrieben, die Relevanz konnte bislang jedoch nur unzureichend dargelegt werden (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 2001).

Abb. 7: Schematische Darstellung des BoDV-1-Genoms und der Transkripte (nach POROMBKA, (2006); HERDEN, (2009); OWENS et al.(2012); HERDEN et al., (2013))



Virale Proteine (farbige Rechtecke): N: Nukleoprotein, X: X-Protein, P: Phosphoprotein, M: Matrixprotein. GP: Glykoprotein. L: RNA-Polymerase; S1-3: Positionen der Starsignale; T1-4: Positionen der Stoppsignale; 3'/5': Orientierung der kodierenden Nukleinsäure

Im Gegensatz zu anderen negativsträngigen RNA-Viren fehlen den Bornaviren spezifische intergenische Regionen, stattdessen überlappen ihre ORFs häufig (PYPER, GARTNER, 1997; HERDEN et al., 2013). Zudem kann es zum Überlesen von Transkriptionsterminations-Signalen kommen, als weitere Besonderheit ist die Fähigkeit zum alternativen Spleißen beschrieben (SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1994; TOMONAGA et al., 2000; TOMONAGA et al., 2002). Das Genom des BoDV-1 gilt gemeinhin als stark konserviert mit maximalen Sequenzunterschieden von 4 % (BINZ et al., 1994; HERZOG et al., 1997; KOLODZIEJEK et al., 2005; DÜRRWALD et al., 2006). Das Virus hat eine relativ hohe Tenazität in saurer wie alkalischer Umgebung. Die Erhitzung auf 56 °C für eine Dauer

von mehr als 3 Stunden inaktiviert das Virus jedoch - auch gegenüber organischen Lösungsmitteln, Detergentien mit einem pH-Wert, der unter 4 liegt, und UV-Licht ist das Virus empfindlich (HEINIG, 1955; DANNER, 1982; PAULI, LUDWIG, 1985).

2.3.1.2 Proteine des BoDV-1

Ähnlich wie bei anderen negativsträngigen RNA-Viren, zeigt das BoDV-1 einen Transkriptionsgradienten vom 3'- zum 5'- Ende. Die Expression und somit auch die nachzuweisenden Mengen der viralen Proteine divergieren somit, wobei das Nukleoprotein und das Phosphoprotein den größten Anteil ausmachen. Während sich BoDV-1-N vornehmlich in der akuten Phase der Infektion mit starker Replikation findet, kann man das BoDV-1-P bevorzugt in der Phase der Viruspersistenz finden (PYPER, GARTNER, 1997; WATANABE *et al.*, 2000; SCHNEIDER, 2005). BoDV-1-N, BoDV-1-P und BoDV-1-L werden zusammen als der Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Komplex) oder als viraler Polymerasekomplex bezeichnet, bilden die kleinste funktionelle und infektiöse Replikationseinheit und sind essentiell für die Transkription sowie die Replikation (CUBITT *et al.*, 1994a; RICHT *et al.*, 2007; HERDEN *et al.*, 2013). Hierbei ist das Verhältnis zwischen BoDV-1-N und -P für die Kontrolle der Polymeraseaktivität in der akuten und chronisch persistierenden Phase wichtig (PEREZ *et al.*, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2004).

Nukleoprotein, BoDV-1-N

Für das Nukleoprotein des BoDV-1 existieren zwei Isoformen, die 40 kDa schwere p40-Form und die 38 kDa schwere p38-Form (BRIESE *et al.*, 1995; PYPER, GARTNER, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 1998), für die aviären Vertreter sind derartige Variationen nicht beschrieben (KOBAYASHI *et al.*, 1998; VILLANUEVA *et al.*, 2008; GRAY *et al.*, 2010). Beide Isoformen unterscheiden sich in ihrer Gesamtlänge, wobei das p40 auf der gesamten Länge des ORF I exprimiert wird, wohingegen die Expression des p38 an einem in 5'-Richtung versetzten „in-frame“ beginnt. Dabei wird das vorständige *nuclear localization signal* (NLS) nicht exprimiert, was sich in der zellulären Verteilung beider Isoformen widerspiegelt. Während p40 vornehmlich im

Zellkern zu finden ist, liegt p38 primär zytoplasmatisch (PYPER, GARTNER, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 1998). KOBAYASHI *et al.* (2001) vermuten, dass die p38-Isoform möglicherweise an der Bildung des zytoplasmatisch gelegenen Ribonukleoproteinkomplexes beteiligt ist, während die p40-Isoform zusätzlich in den Zellkern transportiert wird, um die Transkription und Replikation des Virus-Genoms zu unterstützen (PEREZ *et al.*, 2003). Darüber hinaus sollen die gespleißten Isoformen die Aktivität der viralen Polymerase hemmen (KOJIMA *et al.*, 2019). Bis zur Entwicklung spezifischer molekularer Analysen diente hauptsächlich das der viralen genomischen RNA angelagerte Nukleoprotein als diagnostischer Marker zum Nachweis einer Infektion (SPROCKHOFF, 1954; SPROCKHOFF, 1955) und ist auch heute noch Gegenstand gängiger Nachweisverfahren wie der Immunfluoreszenz, Immunhistochemie und des Western Blots.

X-Protein, BoDV-1-X

Das nur 10 kDa schwere Protein zählt zu den Nichtstrukturproteinen und ist somit nicht essentiell für den Aufbau infektiöser Viruspartikel (WEHNER *et al.*, 1997; TOMONAGA *et al.*, 2002; PEREZ, DE LA TORRE, 2005). Es moduliert jedoch die virale Polymeraseaktivität durch Bindung an das P-Protein (SCHWARDT *et al.*, 2005; POENISCH *et al.*, 2008), inhibiert die Replikation und Transkription und fungiert dadurch als negativ-regulierender Faktor des RNPs (PEREZ *et al.*, 2003; SCHNEIDER *et al.*, 2003; POENISCH *et al.*, 2004). In infizierten Zellen ist es sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zu finden (WEHNER *et al.*, 1997; KOBAYASHI *et al.*, 2003). BoDV-1-X dient weiterhin als Inhibitor von apoptotischen Prozessen durch Assoziation mit mitochondrialen antiviralen Signalproteinen und der Blockierung der intrinsischen Caspase-Aktivierung (POENISCH *et al.*, 2004; SCHWARDT *et al.*, 2005; POENISCH *et al.*, 2009; HONDA, TOMONAGA, 2013; LI *et al.*, 2013).

Phosphoprotein, BoDV-1-P

BoDV-1-P ist ein 24 kDa schweres Protein, welches vor allem im Nukleus infizierter Zellen nachzuweisen ist. Es existiert zudem eine zweite Isoform mit 16 kDa, die Funktion ist bisher jedoch unbekannt (SCHNEEMANN *et al.*, 1995; SCHWEMMLE *et al.*, 1998; TOMONAGA *et al.*, 2002). Das Protein fungiert als Kofaktor der viralen Polymerase (BoDV-1-L) - nach einer Phosphorylierung, vornehmlich durch die Proteinkinase C ϵ (PKC ϵ), dient es als Transkriptions-Aktivator (THIEDEMANN *et al.*, 1992; SCHWEMMLE *et al.*, 1997). Interaktionen zwischen BoDV-1-P und -X, -N, -M und -L sind nachgewiesen (SCHWEMMLE *et al.*, 1998; KOBAYASHI *et al.*, 2003; CHASE *et al.*, 2007). Zudem wird dem viralen Phosphoprotein eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der BD zugeschrieben, indem es mit neuronalen Substraten um die Phosphorylierung durch PKC ϵ konkurriert (VOLMER *et al.*, 2006; PRAT *et al.*, 2009). BoDV-1-P fungiert als Locksubstrat für die TANK-Bindungskinasen 1 (TBK1), konkurriert mit dem Interferon-Regulationsfaktor-3 und -7 und unterdrückt dadurch die IFN- β -Induktion, die Synthese der induzierbaren Stickoxidase-Synthase (iNOS) und möglicherweise auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) (BOURTEELE *et al.*, 2005; PENG *et al.*, 2007; PLANZ *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurde für das virale Phosphoprotein eine Interaktion mit den microRNAs miR-122 und miR-155 gezeigt, die auch zur Hemmung der IFN-Expression vom Typ I in persistent infizierten Zellen beiträgt (QIAN *et al.*, 2010; ZHAI *et al.*, 2013).

Matrixprotein, BoDV-1-M

Es handelt sich beim BoDV-1-M um ein 6 kDa schweres Protein, welches in nicht-glykosylierter Form einen Teil der Virushülle darstellt (KRAUS *et al.*, 2001; KRAUS *et al.*, 2005). Es steht außerdem in Kontakt mit dem RNP, indem es an das virale Phosphoprotein bindet. Im Gegensatz zu anderen negativsträngigen RNA-Viren hat das BoDV-1-M keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der Polymerase, wie es häufig bei derartigen Viren, beispielsweise den Tollwut-Viren, der Fall ist. Ihnen wird

vielmehr eine Rolle bei dem Zusammenbau und der Freisetzung reifer Viruspartikel zugesprochen (MAYER *et al.*, 2005; CHASE *et al.*, 2007). Das M-Protein soll auch an der Regulation der Virusreplikation und -transkription sowie am Transport von Ribonukleoprotein-Komplexen beteiligt sein (KRAUS *et al.*, 2001).

Glykoprotein , BoDV-1-GP

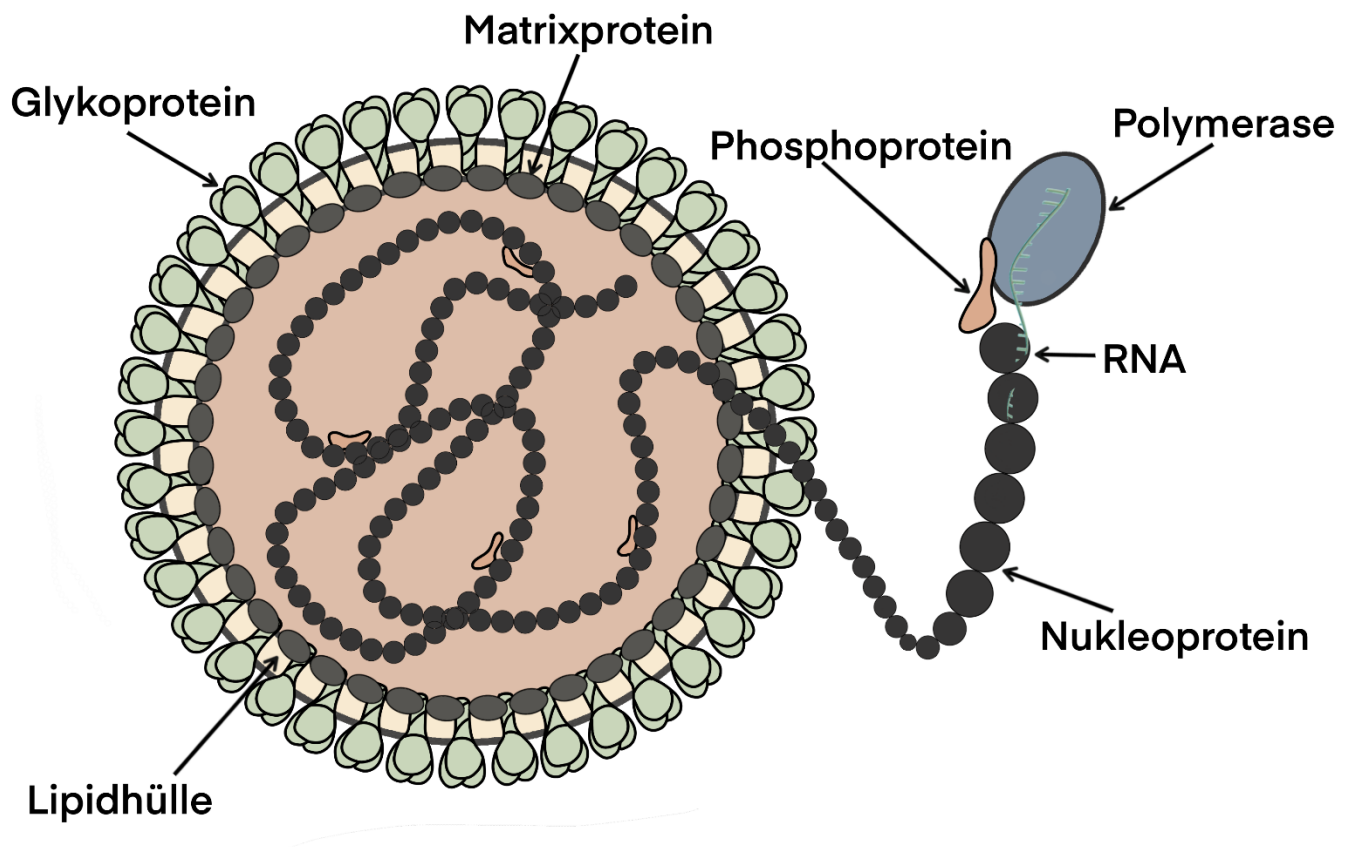
Zusammen mit dem Matrixprotein bildet dieses 84 bis 94 kDa schwere Protein als klassisches Typ-I-Membranprotein einen Teil der Virushülle (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; SCHNEIDER *et al.*, 1997; RICHT *et al.*, 1998). Eine variable, posttranslationale Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum (ER) bedingt dabei die unterschiedlichen Gewichte (SCHNEIDER *et al.*, 1997). Das Glykoprotein wird im endoplasmatischen Retikulum durch die zelluläre Subtilisin-ähnliche Protease Furin (siehe 2.2.1) in zwei biologisch aktive Formen, eine N- (GP1, 27 kDa) und eine C-terminale Untereinheit (GP2, 29 kDa) gespalten (RICHT *et al.*, 1998; KIERMAYER *et al.*, 2002). Während GP1 an der initialen Rezeptorbindung beteiligt ist, vermittelt GP2, bedingt durch seine Transmembrandomäne, die Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; RICHT *et al.*, 1998; EICKMANN *et al.*, 2005; CLEMENTE, DE LA TORRE, 2007). Somit spielt das Glykoprotein eine wichtige Rolle während der initialen Infektion und bestimmt den Zelltropismus des Virus maßgeblich (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; WERNER-KEISS *et al.*, 2008).

Virale RNA-abhängige RNA-Polymerase, BoDV-1-L

Das 190 kDa schwere Polymerase-Protein ist ein Produkt des alternativen Spleißens, ein für negativsträngige RNA-Viren einzigartiger posttranskriptioneller Vorgang (BRIESE *et al.*, 1994; SCHNEIDER *et al.*, 2003). Es interagiert unter anderem mit dem BoDV-1-P und wird wie dieses zur Aktivierung durch eine zelluläre Kinase phosphoryliert (WALKER *et al.*, 2000) sowie im Kern infizierter Zellen gefunden (SCHNEIDER *et al.*, 2004). Auch für dieses Protein wird über die Existenz einer weiteren Isoform diskutiert, die Funktion ist jedoch unklar (DE LA TORRE, 2002b).

Eine schematische Darstellung des Borna disease virus 1 findet sich in Abb. 8.

Abb. 8: Schematische Darstellung des Borna disease virus 1 (modifiziert nach ViralZone: www.viralzone.expasy.org, SIB Swiss Institute of Bioinformatics)



2.3.1.3 Infektionszyklus des BoDV-1

Virusanheftung und Viruseintritt

Das Glykoprotein (BoDV-1-GP) des BoDV-1 bindet an einen oder mehrere noch unbekannte zelluläre Oberflächenrezeptoren (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a; SCHNEIDER *et al.*, 1997). Die Rezeptorbindung führt zu einer Internalisierung des Virus über eine energieabhängige, Clathrin-vermittelte Endozytose mit nachfolgender pH-abhängiger Membranfusion, die den Ribonukleoproteinkomplex (RNP) aus

intrazellulären Vesikeln in das Zytosol der Wirtszelle freisetzt (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; CLEMENTE, DE LA TORRE, 2009). Der oben beschriebenen Spaltung des Glykoproteins in die beiden Untereinheiten kommt dabei eine entscheidende Rolle zu. Während der N-Terminus an der Rezeptorbindung beteiligt ist, initiiert der hydrophobe C-Terminus nach einer Konformationsänderung, welche durch Übersäuerung im frühen Endosom induziert wird, die Membranfusion mit der Wirtszelle (SCHNEIDER *et al.*, 1997; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2001; EICKMANN *et al.*, 2005; CLEMENTE, DE LA TORRE, 2009).

Transkription und Replikation

Die bei der Adsorption freigesetzten RNPs werden anschließend in den Nukleus transportiert, wo die Replikation und die Transkription stattfinden. Die Fähigkeit der Bornaviren, innerhalb des Zellkerns zu replizieren und zu transkribieren, ist unter den Viren der Ordnung *Mononegavirales* einzigartig (BRIESE *et al.*, 1992; CUBITT, DE LA TORRE, 1994). Der genaue Transportmechanismus ist unbekannt (CLEMENTE, DE LA TORRE, 2009). Es wird jedoch angenommen, dass Bornaviren, wie viele andere Viren auch, zelluläre Transportmechanismen nutzen, um durch den Kernporenkomplex in den Zellkern zu gelangen (SMITH, HELENIUS, 2004; FLINT *et al.*, 2009; MODROW *et al.*, 2010). Möglicherweise gelangt der RNP-Komplex durch ein nukleäres Lokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) des BoDV-1-N und -P aktiv in den Nukleus und verlässt diesen über ein nukleäres Exportsignal (*nuclear export signal*, NES) des Matrixproteins (TOMONAGA *et al.*, 2002; DE LA TORRE, 2006). Es wird vermutet, dass zunächst die Transkription der einzelnen mRNA-Spezies stattfindet, bevor eine Umschaltung zur Replikation mit Bildung identischer RNA-Stränge erfolgt (MODROW *et al.*, 2010). Neue Daten liefern Hinweise auf eine stabile Wechselwirkung zwischen BoDV-1 und den Kernhistonen in der Wirtszelle sowie auf die Modulation der epigenetischen Signalübertragung, wie die Wirkung von BoDV-1-P auf die zelluläre Histon-Acetyltransferase zeigt (MATSUMOTO *et al.*, 2012; BONNAUD *et al.*, 2015). Proteomstudien legen nahe, dass BoDV-1 an den Wegen der Histon-Acetylierung beteiligt ist (LIU *et al.*, 2014b). Die Verbindung des RNP-Komplexes mit den Chromosomen der Wirtszelle ermöglicht die Ausbreitung während der Mitose und kann zur Umgehung der Erkennung durch das Immunsystems

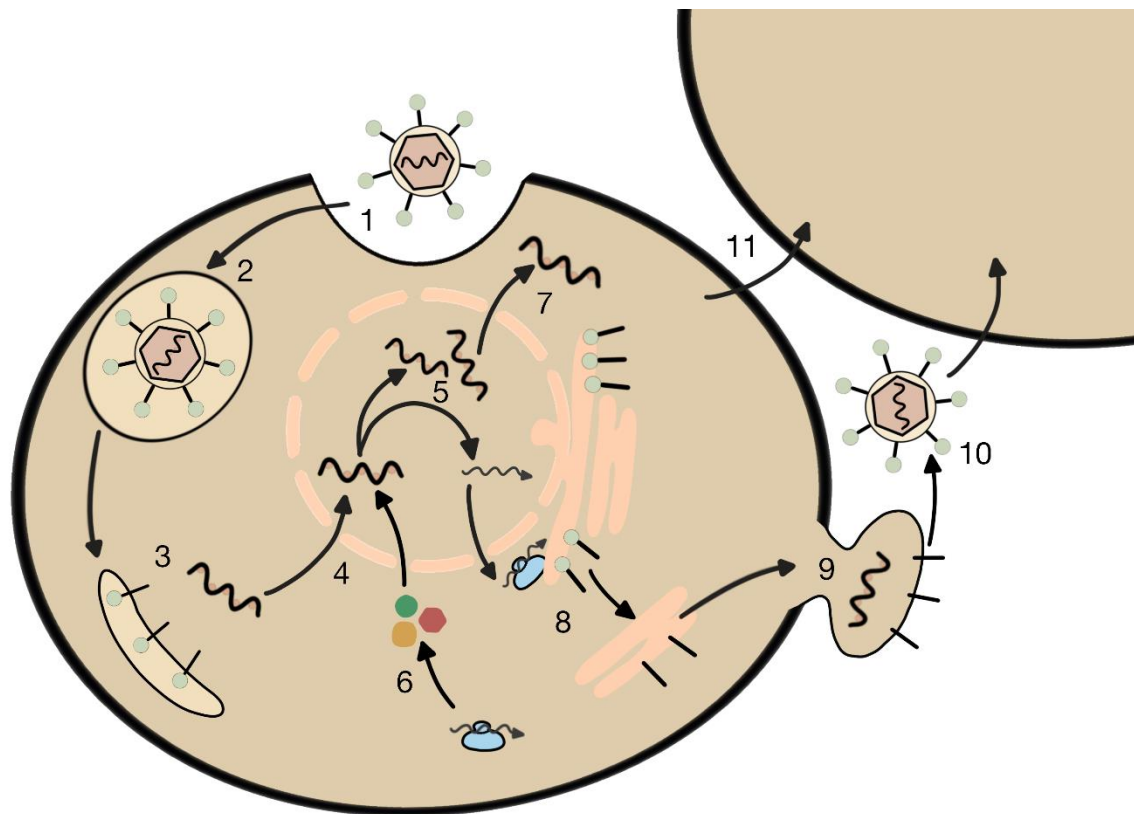
dienen, was wiederum die Persistenz erleichtert (MATSUMOTO *et al.*, 2012; CHARLIER *et al.*, 2013; BONNAUD *et al.*, 2015). Kürzlich wurde gezeigt, dass BoDV-1 als posttranskriptionelle Modifikation eine RNA-Edierung (*A to I editing*) durch doppelsträngige RNA-spezifische Adenosindesaminase (ADAR2) verwendet, um eine effiziente Virusreplikation zu erreichen, als eigene RNA im Kern zu erscheinen und die antivirale angeborene Immunantwort zu vermeiden (YANAI *et al.*, 2020).

Reifung und Freisetzung

Nach Verlassen des Kerns mittels nukleärem Exportsignal (NES), sind eine weitere Reifung, ein koordinierter Zusammenbau und die Freisetzung der infektiösen Viruspartikel vom Matrix- sowie Glykoprotein abhängig (KRAUS *et al.*, 2005). Die Freisetzung findet möglicherweise an der Zelloberfläche statt (KOHNO *et al.*, 1999; EICKMANN *et al.*, 2005), durch die punktuelle Anreicherung von Glykoproteinen und Matrixproteinen kommt es zur Bildung der zuvor erwähnten und elektronenmikroskopisch sichtbaren spike-ähnlichen Strukturen. Bei zahlreichen Viren initiiert das virale Nukleoprotein die Knospung (*budding*) der infektiösen Viruspartikel (IMHOFF *et al.*, 2007; WELSCH *et al.*, 2007; MODROW *et al.*, 2010), für BoDV-1 ist dies bisher nicht sicher belegt (NEUMANN *et al.*, 2009), vielmehr scheint das virale M-Protein dabei eine entscheidende Rolle zu spielen (KRAUS *et al.*, 2001; KRAUS *et al.*, 2005).

Eine schematische Darstellung des Infektionszyklus des Borna disease virus 1 findet sich in Abb. 9.

Abb. 9: Schematische Darstellung des Infektionszyklus des Borna disease virus 1 nach DE LA TORRE (2006)



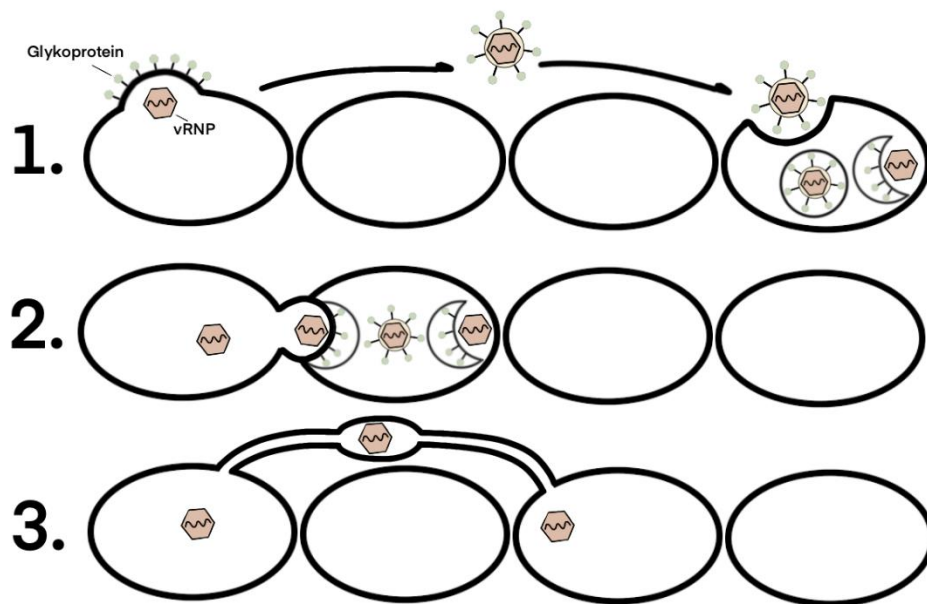
1: Rezeptorbindung und Internalisierung des Virus; 2: Endozytose; 3: Freisetzung des Ribonukleoproteinkomplex (RNP) in das Zytosol; 4: Adsorption des RNP und Transport in den Zellkern; 5: Replikation und Transkription im Zellkern; 6: Synthese von BoDV-1-L, -N und -P; 7: Verlassen des Zellkerns der synthetisierten RNPs; 8: Prozessierung der messenger RNA/Proteinbiosynthese; 9: Mögliche Knospung („budding“) infizierter Viruspartikel; 10: Mögliche Freisetzung der Viruspartikel; 11: Mögliche direkte Zell-zu-Zell-Übertragung

2.3.1.4 Infektionsweg und Virusausbreitung

Nach einer intranasalen Inokulation migriert das Virus intraaxonal und transsynaptisch von den Neurorezeptoren im olfaktorischen Epithel in das Gehirn. Daher wird vermutet, dass die intranasale Infektionsroute die wichtigste bei der natürlichen BoDV-1-Infektion darstellt. Das frühe Vorkommen von BoDV-1-Antigen im Riechepithel und in zentralen Anteilen der Riechbahn sowie das späte Auftreten derselben im Cerebellum und der Medulla oblongata, lässt auf eine deszendierende Infektion schließen (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988; KUPKE *et al.*, 2019). Zum momentanen Zeitpunkt werden drei unterschiedliche und möglicherweise parallel zueinander vorkommende

Mechanismen der Virusverbreitung im zentralen Nervensystem bei der natürlichen Infektion propagiert (LENNARTZ *et al.*, 2016). Neben der Streuung über freie infektiöse Viruspartikel, welche weit entfernte Zielzellen im eigenen oder einem fremden Organismus infizieren können, wird die Möglichkeit der direkten Zell-zu-Zell-Übertragung diskutiert. Dabei werden keine freien, infektiösen Partikel in die extrazelluläre Umgebung abgegeben und bieten somit keinen Angriffspunkt für die Immunabwehr des Wirts, wie es auch für das Influenzavirus und das Parainfluenzavirus 5 bekannt ist (ROBERTS *et al.*, 2015). Diese Strategie wird bei einer persistenten BoDV-1-Infektion vermutet. Als dritter Mechanismus wird eine Übertragung unbehüllter Viruspartikel über interzelluläre Verbindungen, sogenannte „Nanotubes“ vermutet (CUBITT, DE LA TORRE, 1994; CLEMENTE, DE LA TORRE, 2007; GERDES, CARVALHO, 2008), wie es auch für das Masernvirus und das Virus der kaninen Staupe vermutet wird (YOUNG, RALL, 2009; WYSS-FLUEHMANN *et al.*, 2010) (Abb. 10). Dagegen ist die Infektionsroute der PaBV weiterhin unbekannt, experimentell haben sich der intramuskuläre, intravenöse und intrazerebrale Übertragungsweg als erfolgreich herausgestellt, nicht jedoch der intranasale (GRAY *et al.*, 2010; PIEPENBRING *et al.*, 2012; PIEPENBRING *et al.*, 2016).

Abb. 10: Schematische Darstellung potentieller Infektionswege des Borna disease virus 1 nach LENNARTZ *et al.* (2016)



1: Knospung und Freisetzung des zellfreien Virus, welches weit entfernte Zielzellen infiziert;
 2: Knospung des entstehenden Virus und gleichzeitige Anlagerung an die benachbarte Zelle, gefolgt von einer Endozytose in der Zelle; 3: Glykoprotein-unabhängige, interzelluläre Übertragung von freiem viralem Ribonukleoprotein (vRNP) unter Verwendung von Nanotubes

2.3.2 Klinik

Nach einer natürlichen Infektion liegt die Inkubationszeit bei Pferden bei zwei bis vier Monaten (SCHMIDT, 1912, 1952; PRIESTNALL *et al.*, 2011). Die Infektion mit dem Borna disease virus 1 löst bei den natürlichen Haupt- bzw. Fehlwirten wie Pferden und Schafen eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis aus (ZWICK, 1939; NARAYAN *et al.*, 1983a) und geht mit einer Viruspersistenz einher (MAYR, DANNER, 1974; LUDWIG *et al.*, 1985; ROTT, BECHT, 1995; VAHLENKAMP *et al.*, 2002; HERDEN *et al.*, 2013). Es handelt sich in der Regel um eine Einzeltierererkrankung und klinisch zeigt sich die BD zunächst durch unspezifische Symptome wie Depression, Apathie, Somnolenz und Stupor sowie Fieber und Anorexie. Später entwickeln betroffene Tiere häufig eine für die Krankheit typische Ataxie oder Paresen. Weitere neurologische Symptome wie Kopfpresen, Drangwandern sowie eine Dysphagie, bei der die Pferde mit aus dem Maul heraushängendem Futter verharren (sogenanntes „Pfeifenrauchen“)

können beobachtet werden. Schließlich können sie einen neurogenen Torticollis und Blindheit zeigen, ein finales Koma ist beschrieben. Die Krankheit hat eine Mortalitätsrate von etwa 90 %, wobei die betroffenen Tiere in der Regel ein bis vier Wochen nach der klinischen Manifestation versterben (SCHMIDT, 1912; HEINIG, 1969; LUDWIG *et al.*, 1985; DÜRRWALD, LUDWIG, 1997; LUDWIG, BODE, 2000; RICHT *et al.*, 2007; LIPKIN *et al.*, 2011; HERDEN *et al.*, 2013). Bei der Sektion zeigen die Tiere keine auffälligen makroskopischen Veränderungen. Pathohistologisch findet man eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis mit Entzündungsherden, vor allem im Hippocampus, in der Amygdala und anderen limbischen Strukturen (DESCHL *et al.*, 1990; RICHT *et al.*, 1994; BILZER *et al.*, 1995; ROTT, BECHT, 1995; HERDEN *et al.*, 2013), sowie pathognomonische, jedoch nur inkonstant auftretende, intranukleäre Joest-Degensche Einschlusskörperchen in Neuronen und Astrozyten (JOEST, DEGEN, 1909; JOEST, DEGEN, 1911; HERDEN *et al.*, 2013). Da die entzündlichen Veränderungen häufig im Bereich des limbischen Systems zu finden sind, geht man davon aus, dass sie ursächlich für die Verhaltensänderungen verantwortlich sind (ROTT, BECHT, 1995; HORNIG *et al.*, 2001). Die Entzündungsherde bestehen aus perivaskulär orientierten Infiltraten und involvieren mitunter das angrenzende Neuropil, wobei die Infiltrate dominierend aus T-Lymphozyten, weniger aus B-Lymphozyten/Plasmazellen und Makrophagen bestehen (DESCHL *et al.*, 1990; BILZER, STITZ, 1993; ROTT, BECHT, 1995; BILZER *et al.*, 1996). Trotz der häufig recht hohen Seroprävalenz erkrankt selbst in endemischen Gebieten nur eine geringe Anzahl von Pferden an der BD. Während etwa 11,5 % der klinisch unauffälligen Pferde in Deutschland Antikörper gegen das BoDV-1 aufweisen (HERZOG *et al.*, 1994), kann man in Endemiegebieten bis zu 50 % Seroprävalenz beobachten (GRABNER *et al.*, 2002). Selbst nach experimenteller intrazerebraler Infektion konnte nicht in allen Equiden eine Serokonversion nachgewiesen werden (KATZ *et al.*, 1998). Intravital lässt sich die Diagnose einer BD bei Pferden mit klinischer Verdachtsdiagnose mit Hilfe des Nachweises BoDV-1-spezifischer Antikörper in Serum und Liquor im direkten Immunfluoreszenztest (IFA) sowie bei Serokonversion festigen (Sensitivität: 88 %; Spezifität: 100 %). Nur bei perakutem Krankheitsverlauf, in der Frühphase einer akuten Erkrankung und durch immunsuppressive Maßnahmen kann es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen (GRABNER *et al.*, 2002). Zur postmortalen Diagnostik eignet sich neben dem Nachweis spezifischer Antigene im Gewebe mittels

Immunhistochemie oder Western Blot auch der Nachweis des Virusgenoms mittels RT-PCR (JOEST, DEGEN, 1911; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b).

2.3.3 Wirtsspektrum, Epidemiologie und Pathogenese

Wirtsspektrum ausgewählter Orthobornaviren

Mammalian 1 Orthobornavirus

Empfänglich für das BoDV-1 sind, neben Pferden und Schafen, auch diverse andere Säugetierspezies wie Rinder und Ziegen (IHLENBURG, 1962; DÜRRWALD, 1993; BODE *et al.*, 1994a; CAPLAZI *et al.*, 1994) oder Neuweltkamelien (ALTMANN *et al.*, 1976; JACOBSEN *et al.*, 2010; SCHULZE *et al.*, 2020; MALBON *et al.*, 2021). Bei Katzen wird das Krankheitsbild der sogenannten „*staggering disease*“ von einigen Autoren mit einer BoDV-1-Infektion in Verbindung gebracht, dies wird jedoch kontrovers diskutiert (LUNDGREN *et al.*, 1993; LUNDGREN, LUDWIG, 1993; LUNDGREN *et al.*, 1995; NOWOTNY, WEISSENBOCK, 1995; BERG, 1999; KAMHIEH, FLOWER, 2006; WENSMAN *et al.*, 2014). Des Weiteren existieren Einzelfallberichte über die Erkrankung von Hunden und anderen Kaniden an der BD, sie wiesen eine vergleichbare Meningoenzephalitis auf und ein Virusnachweis konnte molekularbiologisch erbracht werden (WEISSENBÖCK *et al.*, 1998a; DEGIORGIS *et al.*, 2000; OKAMOTO *et al.*, 2002). Nach experimenteller Infektion sind auch Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten, Hühner und Primaten empfänglich für das Virus (ZWICK, SEIFRIED, 1925; BECK, FROHBÖSE, 1926; NICOLAU, GALLOWAY, 1928; ZWICK, SEIFRIED, 1929; PETTE, KÖRNYEY, 1935).

Inwiefern beim Menschen Infektionen mit dem BoDV-1 auftreten und mit welchen Krankheitsbildern eine derartige Infektion gegebenenfalls einhergeht, war lange Zeit Gegenstand kontroverser Diskussionen (LUDWIG, 2008; HORNIG *et al.*, 2012; GFV, 2018). Bereits seit den 1980er Jahren berichten Wissenschaftler weltweit über potentielle Assoziationen zwischen einer BoDV-1-Infektion und neurologischen sowie psychiatrischen Krankheitsbildern (AMSTERDAM *et al.*, 1985; BODE *et al.*, 1994b; BODE *et al.*, 1995; HATALSKI *et al.*, 1997). Retrospektiv konnte durch Analysen der Genomsequenzen gezeigt werden, dass in damaligen Untersuchungen die

Virusisolate aus den menschlichen Proben mit hoher Wahrscheinlichkeit die Folge von Kontaminationen mit Laborstämmen des BoDV-1 waren (LIEB *et al.*, 1997; DÜRRWALD *et al.*, 2007).

Im Jahr 2018 wurden hingegen erstmals BoDV-1-Infektionen beim Menschen zweifelsfrei nachgewiesen. Untersuchungen des Friedrich-Loeffler-Instituts sowie anderer wissenschaftlicher Einrichtungen und Universitätskliniken identifizierten bei drei Empfängern von Spenderorganen (Leber und Nieren) eines einzelnen Organspenders BoDV-1 als Auslöser einer zum Teil letalen Enzephalitis (FLI, 2018; SCHLOTTAU *et al.*, 2018). Ein regionaler Zusammenhang ist insofern auffällig, als Spender und Empfänger aus einem bekannten Verbreitungsgebiet des BoDV-1 stammen und die isolierten Virusstämme hohe Übereinstimmungen mit Stämmen von Pferden und Spitzmäusen aus eben dieser Region aufwiesen (Homologien von 99,3 % bis 99,7 %). Bisher konnte keine Virusausscheidung durch infizierte Menschen nachgewiesen werden. Die Autoren gehen davon aus, dass es sich bei dieser nosokomialen Übertragung des Virus durch die Transplantation um sehr seltene Einzelfälle einer BoDV-1-Infektion des Menschen handelt. Diese Fälle unterscheiden sich aufgrund des umschriebenen Krankheitsbildes, dem direkten und indirekten Virusnachweis und nicht zuletzt durch den epidemiologischen Bezug zum Virusreservoir deutlich von den früheren Beschreibungen humaner BoDV-1-Infektionen (RUBBENSTROTH *et al.*, 2018b). Ebenfalls im Jahr 2018 wurde ein weiterer Bericht über einen BoDV-1-assoziierten Krankheitsfall bekannt (KORN *et al.*, 2018). Ein 25 Jahre alter Mann mit anamnestisch hohem Fieber sowie Kopfschmerzen zeigte einen progressiven Krankheitsverlauf mit schließlich generalisiertem Hirnödem und Meningitis. Der Mann verstarb trotz intensivmedizinischer Maßnahmen etwa drei Wochen nach dem Auftreten der klinischen Symptome. Durch metagenomische Analysen aus dem Autopsiematerial dieses Patienten konnte die nahezu vollständige Sequenz des BoDV-1 detektiert werden. Phylogenetische Analysen zeigten, dass auch hier die isolierte Virussequenz der von Pferden und Spitzmäusen gleicht. BoDV-1-RNA konnte retrospektiv in den Liquorproben des Patienten nachgewiesen werden, eine Serokonversion war acht Tage nach Krankheitsbeginn zu sehen. Nachträglich durchgeführte Untersuchungen konnten eine nicht-eitrige Enzephalitis mit mononukleären Infiltraten sowie intranukleären, eosinophilen Einschlüssen zeigen (KORN *et al.*, 2018). In einer retrospektiven, molekularbiologischen Untersuchung

konnte auch in einer 1996 post mortem asservierten Gehirnbiose einer 31-jährigen Frau BoDV-1-RNA detektiert werden. Die Patientin war mit Parästhesien, Taubheit in den Beinen und fehlenden peripheren Reflexen aufgefallen und mit Verdacht auf Guillain-Barré-Syndrom (GBS) behandelt worden. Anhand einer Biopsie des N. suralis konnte intravital eine axonale inflammatorische Neuropathie nachgewiesen werden, in einer Gehirnbiose zeigte sich eine disseminierte mononukleäre Meningoenzephalitis, in einer immunhistologischen Untersuchung konnte zudem BoDV-1-Nukleoprotein detektiert werden. Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen waren zu einem späteren Zeitpunkt auch Virus-Partikel nachweisbar (CORAS *et al.*, 2019). Durch ein postmortales BoDV-1-Screening aktueller humaner Fälle mit einer bis dato ungeklärten Enzephalitis konnten LIESCHE *et al.* (2019) fünf weitere sporadische Fälle einer tödlichen BoDV-1-Infektion nachweisen. Alle Patienten zeigten eine nicht-eitrige Panenzephalitis mit perivaskulärer Akzentuierung sowie Joest-Degensche Einschlusskörperchen. BoDV-1-Nukleoprotein und spezifische RNA waren mittels Immunhistochemie und RT-qPCR im Gehirn und im Rückenmark aller Patienten sowie in allen untersuchten peripheren Nerven nachweisbar. Es konnten infizierte Zelltypen, einschließlich Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, identifiziert werden. Im Gegensatz dazu waren Mikroglia sowie Makrophagen und Lymphozyten nicht infiziert. Während die Zusammensetzung der pathohistologischen Veränderungen konsistent zu sein scheint, variiert das Verteilungsmuster der Läsionen interindividuell, was laut Autoren auf unterschiedliche Eintrittswege oder den individuellen Immunstatus hinweisen könnte. Alle Patienten kommen aus Süddeutschland, einer endemischen Region für BoDV-1. Eine retrospektive Studie von NILLER *et al.* (2020) konnte weitere acht Fälle einer fatalen BoDV-1-Infektion beim Menschen identifizieren. BoDV-1-Sequenzinformationen und epidemiologische Analysen zeigten, dass höchstwahrscheinlich eine *Spill-over*-Übertragung aus dem lokalen Wildtierreservoir erfolgte. Dabei unterschieden sich die humanen BoDV-1-Sequenzen voneinander sowie von den weit verbreiteten Laborstämmen, was die Möglichkeit einer Kontamination über die Probe hinaus ausschließt. Als potentielle Risikofaktoren werden das Leben in ländlichen oder vorstädtischen Gebieten, landwirtschaftliche Tätigkeiten oder andere Aktivitäten im Freien sowie Tierkontakte diskutiert (NILLER *et al.*, 2020). Der direkte Virusnachweis von Bornaviren beim Menschen ist seit dem 1. März. 2020 gemäß §7 IfSG für Labore an das Gesundheitsamt meldepflichtig. Wieder meldepflichtig ist nach der Verordnung über

meldepflichtige Tierkrankheiten (TKrMeldpfIV) seit März 2020 auch der direkte Nachweis einer Bornavirusinfektion bei einem Säugetier.

Mammalian 2 Orthobornavirus

Zwischen 2011 und 2013 verstarben drei Bunthörnchenzüchter aus Sachsen-Anhalt mit identischen klinischen Anzeichen wie anfänglichem Fieber und fortschreitenden neurologischen Symptomen an einer progressiven (Meningo-) Enzephalitis. Mittels Metagenomanalysen konnte ein bis dahin unbekanntes Bornavirus sowohl in Gehirngewebe der Züchter als auch in einem Bunthörnchen (*Sciurus variegatoides*) aus einem der Bestände nachgewiesen werden (HOFFMANN *et al.*, 2015). Phylogenetisch zeigt das als „variegated squirrel bornavirus 1“ (VSBV-1) benannte Virus 70,3 - 81,2 % Homologie zum BoDV-1. Die vergleichbaren Reaktionsmuster in den immunhistologischen Untersuchungen sowie die Detektion von Bornavirus-spezifischen Antikörpern im Serum sowie im Liquor in nahezu allen untersuchten Proben der Züchter und des Tieres sprechen für eine enge Verwandtschaft der beiden Viren. Die Ähnlichkeit der Genome lässt vermuten, dass das VSBV-1 mehr dem BoDV-1 als einem der aviären Bornaviren zugehörig ist. Der Übertragungsweg dieses Bornavirus mit zoonotischem Potential ist bisher nicht bekannt, die Anamnese der Patienten sowie die hohen RNA-Gehalte im Speichel des untersuchten Bunthörnchens legen jedoch eine Infektion über Biss- bzw. Kratzwunden nahe (HOFFMANN *et al.*, 2015).

Ein weiterer Fall einer limbischen Enzephalitis einer im zoologischen Garten tätigen Tierpflegerin aus dem Jahr 2013 konnte retrospektiv auf eine Infektion mit dem VSBV-1 zurückgeführt werden. In einem Prevost-Hörnchen (*Callosciurus prevostii*) aus derselben zoologischen Einrichtung konnte das Virus nachgewiesen werden. Eine genetische Charakterisierung und phylogenetische Gruppierungen der Sequenzen legen eine *Spill-over*-Infektion des Hörnchens als Infektionsquelle für die Pflegerin nahe. Die isolierten Cluster wiesen > 99 % Übereinstimmung auf, auch hier konnten die für BoDV-1 typischen Joest-Degenschen Einschlusskörperchen in Basalganglien der Pflegerin gefunden werden (TAPPE *et al.*, 2018). Wie auch bei HOFFMANN *et al.* (2015) beschrieben, zeigte das Hörnchen keine klinischen Symptome und lediglich

milde Entzündungsreaktionen im Gehirn. Hörnchen fungieren mutmaßlich als natürliches Reservoir des VSBV-1 (SCHLOTTAU *et al.*, 2017b; TAPPE *et al.*, 2018). Retrospektive Untersuchungen deutscher Züchter und Halter exotischer Hörnchen konnten zwei weitere, zurückliegende, mögliche humane Infektionen mit dem VSBV-1 detektieren. Zudem wurde ein seropositiver Züchter identifiziert, zusammen mit den erhobenen anamnestischen Daten deuten die Befunde wahrscheinlich auf eine überstandene Infektion hin (TAPPE *et al.*, 2019a). Immunhistochemische Untersuchungen an Gehirnmaterial VSBV-1 infizierter Menschen weisen auf eine T-Zell-vermittelte Immunpathologie bei humaner VSBV-1-Infektion hin, wie sie auch bei BoDV-1-assoziierten Läsionen in natürlichen und experimentellen Infektionen auftreten (TAPPE *et al.*, 2019b).

Schlottau *et al.* (2017b) konnten im Rahmen eines gezielten Screenings von mehr als 450 Vertretern der Familie *Sciuridae* bei 2,6 % sowohl VSBV-1-RNA als auch Virus-spezifische Antikörper nachweisen. Ein Teil der Tiere stammt nachweislich aus der Haltung, in der 2014 das erste Bunthörnchen mit VSBV-1 detektiert wurde (HOFFMANN *et al.*, 2015). Eine zweite Studie mit 328 Individuen dieser Familie zeigte, dass mit dem Rotschwanzhörnchen (*Sciurus granatensis*) ein weiterer Vertreter der Subfamilie der Baum- und Gleithörnchen (*Sciurinae*) das Virus tragen kann. Zudem konnte das VSBV-1 in der Subfamilie der Schönhörnchen (*Callosciurinae*) neben dem Prevost-Hörnchen auch in einem Finlayson-Hörnchen (*Callosciurus finlaysonii*) und in einem Chinesischen Baumstreifenhörnchen (*Tamiops swinhoi*) nachgewiesen werden (SCHLOTTAU *et al.*, 2017a). Diese Untersuchungen konnten zudem darlegen, dass sowohl Abstriche aus der Maulhöhle als auch Kotproben der Tiere geeignete Proben für eine sensitive und zugleich praktikable *intra-vitam*-Diagnostik darstellen (SCHLOTTAU *et al.*, 2017a; SCHLOTTAU *et al.*, 2017b). Die in einer Studie beobachtete Organverteilung des VSBV-1-Antigens in natürlich infizierten Bunthörnchen sowie Prevost-Hörnchen (Nervensystem, respiratorisches System, Verdauungssystem, urogenitales System, lymphatische Organe sowie Haut und Drüsen) unterstützt die Annahme, dass Hörnchen eine wichtige Rolle als Virusüberträger und bei der Virusverbreitung spielen (PETZOLD *et al.*, 2019). Mit der Detektion von Entzündungsinfiltrationen im zentralen sowie peripheren Nervensystem

der untersuchten Hörnchen zeigen sich jedoch erkennbare Unterschiede zur Spitzmaus als Virusreservoir des BoDV-1.

Experimentell konnten neonatale Lewis-Ratten erfolgreich intrazerebral mit dem VSBV-1 infiziert werden. Bei diesen Tieren wurde eine nicht-eitrige Enzephalitis nachgewiesen, ohne dass zuvor klinische Symptome detektierbar waren (SCHLOTTAU *et al.*, 2020).

Passeriform 1/2, Psittaciform 1/2 und Waterbird 1 Orthobornavirus

Molekularbiologische Gewebsuntersuchungen von an der neuropathischen Drüsenmagenerweiterung (*proventricular dilatation disease*, PDD) erkrankten Vögeln haben 2008 zur Entdeckung eines neuen Bornavirus geführt, welches zunächst als aviäres Bornavirus klassifiziert wurde (HONKAVUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008). Bei der PDD handelt es sich um eine häufig letale Erkrankung von Papageienvögeln, die sich klinisch durch Maldigestion und konsekutive Abmagerung sowie durch eine charakteristische Dilatation des Drüsenmagens äußert und histologisch als eine nicht-eitrige Entzündung des autonomen Nervensystems des Verdauungstrakts in Erscheinung tritt sowie eine Enzephalitis auslöst (HONKAVUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008; RUBBENSTROTH *et al.*, 2014; HOPPE, SHIVAPRASAD, 2020). Inzwischen wurden weitere vogelspezifische Vertreter der Virusfamilie entdeckt, welche Gänse- und Sperlingsvögel sowie Möwen infizieren (WEISSENBOCK *et al.*, 2009b; DELNATTE *et al.*, 2011; RUBBENSTROTH *et al.*, 2013; RUBBENSTROTH *et al.*, 2014; GUO *et al.*, 2015) und in der Taxonomie nach AMARASINGHE *et al.* (2018) reorganisiert wurden (siehe Tab. 1).

Epidemiologie

Die Ausprägung einer BD ist weitestgehend auf Pferde und Schafe in Zentraleuropa limitiert. Zu den bekannten Endemiegebieten zählen in Deutschland Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen (ZWICK, 1939; HEINIG, 1969). Die derzeitige Inzidenz in Bayern kann laut GRABNER *et al.*

(1998) mit jährlich 0,02 bis 0,04 Prozent geschätzt werden. Auch Gebiete in Liechtenstein, Österreich und der Schweiz gelten als endemisch (METZLER *et al.*, 1976; SUCHY *et al.*, 1997; WEISSENBOCK *et al.*, 1998b). Neben den beschriebenen Endemiegebieten wurden BoDV-1-seropositive Tiere auch in weiteren europäischen (GALABRU *et al.*, 2000; YILMAZ *et al.*, 2002; KINNUNEN *et al.*, 2007; BJORNSDOTTIR *et al.*, 2013) sowie außereuropäischen Ländern (KAO *et al.*, 1993; TANIYAMA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2014) identifiziert, wobei in den meisten Untersuchungen BoDV-1-Antikörper im Serum klinisch gesunder Tiere nachgewiesen wurden. Ebenso konnten aviäre Bornaviren bei mehr als 80 Arten von psittaziden und nicht-psittaziden Vögeln in vielen Weltteilen ohne Ausbildung von eindeutigen Endemiegebieten nachgewiesen werden (HONKAVUORI *et al.*, 2008; KISTLER *et al.*, 2008; WEISSENBOCK *et al.*, 2009a; DELNATTE *et al.*, 2011; HOPPES, SHIVAPRASAD, 2020).

Allgemein wurde eine saisonale Häufung der Krankheitsfälle im Frühjahr mit deutlicher Abnahme zum Jahresende hin beobachtet (SCHMIDT, 1912; HEINIG, 1969; GRABNER, FISCHER, 1991; HERZOG *et al.*, 1994; UHLIG, KINNE, 1998), worauf sich schon früh die Annahme eines Nagetierreservoirs stützte (DÜRRWALD *et al.*, 2006). Die Feldspitzmaus (*Crocidura leucodon*) konnte erstmals von HILBE *et al.* (2006) als Virusreservoir für BoDV-1 in der Schweiz identifiziert werden. BOURG *et al.* (2013) konnten dies auch für die Feldspitzmaus in Deutschland bestätigen und Sequenzhomologien zu equinen BD-Fällen der Region Bayern von bis zu 100 % finden. Die insektivor lebenden Tiere sind asymptomatisch infiziert und das Virus kann neben dem Gehirn auch in Organen wie der Milz und den Geschlechtsorganen, in Geweben wie dem respiratorischen Epithel, dem Bronchialepithel oder der Haut (PUORGER *et al.*, 2010) sowie im Speichel, der Tränenflüssigkeit und im Urin nachgewiesen werden (NOBACH *et al.*, 2015). Die Untersuchungen von NOBACH *et al.* (2015) zeigen eine persistente BoDV-1-Infektion mit einer kontinuierlichen Virusausscheidung, wie sie beispielweise von neonatalen Ratten bekannt ist (NARAYAN *et al.*, 1983b), jedoch ohne die Ausprägung histologischer Veränderungen im Gehirn. Die horizontale Virusübertragung bei Spitzmäusen kann vermutlich über direkten Kontakt mit Sekreten oder Exkreten, der Haut oder aber über kontaminiertes Material aus der Umgebung stattfinden, eine vertikale Übertragung des BoDV-1 scheint aufgrund des Nachweises von Virus-Antigen in uterinem sowie testikulärem

Gewebe möglich (PUORGER *et al.*, 2010; NOBACH *et al.*, 2015). Indessen sind die Infektionsroute sowie die Frage, ob eine inkompetente Immuntoleranz eine Voraussetzung für eine persistente Infektion für Spitzmäuse darstellt, weiterhin unklar.

Endogene virale Sequenzen (*endogenous viral sequences*; endogene virale Elemente [EVE]) sind in das Genom von Eukaryoten integrierte, virale Nukleinsäuresequenzen (KATZOURAKIS, GIFFORD, 2010). Ein Großteil der EVE stammt von Retroviren ab, die ihr Genom als essentiellen Replikationsschritt mit Hilfe der Reversen Transkriptase in das Wirtsgenom integrieren (KATZOURAKIS, GIFFORD, 2010). Abhängig vom Selektionsdruck können sich EVE im Laufe der Evolution im Genom manifestieren oder wieder eliminiert werden (HORIE, 2017). Die erst 2010 entdeckten endogenen, Bornavirus-ähnlichen Elemente (EBL) stellen unter den EVE eine Besonderheit dar, da sie die einzigen Elemente von negativsträngigen RNA-Viren sind, die im menschlichen Genom, sowie dem von Insekten, Fischen, Reptilien, Vögeln, Nagetieren und Primaten, gefunden wurden (BELYI *et al.*, 2010; HORIE *et al.*, 2010; KATZOURAKIS, GIFFORD, 2010; CUI *et al.*, 2014; GILBERT *et al.*, 2014; HORIE, 2017). Dabei stellt die enge Assoziation an das Wirtsgenom bei der Replikation von Bornaviren wahrscheinlich einen integrationsbegünstigenden Faktor dar (MATSUMOTO *et al.*, 2012). Die Bedeutung der EBL ist bislang nicht hinreichend bekannt, es wird jedoch eine neue Art einer antiviralen Immunabwehr vermutet (HORIE *et al.*, 2010; FUJINO *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2020). Derartige Nukleinsäuresequenzen wurden bislang vor allem im Genom von experimentellen Modelltieren (Ratte, Maus) sowie dem des Menschen, aber auch in Feldspitzmäusen, dem Reservoirwirt des Virus, detektiert - jedoch nicht in natürlichen Wirten wie dem Pferd oder dem Schaf (BELYI *et al.*, 2010). Chronische Virusinfektionen können zur Integration von Teilen des viralen Genoms führen. Während deren Expression dem Wirt möglicherweise eine gewisse Resistenz gegenüber einer erneuten Infektion mit dem Virus ermöglichen kann, kann der resistente Organismus dem Virus als Reservoir dienen und die Viruspersistenz und Transmission unterstützen (BELYI *et al.*, 2010; HORIE, TOMONAGA, 2019).

Pathogenese

Anfänglich wurde die einzigartige Neuropathogenese des Borna disease virus 1 hauptsächlich am Modell adulter Ratten untersucht. Die Immunpathologie bei adulten, experimentell infizierten Ratten stellt eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ dar, wobei neben Makrophagen sowohl CD4+- als auch CD8+-T-Zellen und in späteren Stadien der Infektion auch Plasmazellen zu den immunpathologischen Ereignissen beitragen (NARAYAN *et al.*, 1983a; DESCHL *et al.*, 1990; STITZ, 1991b; HERDEN *et al.*, 2000; NOBACH *et al.*, 2020). Verhaltens- und Bewegungsstörungen bei adulten, infizierten Ratten wurden außerdem mit Funktionsstörungen des Dopamin-Neurotransmittersystems in Verbindung gebracht (SOLBRIG *et al.*, 1994; SOLBRIG *et al.*, 1995; SOLBRIG *et al.*, 1996). Neben entzündlichen Infiltraten im Gehirn finden sich bei adult infizierten Lewis-Ratten auch regelmäßig eine Mikrogliaaktivierung und eine Astroglie (DESCHL *et al.*, 1990; HERDEN *et al.*, 2000), dabei besteht die Astroglie auch bei Rückgang der Immunzellinfiltration in der späten Phase der BD weiter (DESCHL *et al.*, 1990; GOSZTONYI, LUDWIG, 1995). Weiterhin kann nach BoDV-1-Infektion adulter Ratten eine nicht-eitrige Retinitis mit progressiver Zerstörung der Photorezeptoren und der Körnerschicht mit konsekutiver Erblindung der Tiere beobachtet werden (NARAYAN *et al.*, 1983b; GEISS *et al.*, 1990; KACZA *et al.*, 2000). Die klinische Symptomatik der BD ist keine direkte Folge der Virusinfektion, sondern beruht auf virusinduzierten, immunpathologischen Vorgängen, die einer Hypersensibilitätsreaktion vom Typ IV entsprechen (NARAYAN *et al.*, 1983b, a; RICHT *et al.*, 1989; DESCHL *et al.*, 1990; STITZ, 1991a; RICHT *et al.*, 1994; RICHT, ROTT, 2001; STITZ *et al.*, 2002; RICHT *et al.*, 2007). In Bezug auf die Rolle neutralisierender Antikörper liegen kontroverse Daten vor. Ein Serumtransfer bei immunsupprimierten Lewis-Ratten verhindert zwar die persistierende ZNS-Infektion nicht, begrenzt jedoch die Virusausbreitung auf das neuronale Gewebe (STITZ *et al.*, 1998a). In anderen Untersuchungen wurden neutralisierende Antikörper wenn erst zu späten Zeitpunkten nach der Infektion beobachtet (RICHT, ROTT, 2001).

Natürlich infizierte Pferde zeigen eine ähnliche Zusammensetzung infiltrierender Immunzellen und eine erhöhte Expression von MHC-Klasse I- und II-Antigenen, wie sie für experimentell infizierte Ratten beschrieben wurden (BILZER *et al.*, 1995;

CAPLAZI, EHRENSPERGER, 1998; HERDEN *et al.*, 1999). Somit ist davon auszugehen, dass die zugrunde liegende Neuropathogenese auch bei natürlich infizierten Wirten immunbedingt ist.

2.3.4 Experimentelle BoDV-1-Infektion von Ratten

Ratten sind wie eine Vielzahl von anderen Labornagetieren empfänglich für das BoDV-1 (ZWICK *et al.*, 1926; ERNST, HAHN, 1927). Als Besonderheit besteht bei Ratten in Bezug auf die Entwicklung klinischer und pathomorphologischer Veränderungen eine strikte Altersabhängigkeit. Während adulte, immunkompetente Ratten eine akute, nicht-eitrige Enzephalitis entwickeln, zeigen die immunologisch naiven Jungtiere sowie auch immunsupprimierter Tiere eine persistierende Infektion ohne klinische Symptome (NARAYAN *et al.*, 1983a, b). Die klinische Manifestation ist außerdem abhängig vom Rattenstamm (HERZOG *et al.*, 1984; HERZOG *et al.*, 1991) und der experimentellen Infektionsroute. Während ein erfolgreicher intrazerebraler, intranasaler, intraperitonealer, intramuskulärer, intraokulärer und subkutaner Infektionsweg beschrieben sind, führt eine intravenöse Virusapplikation nicht zur Infektion (ZWICK *et al.*, 1926; HEINIG, 1969; NARAYAN *et al.*, 1983b; CARBONE *et al.*, 1987).

2.3.4.1 Intrazerebrale Infektion neonataler Ratten

Neonatale, immuninkompetente Ratten, sowie auch immunsupprimierte Tiere, produzieren bereits nach wenigen Tagen *post infectionem* (p.i.) infektiöses Virus im zentralen Nervensystem, zu einem späteren Zeitpunkt virales Antigen in den meisten Organen, zeigen jedoch kaum klinische Symptome. Infektiöses Virus scheiden sie über Sekrete wie Speichel, Urin und Tränenflüssigkeit aus (HERZOG *et al.*, 1984; MORALES *et al.*, 1988; SAUDER, STAEHELI, 2003). Neonatal infizierte Ratten zeigen Hippocampus- und Kleinhirn-Dysgenese sowie Verhaltensänderungen, während keine nennenswerte Entzündung im Gehirn vorliegt. Ratten, die am ersten Lebenstag als Neugeborene mit dem Virus einer geringen Passage inokuliert werden, infizieren sich persistent, sind kleiner als nicht-infizierte Wurfgeschwister und weisen nur geringe

Verhaltensstörungen auf, die sich als kognitive, emotionale oder soziale Defizite bemerkbar machen (DITTRICH *et al.*, 1989; CARBONE *et al.*, 1991; BAUTISTA *et al.*, 1994; BAUTISTA *et al.*, 1995; HORNIG *et al.*, 1999; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000).

2.3.4.2 Intrazerebrale Infektion adulter Ratten

Nach der Infektion adulter, immunkompetenter Ratten zeigen die Tiere nach 14-20 dpi (*days post infection*) klinische Symptome einer BD mit biphasischem Verlauf, welcher dem der natürlichen Wirte gleicht (ERNST, HAHN, 1927; NARAYAN *et al.*, 1983b, a; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005). Die erste, aktive Phase ist von Aggressivität, Koordinationsstörungen und Hyperaktivität gekennzeichnet. Die zweite, inaktive Phase, welche etwa nach 60-75 dpi einsetzt, zeichnet sich durch Apathie und Somnolenz sowie inkonstant auch der Entwicklung einer Obesitas aus, ein Teil der Tiere erblindet etwa 100 Tage nach der Infektion (NARAYAN *et al.*, 1983b, a). Das Virus zeigt einen strengen Neurotropismus und ist exklusiv in Nervengewebe zu finden (HIRANO *et al.*, 1983; NARAYAN *et al.*, 1983b; HERZOG *et al.*, 1984). Bereits nach sieben Tagen nach der intrazerebralen Inokulation kann infektiöses Virus sowie virales Antigen in vielen Teilen des Gehirns, unter anderem dem Bulbus olfactorius, dem Hippocampus und dem Cerebellum, sowie der Retina nachgewiesen werden (NARAYAN *et al.*, 1983a; HERDEN *et al.*, 2000). Eine nicht-eitrige Meningoenzephalitis findet sich, abhängig von der Viruspassage, nach 30-40 Tagen (NARAYAN *et al.*, 1983b, a; HERDEN *et al.*, 2000; HERDEN *et al.*, 2005; WERNER-KEISS *et al.*, 2008), wobei die Ausbreitung der Inflammation in Motoneurone des Hirnstamms und des Rückenmarks sowie die der zerebellären Neurone für die Koordinationsstörungen, die Infektion des Hypothalamus dagegen für das gestörte Fressverhalten bis hin zur Obesitas verantwortlich sein kann (CARBONE *et al.*, 1987; HERDEN *et al.*, 2000). Die Bildung nicht-neutralisierender Antikörper beginnt bereits in der ersten, akuten Phase der Erkrankung (BRIESE *et al.*, 1995; FURRER *et al.*, 2001). Zu diesem Zeitpunkt wird die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 α , IL-6 und IFN γ erhöht, während in der chronischen Krankheitsphase mit Viruspersistenz ein Wechsel von der Th1- zu einer Th2-gewichteten Immunantwort stattfindet und überwiegend IL-4 gebildet wird (STITZ *et al.*, 1995; HATALSKI *et al.*,

1998). Mit zunehmender Inflammation kann es durch Neuronophagie auch zur Ausbildung eines *Hydrocephalus ex vacuo* kommen (NARAYAN *et al.*, 1983a, b).

2.3.4.3 Intranasale Infektion adulter Ratten

Ratten, die in einem Alter von 4-5 Wochen intranasal mit dem BoDV-1 infiziert werden, zeigen häufig nach 18-24 Tagen klinische Anzeichen einer BD (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988) und sterben, abhängig vom Virusstamm, in bis zu 90 % der Fälle innerhalb einer Woche nach dem Auftreten erster klinischer Symptome. In neueren Studien konnten bis zu 21 Tage nach der intranasalen Infektion weder neurologische Störungen noch andere klinische Anzeichen beobachtet werden (KUPKE *et al.*, 2019). Die Demonstration von BoDV-1-Antigenen gelang im olfaktorischen Epithel bereits nach 4 dpi in einzelnen reifen olfaktorischen Neuronen, nach 7 dpi in Basalzellen und nach 14 dpi auch in Stützzellen, Nervenfasern und olfaktorischen Hüllzellen (KUPKE, 2016; KUPKE *et al.*, 2019). Eine Übersicht findet sich in Tab. 2. Zentral konnten MORALES *et al.* (1988) nach acht Tagen das erste Mal BoDV-1-N-Antigen im Bulbus olfactorius intranasal infizierter, adulter Ratten zeigen, bevor es nach 10-13 Tagen dann im olfaktorischen Kortex nachgewiesen werden konnte. Eine Übersicht findet sich in Tab. 3. Infektiöses Virus hingegen konnte zuerst nach sechs Tagen p.i. in der Nasenschleimhaut und im Bulbus olfactorius dokumentiert werden, in Strukturen wie dem Frontalkortex nach 13 und dem Hippocampus nach 18 dpi. Entzündungszellinfiltrationen und ein Hirnödem konnten 18 Tage nach der experimentellen Infektion mit einer maximalen Ausprägung an Tag 27 aufgezeigt werden (MORALES *et al.*, 1988).

Tab. 2: Immunhistochemische Darstellung des BoDV-1-N-Antigens im olfaktorischen Epithel der Ratte nach intranasaler Infektion [nach KUPKE (2016)]

Lokalisation	3 hpi	18 hpi	1 dpi	2 dpi	4 dpi	7 dpi	14 dpi	21 dpi
Adulte olfaktorische Neurone	-	-	-	-	(+)	(+)	++	++
Juvenile olfaktorische Neurone	-	-	-	-	(+)	-	++	++
Stützzellen	-	-	-	-	-	-	+	++
Proliferierende Basalzellen	-	-	-	-	-	(+)	+	++
Horizontale Basalzellen	-	-	-	-	-	-	(+)	+
Nervenfasern	-	-	-	-	-	-	+	++
Olfaktorische Hüllzellen (OEC)	-	-	-	-	-	-	+	++

Modifizierter Infektionsscore nach KUPKE (2016); -: Score 0; +: Score >0 - <1; ++: Score 1-<2; +++: Score 2-3

Tab. 3: Immunhistologische Darstellung des BoDV-1-N-Antigens im zentralen Nervensystem der Ratte nach intranasaler Infektion [nach MORALES *et al.* (1988)]

Lokalisation	6 dpi	8 dpi	10 dpi	13 dpi	15 dpi	18 dpi	20 dpi	22 dpi	27 dpi
Bulbus olfactorius	-	+	+	+	++	++	+	+	+
Nucleus olfactorius	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	++
Entorhinalcortex	-	-	-	+	+	++	+++	+++	+++
Nuclei septales	-	-	+	+	++	++	++	+++	+++
Hypothalamus	-	-	-	+	++	++	++	+++	+++
Thalamus	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++
Cortex cerebri	-	-	-	-	+	+	+	++	++
Hippocampus	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
Nucleus caudatus/Putamen	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Mesencephalon	-	-	-	-	+	n.d.	n.d.	++	++
Medulla oblongata	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	++	++
Cerebellum	-	-	-	-	-	n.d.	n.d.	+	+

Modifizierter Infektionsscore nach MORALES *et al.* (1988); -: kein Nachweis; +: geringer Nachweis; ++: mittlerer Nachweis; +++: hoher Nachweis; n.d.: nicht durchgeführt

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL

Um die potentialen intranasalen Zielzellen und Determinanten für eine erfolgreiche BoDV-1-Infektion zu untersuchen, wurde entsprechend des 3R-Prinzips (RUSSELL, BURCH, 1959) zunächst eine *in-vitro*-Untersuchung durchgeführt. Die ausgewählte Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels stellt vorherigen Untersuchungen zu Folge eine geeignete Kultur dar, welche viele Eigenschaften des natürlichen olfaktorischen Systems innehat (VARGAS, LUCERO, 1999; BRAUCHI *et al.*, 2006; KUPKE, 2016). Gewonnen wurden die Zellen aus adulten, 4 - 6 Wochen alten Lewis-Ratten beider Geschlechter, welche der eigenen Zucht im Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig-Universität Gießen entstammten. Die Tiere wurden nach dem Absetzen am 24. Lebenstag entsprechend der Empfehlungen der GV-SOLAS in Kleingruppen in Makrolon-Typ-4-Käfigen mit erhöhtem Gitterdeckel (beides ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel) bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Als Futtermittel wurde konventionelles Zuchtfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) verwendet. Die Tiere wurden unter den internen Nummern 402_M und 517_M der Justus-Liebig-Universität Gießen zu wissenschaftlichen Zwecken geplant getötet.

3.1.1 Beschichtung der Deckgläschen

Für die Dissoziationskultur wurden runde Deckgläschen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) zunächst bei 180 °C für 5 h im Heißluftsterilisator sterilisiert. Anschließend wurden sie bei weitgehender Abschirmung von UV-Licht mit 10 µg/ml Poly-L-Lysin (Biochrom GmbH, Berlin) beschichtet. Die Beschichtung wurde in Anlehnung an das von AHLEMEYER und BAUMGART-VOGT (2005) etablierte und von KUPKE (2016) abgewandelte Protokoll durchgeführt.

1. Deckgläschen mit feiner, steriler Pinzette in der Sterilwerkbank (Weiss Pharmatechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen) in Zellkulturplatte (Tissue Culture (TC), 24 Well, Standard, F) (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) legen.
2. 150 µl Poly-L-Lysin auf vorbereitetes Deckgläschen pipettieren.
3. Inkubation der geschlossenen TC-Platte bei 4 °C über Nacht.
4. Wells 2 x für 5 min mit sterilem Aqua dest. waschen.
5. Wasser vollständig abnehmen und Deckgläschen trocknen lassen.

Die Deckgläschen wurden bis zur Verwendung in den TC-Platten bei 4 °C und im Dunkeln gelagert und waren bis zu zwei Wochen verwendbar.

3.1.2 Kulturbedingungen

Die präparierten Kulturen wurden bei 37 °C in einem Brutschrank mit 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Als Kulturmedium wurde Neurobasal®A-Medium, welches nach Herstellerangaben mit B-27® Supplement angereichert wurde, verwendet. Zusätzlich wurden nach Herstellerangaben GlutaMAX™ Supplement, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 0,1 % Gentamycin (alles Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) zugesetzt. Das Medium wurde in gebrauchsfertigen Mengen aliquotiert und höchstens 14 Tage lang verwendet. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Insgesamt betrug das Volumen 500 µl pro Vertiefung.

3.1.3 Präparation der Dissoziationskultur

Das von KUPKE (2016) etablierte Protokoll zur Präparation der Dissoziationskultur wurde in zahlreichen Vorversuchen durch verschiedene Abänderungen im Bereich Zell-Sedimentation und Auswahl des Zellkultursystems im Hinblick auf eine höher Zellausbeute und verbesserte Zellmorphologie optimiert, sodass letztlich nach folgendem Protokoll vorgegangen wurde:

1. Pro Ratte 6 ml einer Enzymlösung (1 ml DMEM, high glucose + 1 mg/ml Collagenase, 2,4 U/ml Dispase II und 50 µg/ml DNase II, alle Thermo Fisher Scientific Inc.) frisch herstellen, mit einem Sterilfilter der Porengröße 0,22 µm

- (Rotilabo®-Spritzenfilter, Carl Roth GmbH + Co. KG) in ein steriles 15 ml Reaktionsgefäß mit konischem Boden (Röhre 15 ml, Sarstedt AG & Co.) filtrieren und bis zur Verwendung im Wasserbad bei 37 °C lagern.
2. Ratte mit CO₂ betäuben und dekapitieren, das Fell des Kopfes mit 70%igem Ethanol desinfizieren und den Schädel daraufhin enthäuten.
 3. Nasenhöhle mit Hilfe einer desinfizierten Allzweck-Bügelsäge (LUX Universal Säge Comfort 145 mm, Emil Lux GmbH & Co. KG, Wermelskirchen) leicht paramedian rechts der Sagittalebene eröffnen und mit sterilem Präparierbesteck die Conchen sowie das kaudale Drittel des Nasenseptums herauslösen.
 4. Gewebestücke in vorbereitetes Reaktionsgefäß mit Enzymlösung überführen und in einer Heizkammer mit Rüttler (Innova™ 2000 Platform Shaker, Eppendorf AG, Hamburg) bei 37 °C und 80 rpm 3 x 15 min inkubieren, dabei nach 15 min Reaktionsgefäß jeweils 5 x schwenken.
 5. Inkubation für 1 x 10 min in der Heizkammer auf dem Rüttler.
 6. Erste Zentrifugation (Heraeus™ Labofuge™ 400, Thermo Fisher Scientific Inc.) bei 125x *g* und 24 °C für 3 min, danach Enzymlösung über dem Zellpellet abpipettieren und anschließend mit 5 ml Neurobasal®A-Medium resuspendieren.
 7. 1 x 2 min in der Heizkammer auf dem Rüttler inkubieren.
 8. Zweite Zentrifugation bei 125x *g* und 24 °C für 3 min, danach Medium abpipettieren und Zellpellet mit 2 ml Neurobasal®A-Medium erneut resuspendieren.
 9. Gewebe und Flüssigkeit mit Hilfe einer abgeflammt Glas-Pasteurpipette (Carl Roth GmbH + Co. KG) tritrieren und flüssigen Überstand in neues Reaktionsgefäß mit konischem Boden (Sarstedt AG & Co.) überführen, feste Bestandteile verbleiben im alten Reaktionsgefäß und werden verworfen.
 10. Dritte Zentrifugation bei 125x *g* und 24 °C für 3 min, danach Medium abpipettieren und Zellpellet mit 600 µl frischem Kulturmedium resuspendieren.
 11. Zellen mit Neubauer-Zählkammer (Zählkammer Neubauer Linien dunkel, Carl Roth GmbH + Co. KG) zählen und 750.000 Zellen pro Deckgläschen (etwa 1,8 cm²) aussäen.
 12. Inkubation für 20 min im Wärmeschrank zur Anheftung der Zellen, danach Kulturmedium auf 500 µl auffüllen.

3.1.4 Inhibitor-Anwendung an der Dissoziationskultur nach BoDV-1-Infektion

3.1.4.1 BoDV-1-Infektion der Dissoziationskultur

Zur Infektion der Dissoziationskultur wurde die Viruspräparation BV-E7 NB-4P vom 24.04.2013 (Virustiter: 2×10^6 ID₅₀/ml) verwendet, welche durch Passage (Tierversuch V 54-19 c 20 15 (1) GI 18/4 Nr. 102/2011) der freundlicherweise von Frau Dr. Herzog, Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellten Präparation BV-E7 NB-3P vom 24.03.1988 (Virustiter: 6×10^6 ID₅₀/ml) hergestellt wurde. Alle Viruspräparationen BV-E7-xP stammen dabei ursprünglich von einem Isolat eines natürlich infizierten Pferdes H24 aus Bayern (Cluster Bayern I) ab.

Einen Tag nach der Präparation wurde das Kulturmedium zur Infektion abgenommen und durch 500 µl einer mit Neurobasal®A-Medium verdünnten Virussuspension ersetzt, dabei wurde eine MOI (*multiplicity of infection*) von 1 gewählt. Die Inkubation fand für 1 h bei 37 °C im Wärmeschrank statt. Anschließend wurde die Virussuspension abgenommen und die Zellen mit 500 µl Kulturmedium überschichtet. Bei nicht-infizierten Ansätzen wurden die Zellen statt mit der Virussuspension mit vorgewärmtem Kulturmedium inkubiert.

3.1.4.2 Anwendung des Inhibitors MI-0701 in der Dissoziationskultur

Ausgewählte Kulturen wurden - wie unter 3.1.4.1 beschrieben - mit BoDV-1 infiziert und anschließend mit dem Furininhibitor MI-0701, welcher freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Steinmetzer, Institut für Pharmazeutische Chemie der Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt wurde, behandelt. Dazu wurde die MI-0701-Stocklösung (Lot: KH-01-056) mit Neurobasal®A-Medium zu den Arbeitskonzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM verdünnt und statt des unter 3.1.4.1 beschriebenen Mediums direkt nach erfolgter Infektion der Zellen zur Überschichtung sowie zu jedem Mediumwechsel eingesetzt. Die Inhibitor-Gebrauchslösungen wurden höchstens 14 Tage lang verwendet und vor Gebrauch stets mittels Vortexmischer (Vortex Genie 2 TM, Bender & Hobein AG, Bruchsal) durchmischt, um den gebildeten Bodensatz zu resuspendieren. Zu den Zeitpunkten 4, 7 und 10 dpi wurden die Zellen

mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA, Merck KGaA, Darmstadt) für 20 min fixiert und bis zur weiteren Verwendung mit PBS überschichtet bei 4 °C gelagert. Die Experimente wurden stets in dreifacher, unabhängiger Wiederholung durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurde dabei fortwährend eine Kultur ohne jegliche Behandlung sowie eine mit ausschließlicher BoDV-1-Infektion als Kontrolle mitgeführt.

3.1.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von BoDV-1-N und β -III-Tubulin in der Dissoziationskultur

Zur zeitgleichen Darstellung des BoDV-1-N und der olfaktorischen Neurone in der Dissoziationskultur wurde eine Doppelmarkierung mit den monoklonalen Antikörpern Bo18 (Dr. Herzog, Institut für Virologie, Gießen) und β -III-Tubulin (Covance, Princeton, NJ, USA) nach dem von ZIEGE et al. (2013) etablierten und durch KUPKE (2016) modifizierten Protokoll durchgeführt. Die Primär- und Sekundärantikörper wurden mit TBS, welchem 3 % BSA und 0,25 % Triton® X-100 (Serva Electrophoresis GmbH, Frankfurt) zugesetzt wurde, verdünnt (Tab. 4 und Tab. 5).

1. Waschen des Deckgläschens in der TC-Platte 24 Well, Standard, F (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) 2 x für 5 min mit TBS.
2. Permeabilisierung der Zellmembran und gleichzeitiges Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % Ziegenserum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 3 % BSA und 0,25 % Triton® X-100 gelöst in TBS für 15 min.
3. Abnehmen der Flüssigkeit.
4. Auftragen der Lösung der Primärantikörper (siehe Tab. 4) und Inkubation bei 4 °C über Nacht in einer feuchten Kammer.
5. Waschen des Deckgläschens 3 x für 5 min mit TBS.
6. Auftragen der Lösung der Sekundärantikörper (siehe Tab. 5) und Inkubation für 1 h in einer dunklen, feuchten Kammer.
7. Waschen des Deckgläschens 3 x für 5 min mit TBS.
8. Auftragen des DAPI (Carl Roth GmbH + Co. KG) und Inkubation für 10 min in einer dunklen, feuchten Kammer.
9. Waschen des Deckgläschens 2 x für 5 min mit TBS.
10. Waschen des Deckgläschens 1 x für 5 min mit Aqua dest. zur Entfernung von Salzresten.

11. Aufbringen des Deckgläschens auf einen Objektträger und Eindecken mittels Entellan in Toluol (Merck KGaA).

Tab. 4: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Klonalität	Verwendete Verdünnung	Blocken und Permeabilisierung
Bezugsquelle	Spezifität		
Kaninchen anti-neuronales Klasse III β -Tubulin (TUJ1) Covance, Princeton, USA	Monoklonal Mikrotubulin des Rattengehirns Clone TUJ1 1-15-79	1:1000 in TBS +3 % BSA +5 % Ziegenserum	TBS + 5 % Ziegenserum +3 % BSA + 0,25 % Triton®X-100, 20 min
Maus anti BoDV-1-N (Bo18) Dr. Herzog, Institut für Virologie, Gießen	Monoklonal BoDV-1-N	1:50 in TBS +3 % BSA +5 % Ziegenserum	TBS + 5 % Ziegenserum +3 % BSA + 0,25 % Triton®X-100, 20 min

Tab. 5: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper, DAPI und die Fluoreszenzfilter

Sekundärantikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Absorption
Bezugsquelle	Verdünnung	Emission
Cy2 Ziege anti-Kaninchen	Cyanin 2	FITC (Fluoresceinisothiocyanat)
Dianova GmbH, Hamburg	1:150	465-495
Cy3 Ziege anti-Maus IgG	Cyanin 3	515-555
Dianova GmbH, Hamburg	1:100	540-580
-	DAPI	TxRed (Texas Red)
Carl Roth GmbH + Co. KG	1:500	600-660
		DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)
		340-380
		435-485

3.1.4.4 Auswertung

Die Auswertung fand an einem Multifluoreszenz-Mikroskop (Eclipse 80i, Nikon GmbH, Düsseldorf) mit der Bildverarbeitungssoftware NIS-Elements BR 3.2 (Nikon GmbH) in weitestgehend dunkler Umgebung statt. Zur Bestimmung der Infektionsrate in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels wurden pro Deckgläschen so viele Gesichtsfelder in der 200x-Vergrößerung gezählt, bis 800 Zellen beurteilt werden konnten. Es wurden 4 Deckgläschen pro Untersuchungszeitpunkt und Behandlung ausgezählt, sodass für jede zu untersuchende Gruppe insgesamt 3200 Zellen zur Auswertung vorlagen. Als positives Signal wurde für den Nachweis von BoDV-1-N

mittels Bo18-Antikörper eine deutliche punktförmige, intranukleäre und intrazytoplasmatische, rote Färbung gewertet. Für den Nachweis olfaktorischer Neurone mittels β -III-Tubulin-Antikörper hingegen galt eine diffuse Grünfärbung des Zytoplasmas als positives Signal.

Als Negativkontrolle wurde bei jeder durchgeführten Untersuchung jeweils ein Deckgläschen mit TBS statt des Primärantikörpers bzw. statt des Sekundärantikörpers inkubiert.

3.1.4.4.1 Infektionsrate und Neuronenanteil

Um die Infektionsrate beziehungsweise den Neuronenanteil in der Dissoziationskultur zu bestimmen, wurde die Anzahl der detektierten infizierten Zellen beziehungsweise die der Neurone durch die Gesamtzellzahl dividiert und der Mittelwert aus den Versuchswiederholungen pro definiertem Zeitpunkt gebildet.

3.1.4.5 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenauswertung wurde von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, mit dem Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1 (DIXON, 1993) durchgeführt. Für die zweifaktorielle Varianzanalyse wurde das Modul 7D genutzt, um die Dosis- und Zeitabhängigkeit der Infektionsrate und des Neuronenanteils in der Kultur zu untersuchen. Mit Hilfe des Moduls 6D wurde zusätzlich, getrennt nach Untersuchungszeitpunkten, eine Trendanalyse für die genannten Parameter in der Gruppe der Neurone durchgeführt. Ergebnisse mit einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

3.1.5 Nachweis viraler RNA mittels quantitativer real time RT-PCR

Um die Effizienz der viralen Replikation und Transkription in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels zu untersuchen, wurde nach erfolgter BoDV-1-Infektion

(siehe 3.1.4.1) zu definierten Zeitpunkten RNA isoliert und mittels quantitativer real time RT-PCR (qPCR) virale RNA nachgewiesen. Die Quantifizierung wird indessen mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden, ermittelt. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Da es sich bei dem BoDV-1 um ein RNA-Virus handelt, muss eine vorgeschaltete Umschreibung des Ausgangsmaterials in cDNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase erfolgen. Um einen unabhängigen Vergleich anstellen zu können, ist es nötig, die gemessenen Werte mittels sogenannter *housekeeping gene* zu normalisieren: Im vorliegenden Fall wurde dabei GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet, ein Enzym der Glykolyse, welches stabil in allen Geweben exprimiert wird (POROMBKA *et al.*, 2008b). Durch Division der anhand der Standardverdünnungsreihen bestimmten Kopienzahlen für die genomische (gRNA) und die messenger (mRNA) durch die Kopienzahlen für GAPDH derselben Proben, erhielt man normalisierte Kopienzahlen für jede Probe im Doppelansatz.

3.1.5.1 RNA-Isolation

Vier und sieben Tage nach der BoDV-1-Infektion wurde die RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kit und des RNase-Free DNase Set (beides Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) in Anlehnung an das von Qiagen vorgeschlagene Protokoll (RNeasy Mini Handbook, Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology) wie nachfolgend beschrieben isoliert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur, die Schritte 1-3 zudem in der Sterilwerkbank, durchgeführt. Zur Beseitigung möglicher RNasen wurden vor Beginn Arbeitsoberflächen und -geräte zunächst mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mit RNase away (Carl Roth GmbH + Co. KG) gereinigt.

1. Direktes Ablösen der Zellen im Monolayer in 350 µl RLT-Puffer unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (280 mm, Carl Roth GmbH + Co. KG).
2. Homogenisieren der Lösung durch Vortexen für 20-30 s und anschließendes Triturieren.
3. Lösung durch Zugabe von 350 µl 70%igem Ethanol lysieren.
4. 700 µl des Lysats auf die in einem 2 ml Collection Tube befindliche Spin Column des RNeasy Mini Kits geben.

5. Zentrifugieren (Eppendorf 5415C Microcentrifuge, Eppendorf AG) bei 10.000 rpm für 15 s, den Durchfluss verwerfen.
6. Spin Column in neues 2 ml Collection Tube setzen und 350 µl RW1-Puffer aus dem Kit auf die Säule geben.
7. Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 15 s, den Durchfluss verwerfen.
8. Spin Column in gleiches Collection Tube setzen, 80 µl DNase-I-Mix (zuvor aus 10 µl DNase-I und 70 µl RDD-Puffer des Kits angesetzt) auf die Säule geben und für 15 Min inkubieren.
9. 350 µl RW1-Puffer aus dem Kit auf die Säule geben.
10. Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 15 s, den Durchfluss verwerfen.
11. Spin Column in gleiches Collection Tube setzen und 500 µl RPE-Puffer (zuvor nach Herstellerangaben mit Ethanol versetzt) auf die Säule geben.
12. Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 15 s, den Durchfluss verwerfen.
13. Spin Column in gleiches Collection Tube setzen und 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben.
14. Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 2 min, den Durchfluss verwerfen.
15. Zentrifugieren bei höchster Stufe für 1 min, den Durchfluss sowie das Collection Tube verwerfen.
16. Säule auf neues 1,5 ml Collection Tube setzen, 30 µl RNase-freies Wasser aus dem Kit auf Säule geben.
17. Zentrifugieren bei 10.000 rpm für 1 min, das Spin Column verwerfen.

Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe des Nanodrop 2000 Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific Inc.) bestimmt. Zur Tarierung wurde das RNase-freie Wasser aus dem Kit verwendet und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

3.1.5.2 RT-Reaktion

Die isolierte RNA wurde anschließend mit Hilfe des QuantiTect® Reverse Transkriptase Kits (Qiagen N.V.) in cDNA umgeschrieben. Um später den Gehalt an viraler genomischer und viraler messenger RNA miteinander vergleichen zu können, wurden zwei Reaktionsansätze mit jeweils einem spezifischen Primer (BoDV-1-N sense, BoDV-1-N antisense, Biomers.net GmbH, Ulm) angesetzt (Tab. 6). Die

folgenden Schritte wurden in Anlehnung an das von Qiagen vorgeschlagene Protokoll (QuantiTect® Reverse Transcription Handbook) und auf Eis durchgeführt, um die RNA vor ungewolltem Abbau zu schützen. Außerdem wurde stets eine no-template-control (NTC), bei welcher statt der Probe steriles Wasser eingesetzt wurde, mitgeführt.

1. Auftauen der RNA auf Eis.
2. Verdünnen der RNA mit sterilem Wasser auf einen Gesamtgehalt von 1000 µg im eingesetzten Volumen von 11 µl. (War ein Erreichen von 1000 µg aufgrund der geringen RNA-Konzentration einiger Proben nicht möglich, so wurden die Proben unverdünnt eingesetzt, siehe Tab. 7).
3. Eliminierung der genomischen DNA durch Zugabe von 2 µl Wipeout Buffer, anschließend vortexen.
4. Inkubation der Proben für 2 min bei 42 °C im Thermocycler (Thermocycler 60, Bio-med Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim), danach sofortiges Verbringen auf Eis.
5. Zugabe von je 1 µl eines spezifischen BoDV-1-N-Primers und 1 µl des GAPDH antisense-Primers (Biomers.net GmbH) (siehe Tab. 6) zu den Proben, anschließend vortexen.
6. Inkubation der Proben für 5 min bei 70 °C im Thermocycler (Multicycler® PTC 200, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) danach sofortiges Verbringen auf Eis.
7. Zugabe von 5 µl des Reverse-Transcription Master Mix (siehe Tab. 7), anschließend vortexen und Proben kurz bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren.
8. Inkubation für 15 min bei 42 °C, anschließend für 3 min bei 95 °C.

Die gewonnene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden in der RT-Reaktion sowie in der quantitativen real time PCR

Primer / TaqMan®-Sonde Sequenz (5' - 3')	Konzentration für die PCR (nM)	GenBank ® Accession- Nummer (Länge/Position)
BoDV-1-N sense (p332) CGG GTA TAG GGC ATG AGA AGG ATA	200	AF158629 (96 bp/87-428)
BoDV-1-N antisense (p333) CAA GGC TGG GCG TTA CTG TAT G	300	
BoDV-1-N probe CGC CGT GAC TGG TCT AAC AAT GCC ACT	200	
GAPDH sense (p338) GGT CTA CAT GTT CCA GTA TGA CTC T	100	NM017008 (82 bp/972-1053)
GAPDH antisense (p339) GTT GAT GAC CAG CTT CCC ATT CT	100	
GAPDH probe CGG CAA GTT CAA CGG CAC AGT CAA GGC	100	

BoDV-1-N: BoDV-1-Nukleoprotein; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase;
pXXX: interne Nummer; probe: TaqMan®-Sonde

Tab. 7: Übersicht über die Komponenten der RT-Reaktion

	Komponente	Konzentration der Stammlösung	Volumen / Reaktion
1. Eliminierung der genomischen DNA	gDNA Wipeout Buffer	7x	2 µl
	Probe (RNA)	variabel	11 µl
	RNase-freies Wasser		
2. Anlagerung der Primer	Primer BoDV-1-N (sense, antisense)	15 µM	1 µl
	Primer GAPDH (antisense)	15 µM	1 µl
3. Reverse Transkription / RT- Reaktion	Quantiscript Reverse Transcriptase		1 µl
	Quantiscript RT Buffer	5x	4 µl
	Gesamtvolumen		20 µl

3.1.5.3 Quantitative real time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die Bedingung für die Reaktionen entsprach dem von POROMBKA (POROMBKA, 2006; POROMBKA *et al.*, 2008b) etablierten Protokoll, modifiziert von KEHR (2016) und KUPKE (2016). Tab. 6 zeigt die Reaktionsansätze der PCR. Als Probe diente die in der RT-Reaktion gewonnene cDNA (10 µl), alle Proben wurden im Doppelansatz untersucht. Die verwendete BoDV-1-N-Sonde hat eine 5'-FAM-3'-TAMRA-Markierung (Eurogentec, Seraing, Belgien), während die GAPDH-Sonde eine 5'-HEX-3'-BHQ-1-Markierung (Biomers.net GmbH) aufweist, sodass die Reaktionen als Multiplex-PCR simultan durchgeführt werden konnten. Die Reaktionen wurden allesamt im Thermocycler Rotor-Gene® Q unter Verwendung des Rotor-Gene Probe PCR Kits (beides Qiagen N.V.) durchgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien und das eingesetzte Volumen findet sich in Tab. 8.

1. Inkubation des Reaktionsansatzes für 3 min bei 95 °C (Aktivierung der HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase).
2. Inkubation des Reaktionsansatzes für 3 s bei 95 °C (Denaturierung der DNA).
3. Inkubation des Reaktionsansatzes für 10 s bei 60 °C (kombinierter Anlagerungs- und Verlängerungsschritt).

Die Daten wurde mit Hilfe der Rotor-Gene® Software 2.0.2 (Qiagen N.V.) dargestellt, der Ct-Wert wurde dabei automatisch bestimmt. Neben den Kontrollen aus der RT-Reaktion wurde stets eine separate Negativkontrolle (*no template control*; NTC) im Doppelansatz mitgeführt, welche statt der Probe steriles Wasser enthielt. Als Positivkontrolle und zur gleichzeitigen absoluten Quantifizierung und Normalisierung wurden zusätzlich Standardverdünnungsreihen (SVR) für das für BoDV-1-N-kodierende Gen sowie die mRNA des GAPDH von 10^3 bis 10^7 angefertigt und einmalig vollständig untersucht, bei allen weiteren Läufen wurden als permanente Kontrollen die Verdünnungsreihen mit 10^7 Kopien beider Gensequenzen mitgeführt und basierend darauf die totalen Werte mit Hilfe der verwendeten Software in die Auswertungen transferiert.

Tab. 8: Übersicht über die Reaktionsansätze der quantitativen real time PCR

Komponente	Konzentration	eingesetztes Volumen	
qPCR Mastermix			
2x Rotor-Gene Probe PCR Master Mix*	2x	12,5 µl	
BoDV-1-N sense Primer (p332)	15 µM	0,33 µl	
BoDV-1-N antisense Primer (p333)	15 µM	0,5 µl	
BoDV-1-N probe	50 µM	0,1 µl	
GAPDH sense Primer (p338)	15 µM	0,17 µl	
GAPDH antisense Primer (p339)	15 µM	0,17 µl	
GAPDH probe	50 µM	0,05 µl	
Wasser		1,18 µl	15 µl MM
Proben			
qPCR Mastermix		15 µl	
cDNA/SVR		10 µl	25 µl
NTC			
qPCR Mastermix		15 µl	
Wasser		10 µl	25 µl

*enthält HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase, Rotor-Gene Probe PCR Buffer, dNTP mix und RNase-freies Wasser (Qiagen)

3.1.5.4 Statistische Datenanalyse

Für die Auswertung der Daten wurde das Programm BMDP/Dynamic, Release° 8.1 (DIXON, 1993) verwendet. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Zeit wurde durchgeführt. Bei den Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt.

3.2 ROLF B1.T – KULTUR PERMANENTER ADULTER OLFAKTORISCHER HÜLLZELLEN DER RATTE

Zur Untersuchung der Rolle der olfaktorischen Hüllzellen bei der Infektion mit dem Bornavirus wurde eine Reinkultur olfaktorischer Hüllzellen der Ratte (Rolf B1.T, Merck KGaA) verwendet.

3.2.1 Kultur

Bei der Zelllinie Rolf B1.T (European Collection of Authenticated Cell Cultures/ECACC: 03071601) handelt es sich um eine kommerziell erhältliche Reinkultur olfaktorischer Hüllzellen der Ratte, welche durch eine spontane Immortalisierung entstanden sind und laut Hersteller die Charakteristika der Ursprungszellen weitestgehend behalten haben (SONIGRA *et al.*, 1996). Die Zellen sind für ein adäquates Wachstum auf die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren aus bovinem fetalem Serum angewiesen. Laut Herstellerangaben exprimieren die Zellen das glial fibrillary acidic protein (GFAP), das S100-Protein, den *low affinity neurotrophin receptor* p75, NGF^r, Laminin, Tenascin und das *neural cell adhesion molecule* (N-CAM) (SONIGRA *et al.*, 1996).

3.2.1.1 Beschichtung der Deckgläschen

Gemäß des ursprünglichen Protokolls nach SONIGRA *et al.* (1996) sollen die zu verwendenden Wachstumsmedien wie Zellkulturflaschen oder Deckgläschen zunächst mit Poly-L-Lysin, anschließend mit Laminin jeweils in einer Konzentration von 10 µg/ml beschichtet werden.

Im Folgenden sollte die Notwendigkeit der zusätzlichen Laminin-Beschichtung untersucht werden, sodass ein Teil der Deckgläschen (Ø 12 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen) wie unter 3.1.1 mit 10 µg/ml Poly-L-Lysin (Biochrom GmbH) beschichtet wurde. Ein anderer Teil wurde zusätzlich mit der gleichen Konzentration an Laminin (Merck KGaA) nach folgendem Protokoll beschichtet:

1. Wie in den Schritten 1. bis 4. unter 3.1.1 beschrieben.
2. Laminin (nach Herstellerangaben in Hank's Balanced Salt Solution (Thermo Fisher Scientific Inc.) gelöst) auf Deckgläschen pipettieren.
3. Inkubation der geschlossenen TC-Platte bei 37 °C für 1-2 Stunden.
4. Wells 2 x für 5 min mit sterilem Aqua dest. waschen.
5. Wasser vollständig abnehmen und Deckgläschen trocknen lassen.

Die Deckgläschen wurden bis zur Verwendung in den TC-Platten bei 4 °C und im Dunkeln gelagert und waren bis zu 2 Wochen verwendbar.

3.2.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden bei 37 °C in einem Brutschrank mit 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM - high glucose, mit 4500 mg/L Glucose, Natriumpyruvat, Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin, Merck KGaA) verwendet, welches nach Angaben von SONIGRA et al. (1996) mit 2mM L-Glutamin (Merck KGaA), 10 % bovinem fetalem Serum und 1 % Penicillin/Streptomycin (beides Thermo Fisher Scientific Inc.) versetzt wurde. Das Medium wurde in gebrauchsfertigen Mengen aliquotiert und höchstens 14 Tage lang verwendet. Das Kulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm², Filterkappe, Sarstedt AG & Co.) insgesamt 4-mal passagiert, bis sie in der 5. Passage auf die beschichteten Deckgläschen (3.2.1.1) ausgesät wurden. Insgesamt betrug das Volumen 5 ml pro Flasche und 500 µl pro Vertiefung in der TC-Platte.

3.2.1.3 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von p75

Um zunächst sicherzustellen, dass es sich bei den Zellen um eine Reinkultur olfaktorischer Hüllzellen handelt, wurden 500.000 Zellen auf Deckgläschen ausgesät und nach drei Tagen - wie unter 3.1.4.2 beschrieben - fixiert. Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen anti-human-p75 Antikörper (freundlicherweise von Prof. Dr. Baumgärtner, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt) nach dem von ZIEGE et al. (2013) etablierten und durch KUPKE (2016) modifizierten Protokoll, wie unter 3.1.4.3 beschrieben, durchgeführt. Der Primär- und Sekundärantikörper wurde mit TBS, welchem 3 % BSA und 0,25 % Triton® X-100 (Serva Electrophoresis GmbH) zugesetzt wurde, verdünnt (siehe Tab. 9 und Tab. 10). Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche statt mit dem Primärantikörper mit TBS inkubiert wurden.

Tab. 9: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Klonalität	verwendete Verdünnung	Blocken und Permeabilisierung
Bezugsquelle	Spezifität		
Maus anti humanes p75 Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland	Monoklonal Hybridom Zelllinie	1:5 in TBS +3 % BSA +5 % Ziegenserum	TBS + 5 % Ziegenserum +3 % BSA + 0,25 % Triton®X-100, 20 min

Tab. 10: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper, DAPI und die Fluoreszenzfilter

Sekundärantikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Absorption
Bezugsquelle	Verdünnung	Filterbezeichnung
Cy3 Ziege anti-Maus IgG	Cyanin 3	540-580
Dianova GmbH, Hamburg	1:100	TxRed (Texas Red) 600-660
-	DAPI	340-380
Carl Roth GmbH + Co. KG	1:500	DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) 435-485

3.2.1.4 Auswertung

Die Auswertung fand - wie unter 3.1.4.4 beschrieben - an einem Multifluoreszenz-Mikroskop mit der Bildverarbeitungssoftware NIS-Elements BR 3.2 (beides Nikon GmbH) in weitestgehend dunkler Umgebung statt. Als positives Signal wurde eine diffuse intrazytoplasmatische, rote Färbung gewertet, welche nicht in der Negativkontrolle der Immunfluoreszenz zu finden war.

3.2.2 Inhibitor-Anwendung nach BoDV-1-Infektion

Vorangehende Untersuchungen (siehe 2.1.1.1) zeigten, dass die olfaktorischen Hüllzellen eine zentrale Rolle bei der Infektion mit dem Borna disease virus 1 zu spielen scheinen. So sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Behandlung BoDV-1-infizierter Kulturen mit dem Furininhibitor MI-0701 zu einer signifikanten Reduktion der Infektionsrate führen kann.

3.2.2.1 BoDV-1-Infektion

Für die Infektion wurden jeweils 125.000 Zellen auf mit Poly-L-Lysin (Biochrom GmbH) beschichtete Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden anschließend einen Tag nach der Aussaat wie unter 3.1.4.1 beschrieben mit dem BoDV-1 infiziert.

3.2.2.2 Anwendung des Inhibitors

Wie unter 3.1.4.2 beschrieben wurden ausgewählte Kulturen nach der Infektion einmalig direkt nach der Infektion mit dem Furininhibitor MI-0701 der Arbeitskonzentration 10 μ M behandelt. Als Kontrollen wurden hier stets eine gänzlich unbehandelte Kultur, eine mit dem BoDV-1 infizierte Kultur und eine ausschließlich mit dem Inhibitor behandelte Kultur mitgeführt. Zu den Zeitpunkten 4, 5 und 6 dpi wurden die Zellen mit 4%igem PFA für 20 min fixiert und bis zur weiteren Verwendung mit PBS überschichtet bei 4 °C gelagert. Das Experiment wurde in dreifacher, unabhängiger Wiederholung durchgeführt.

3.2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz zum Nachweis von BoDV-1-N

Zur Darstellung des BoDV-1-N wurde eine Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Bo18-Antikörper in Anlehnung an das unter 3.1.4.3 beschriebene Protokoll durchgeführt.

3.2.2.4 Auswertung

Die Auswertung fand wie unter 3.1.4.4 beschrieben an einem Multifluoreszenz-Mikroskop mit der Bildverarbeitungssoftware NIS-Elements BR 3.2 (beides Nikon GmbH) in weitestgehend dunkler Umgebung statt. Zur Bestimmung der jeweiligen Infektionsrate in der Zellkultur der olfaktorischen Hüllzellen wurden pro Deckgläschen in der 200x-Vergrößerung 1000 Zellen beurteilt. Als positives Signal wurde für den

Nachweis von BoDV-1-N eine deutliche punktförmige, intranukleäre und intrazytoplasmatische, rote Färbung gewertet.

3.2.2.5 Statistische Datenanalyse

Unter Verwendung des Programms BMDP wurden die Daten ausgewertet. Dazu wurde nach einer Log-Transformation der Werte eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Behandlung und Zeit durchgeführt. Bei den Auswertungen wurde wie zuvor ein Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt.

3.2.3 Nachweis viraler RNA mittels quantitativer real time RT-PCR

Um die beschriebene besondere Rolle der olfaktorischen Hüllzellen bei der initialen viralen Infektion in Bezug auf die Effizienz der viralen Replikation und Transkription zu untersuchen, wurde nach erfolgter BoDV-1-Infektion (3.2.2.1) zu definierten Zeitpunkten (4, 5, und 6 dpi) RNA isoliert und wie unter 3.1.5 beschrieben untersucht. Aufgrund der Normalisierung auf das *housekeeping gene* GAPDH sollen die Ergebnisse vergleichbar mit denen des olfaktorischen Epithels sein.

3.3 EXPERIMENTELLE INTRANASALE INHIBITOR-ANWENDUNG BEI BoDV-1-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN

Allen durchgeführten Experimenten an den Versuchstieren lagen die Bestimmungen des vom Regierungspräsidium Gießen genehmigten Tierversuchs V 54-19 c 20 15 (1) GI 18/4 Nr. 102/2011 zugrunde.

3.3.1 Intranasale BoDV-1-Infektion und Inhibitor-Anwendung bei adulten Ratten

Um die trendgebenden Ergebnisse der *in-vitro*-Untersuchungen auch *in-vivo* zu bestätigen und um den Einfluss des Inhibitors auf die Infektionsrate und -ausbreitung

auch im natürlichen Gefüge des olfaktorischen Systems mit dem zentralen Nervensystem zu untersuchen, wurden *in-vivo*-Untersuchungen durchgeführt.

3.3.1.1 Versuchstiere und Versuchsbedingungen

Als Versuchstiere wurden 28 Tage alte Lewis-Ratten verwendet, welche aus der Zucht des Unternehmens JANVIER LABS® (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) stammen. Die Tiere wurden in der Versuchstierhaltung des BSL-3-Labors der Philipps-Universität Marburg entsprechend der Empfehlungen der GV-SOLAS nach Geschlechtern getrennt in Kleingruppen von fünf Tieren in einem Makrolon-Typ-3-IVC (*individually ventilated cages*) mit Edelstahldeckel und Filterhaube (alles ZOONLAB GmbH) bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Raumtemperatur betrug ca. 24 °C und die Luftfeuchtigkeit lag bei ca. 55 %. Ein konventionelles Zuchtfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG) wurde als Alleinfuttermittel verwendet.

Dem genehmigten Versuchsvorhaben V 54-19 c 20 15 (1) Gl 18/4 Nr. 102/2011 entsprechend wurden die Tiere täglich adspeziert und jeden dritten bis vierten Tag eingehend klinisch untersucht. Mittels festgelegter Bewertungskriterien wurde der Allgemeinzustand und das Spontanverhalten der Tiere beurteilt sowie deren Körpergewicht ermittelt und auf einem *Score Sheet* festgehalten (siehe Anhang Tab. 16, Tab. 17 und Tab. 18).

3.3.1.2 BoDV-1-Infektion und Inhibitor-Anwendung

Die Tiere wurden mit der unter 3.1.4.1 beschriebenen Virussuspension bei simultaner Inhibitor-Applikation intranasal infiziert. Dazu wurden sie unter Zuhilfenahme einer Atemmaske für Ratten (UNO BV, Zevenaar, Niederlande) mittels Isofluran in Allgemeinanästhesie verbracht (Einleitung 5 %, Erhaltung 2,5 %) und pro Nasenloch wurden 100 µl des Gemischs aus Virussuspension (1:10) und Furininhibitor MI-0701 (300 µM) verdünnt in DMEM, low glucose (Thermo Fisher Scientific Inc.) mittels Feindosierspritze (Omnifix ®-F, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und stumpfer Kanüle (Sterican ® Mix, 21G, B. Braun Melsungen AG) appliziert. Dazu wurden im gleichen Maße Tropfen des Gemischs auf beide Nasenlöcher des narkotisierten Tieres

gegeben, welche eigenständig von diesem eingesogen wurden. Nach drei Tagen wurde die Applikation des Inhibitors (300 µM) in Allgemeinanästhesie wie beschrieben wiederholt. Das Organmaterial von Lewis-Ratten, welche im Rahmen des genannten Tierversuchsantrages unter den gleichen Bedingungen intranasal mit dem BoDV-1 infiziert wurden, stand aus einer anderen Untersuchung als Vergleichsmaterial zur Verfügung (KUPKE, 2016).

Eine Übersicht über die verwendeten Versuchstiere und die durchgeführte Behandlung findet sich in Tab. 11.

Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Versuchstiere und die Behandlung

Zeitpunkt der Euthanasie Behandlung	14 dpi	21 dpi
BoDV-1	5	2
BoDV-1 + MI-0701	5	5
Mock + MI-0701	4	5

dpi: days post infection

3.3.1.3 Mock-Infektion und Inhibitor-Anwendung

Die Mock-Infektion erfolgte analog zu der unter 3.3.1.2 beschriebenen Infektion. Anstelle der Virussuspension wurde hier Gehirnhomogenat von nicht-infizierten Ratten mit dem Inhibitor (300 µM) gemischt intranasal appliziert.

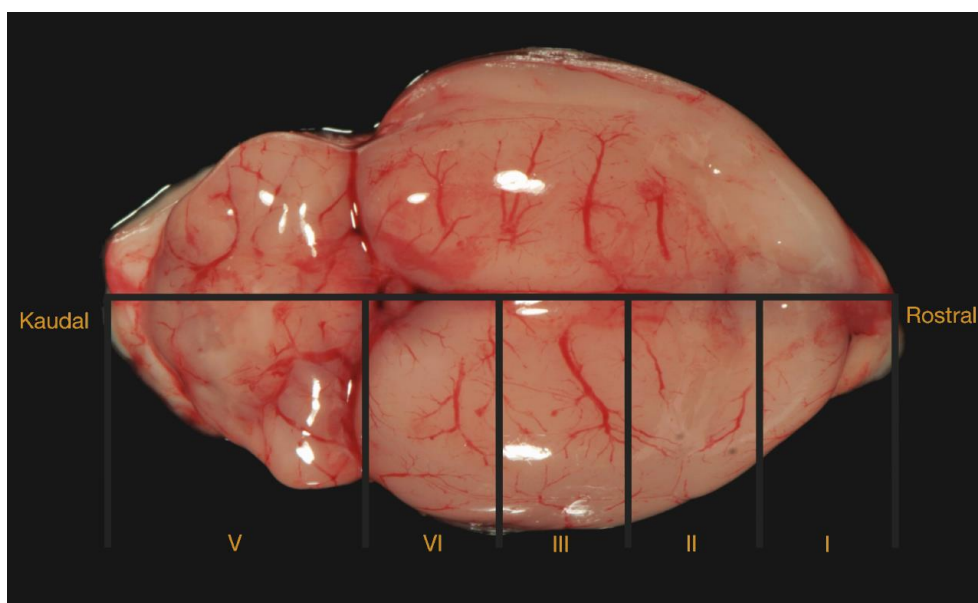
3.3.1.4 Sektion

Alle Versuchstiere wurden zu den angegebenen Untersuchungszeitpunkten mit Isofluran bis zum vollständigen Erliegen der Reflexe betäubt und durch anschließende Dekapitation, entsprechend der Auflagen des Tierversuchsantrages, getötet. Die Sektion wurde umgehend nach der Euthanasie durchgeführt.

3.3.1.5 Probengewinnung und -aufarbeitung

Nach einer äußerlichen Desinfektion des Kopfes und des Halses mit 70%igem Ethanol wurde der Kopf enthäutet, das Gehirn steril entnommen und sagittal geteilt. Während die linke Hemisphäre in 10%igem, Formalin bei Raumtemperatur fixiert wurde, wurde die rechte Hemisphäre - Abb. 11 - folgend zerteilt und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Analog zu 3.1.3 wurde die Nasenhöhle mit Hilfe einer desinfizierten Allzweck-Bügelsäge (Emil Lux GmbH & Co. KG) eröffnet. Die linke Hälfte der Nase wurde in 10%igem, Formalin fixiert, während die rechte Hälfte, getrennt in kranialen und kaudalen Bereich der Nasenmuscheln, bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt wurde. Ein Überblick über die gewonnenen Proben findet sich in Tab. 12.

Abb. 11: Schematische Darstellung der Proben des Gehirns (Lagerung bei -80 °C)

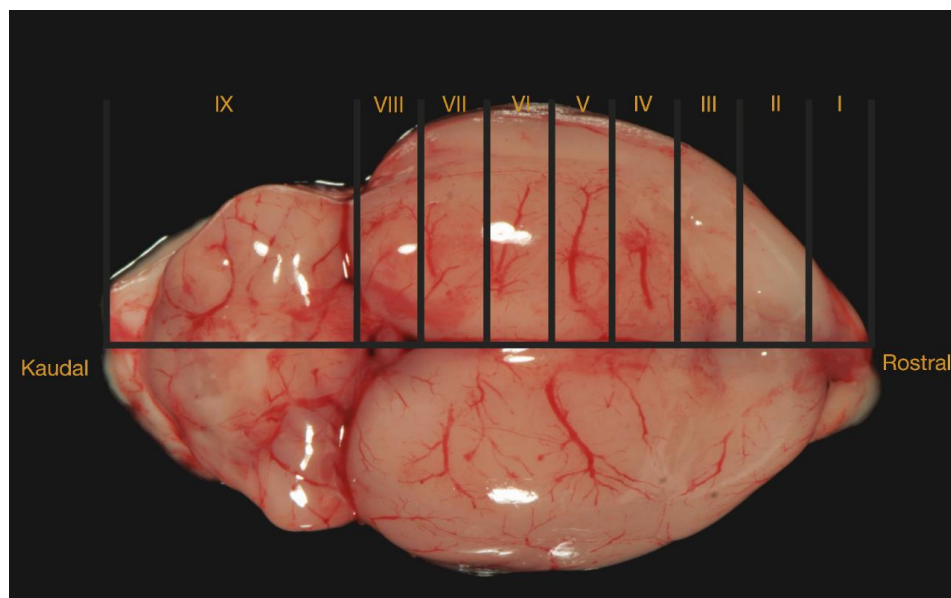


Aufsicht auf das Gehirn: Lokalisationen I bis V der Probennahme im Gehirn (G) der Versuchstiere für die weitere Verarbeitung

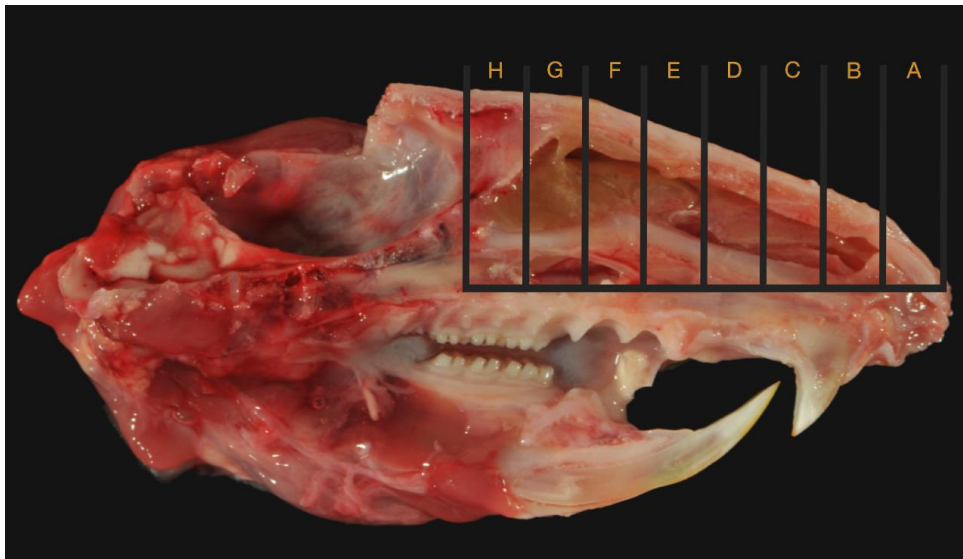
Tab. 12: Überblick über das gewonnene Probenmaterial

Probenmaterial	Nase		Gehirn	
	linke Hälfte	rechte Hälfte (kranialer und kaudaler Anteil)	linke Hälfte	rechte Hälfte (Lokalisationen I-V)
Aufbewahrung	10%iges Formalin	-80 °C	10%iges Formalin	-80 °C

Die linke Hemisphäre sowie die linke Nasenhälfte wurden nach sieben bis acht Tagen Fixation in Formalin nach einem festgelegten Schema (Abb. 12 und Abb. 13) zugeschnitten und in Gewebekassetten (Slimsette™, Simport, Canada, USA) - in stets gleicher Reihenfolge und Orientierung - eingelegt. Die Proben der Nase wurden anschließend für sieben bis zehn Tage mittels EDTA (siehe 8.1.1) bei 37 °C entkalkt und vor der Einbettung über Nacht in Leitungswasser gewässert, um gelöste Kalziumsalze auszuwaschen. Die EDTA-Lösung wurde dazu alle drei Tage ausgetauscht. Eine routinemäßige Einbettung in Paraffin wurde mit dem Gewebeeinbettautomat Tissue-Tek® VIP™ und der Paraffinausgießstation Tissue-Tek® TEC™ 5 (beides Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen) durchgeführt.

Abb. 12: Schematische Darstellung der Proben des Gehirns (Formalinfixierung)

Aufsicht auf das Gehirn: Lokalisationen I bis IX der Probennahme im Gehirn (G) der Versuchstiere für die weitere Verarbeitung

Abb. 13: Schematische Darstellung der Proben der Nase (Formalinfixierung)

Sagittalansicht des Schädels: Lokalisationen A bis H der Probennahme in der Nase (N) der Versuchstiere für die weitere Verarbeitung

3.3.2 Pathohistologische Untersuchung der Versuchstiere

Von den Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Proben (FFPE-Material) der Gehirne und Nasen wurden mit Hilfe des Mikrotoms (Leica Biosystems GmbH, Nussloch) 3 - 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf SuperFrost®Plus Objektträger (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik) aufgezogen und für 35 - 50 min bei 56 °C im Wärmeschrank getrocknet.

3.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Nase und Gehirn der Versuchstiere

Mit Hilfe eines Färbeautomaten (Microm, HMS 740, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurden von allen Gewebeproben der Nase und des Gehirns Hämatoxylin-Eosin-Färbungen nach einem Standardprotokoll angefertigt, wobei nach der Rehydrierung in der absteigenden Ethanolreihe eine 4-minütige Inkubation in Kardasewitsch eingefügt wurde (AESCHT *et al.*, 2010).

3.3.2.2 Auswertung der histologischen Veränderungen

Bei der histologischen Untersuchung (Stereomikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) der Nasen und Gehirne wurde insbesondere auf das Vorkommen von entzündlichen und degenerativen Veränderungen geachtet, die Beurteilung der pathohistologischen Befunde erfolgte qualitativ.

3.3.3 Immunhistologische Untersuchung der Gewebe

3.3.3.1 Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N in Nase und Gehirn der Versuchstiere

Das Gewebe der Versuchstiere wurde mittels ABC-Methode (HSU *et al.*, 1981; HERDEN *et al.*, 2000) immunhistologisch auf das Vorhandensein und die Verteilung des BoDV-1-Nukleoproteins untersucht. Der dazu verwendete monoklonale Antikörper Bo18 wurde freundlicherweise von Frau Dr. Herzog, Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle wurde anstelle des spezifischen Primärantikörpers T1 in gleicher Konzentration eingesetzt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde unverdünntes Pferdeserum (PAA Laboratories GmbH) verwendet, als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Antikörper aus dem Pferd, der gegen das IgG der Maus gerichtet ist (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Zusätzlich wurde bei jeder Untersuchung als Positivkontrolle ein Gehirnschnitt eines natürlich mit dem BoDV-1 infizierten Schafes mitgeführt. Insofern es nicht anders angegeben ist, wurden die Schritte des folgenden Protokolls bei Raumtemperatur und in Glasküvetten mit entsprechenden Glaseinsätzen durchgeführt:

1. Entparaffinierung der Gewebeschnitte 3 x 3 min in Xylol.
2. Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 2 x 3 min in Isopropanol, anschließend 1 x 3 min in 96%igem Ethanol und 1 x 3 min in 80%igem Ethanol.

3. Hemmung der endogenen Peroxidase durch Inkubation in Methanol mit 0,5 % frisch zugesetztem Wasserstoffperoxid (30 %, stabilisiert) für 30 min.
4. Waschen der Schnitte 1 x 5 min in TBS.
5. Einsetzen der Schnitte in Cassette Racks, dazu die Objektträger auf die mit TBS angefeuchteten Shandon Coverplates™ (beides Thermo Fisher Scientific Inc.) legen.
6. Blocken unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit unverdünntem Pferdeserum für 30 min.
7. Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper Bo18, verdünnt 1:50 in TBS mit 1 % BSA, über Nacht bei 4 °C.
8. Waschen der Schnitte 3 x 5 min mit TBS.
9. Inkubation der Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Pferd anti-Maus IgG für 30 min (9 µl in 1000 µl TBS + 1 % BSA).
10. Waschen der Schnitte 3 x 5 min mit TBS.
11. Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex (ABC) (Vector Laboratories, Inc.) für 30 min (9 µl Avidin + 9 µl Biotin in 1000 µl TBS, 30 min vor Gebrauch ansetzen).
12. Waschen der Schnitte 3 x 5 min mit TBS.
13. Umsetzen der Schnitte in mit TBS gefüllte Glasküvetten.
14. Farbreaktion durch Inkubation mit 0,005%iger 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB) mit Imidazol-Puffer und 0,01 % Wasserstoffperoxid für 10 min im Dunkeln und bei permanentem Rühren mittels Magnetrührer.
15. Waschen der Schnitte 3 x 5 min in TBS.
16. Waschen der Schnitte 1 x 5 min in Aqua dest.
17. Entfernen des Formalinpigments durch Inkubation in Kardasewitsch-Reagenz für 5 min.
18. Waschen der Schnitte 2 x 2,5 min in Aqua dest.
19. Gegenfärben der Schnitte in Papanicolaous Hämatoxylin für 15 - 20 s.
20. Bläuen der Schnitte für 2 x 2,5 min in Leitungswasser (28-30 °C).
21. Waschen der Schnitte 1 x 5 min in Aqua dest.
22. Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 3 min (1 x 50%iges Ethanol, 1 x 70%iges Ethanol, 1 x 80%iges Ethanol, 1 x 96%iges Ethanol, 2 x Isopropanol).
23. Fixierung durch Inkubation der Schnitte 3 x 3 min in Xylol.

24. Eindecken der Schnitte mit Hilfe des Eindeckautomaten (Tissue-Tek® Coverslipper, Sakura Finetek Germany GmbH) mit Xylol und Eindeckfilm (Tissue-Tek® SCA™, Sakura Finetek Germany GmbH).

3.3.3.2 Auswertung des immunhistologischen Nachweises von BoDV-1-N

Für die Auswertung wurden die Schnitte des Gehirns und der Nase unter Verwendung des NanoZoomer S210 Digital slide scanner (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) zunächst digitalisiert und anschließend mit Hilfe der Software Aperio ImageScope (Leica Biosystems GmbH) validiert. Die spezifische Markierung des BoDV-1-N war durch einen braunen, feingranulären bis diffusen Farbniederschlag gekennzeichnet, der sich histologisch in der gleichen Ebene wie das zu untersuchende Gewebe befand und weder in der Negativkontrolle der Immunhistochemie noch in den Mock-behandelten Tieren vorhanden war.

3.3.3.2.1 Auswertung des immunhistologischen Nachweises von BoDV-1-N in den Nasen

Die Auswertung des Nachweises von BoDV-1-N in den Nasen erfolgte quantitativ. Pro Schnitt, auf dem histologisch das olfaktorische Epithel eindeutig anzusprechen war, wurden dazu wie bei KUPKE (2016) beschrieben bei 20-facher Vergrößerung 20 Strecken dieses Epithels von je 250 µm Länge ausgewählt. Als Zellen des olfaktorischen Epithels wurden Stützzellen, olfaktorische Neurone und Basalzellen sowie olfaktorische Hüllzellen und Nervenfasern in der Lamina propria beurteilt. Die gewonnenen Daten wurden unter Berücksichtigung des jeweiligen Zelltypen sowie der Lokalisation (Abb. 13) in der Nase wie unten beschrieben quantitativ ausgewertet und gingen in die statistische Datenanalyse ein (3.3.3.3).

3.3.3.2.2 Auswertung des immunhistologischen Nachweises von BoDV-1-N in den Gehirnen

Folgende Gehirngebiete und -strukturen wurden in die Untersuchungen einbezogen, sofern sie anhand der Gewebeschnitte eindeutig ansprechbar waren:

- | | |
|---|------------------------|
| 1. Bulbus olfactorius | 7. Cortex entorhinalis |
| 2. Riechbahn (bestehend aus Pedunculus olfactorius, Gyri olfactorii und Tuberculum olfactorium) | 8. Hippocampus |
| 3. Nucleus olfactorius | 9. Thalamus |
| 4. Nucleus caudatus/Putamen | 10. Subthalamus |
| 5. Cortex cerebri | 11. Hypothalamus |
| 6. Nuclei septales | 12. Mesencephalon |
| | 13. Cerebellum |
| | 14. Medulla oblongata |

Für die Auswertung wurden die genannten Gebiete und Strukturen zunächst in der Übersicht mit Hilfe des Rectangle Tools in 1 cm² große Teilstücke kartiert, wobei ein solches Quadrat stets mindestens 90 % Gehirngewebe enthielt. Anschließend wurden die so gewonnenen Teilstücke bei 10-facher Vergrößerung anhand des nachfolgenden Score-Systems semiquantitativ bewertet:

- | | |
|---|---|
| 0 | keine markierten Zellen im Teilstück |
| 1 | bis zu 25 markierte Zellen im Teilstück |
| 2 | zwischen 26 und 50 markierte Zellen im Teilstück |
| 3 | zwischen 51 und 75 markierte Zellen im Teilstück |
| 4 | zwischen 76 und 100 markierte Zellen im Teilstück |
| 5 | mehr als 100 markierte Zellen im Teilstück |

3.3.3.3 Statistische Datenanalyse des immunhistologischen Nachweises von BoDV-1-N in der Nase und im Gehirn

Die statistische Auswertung für die Nase wurde mit dem Programm R (Version 3.2.3) durchgeführt. Mit dem Augenmerk auf die Gesamtzellzahl sowie speziell den Zelltyp wurde ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit negativer Binominalverteilung mit den fixen Faktoren Zeit, Behandlung und Lokalisation sowie Zeit, Behandlung, Lokalisation und Zelltyp sowie jeweils mit dem randomisierten Faktor des Individuums durchgeführt, wobei der statistische Wald-Test für die nominalen Einflussfaktoren Verwendung fand. Zusätzlich wurden die Faktoren mittels exaktem Test nach Fisher auf Unabhängigkeit untersucht. Bei den Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt.

Für die statistische Auswertung der Untersuchung am Gehirn wurde das Programm BMDP/Dynamic, Release 8.1 (DIXON, 1993) verwendet. Eine dreifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der anatomischen Lokalisation wurde durchgeführt, wobei ebenfalls der Wald-Test für die nominalen Einflussfaktoren eingesetzt wurde. Ergebnisse mit einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

3.3.4 Nachweis viraler und genomischer RNA mittels quantitativer real time RT-PCR in der Nase und im Gehirn

Zur Quantifizierung eines potentiellen Effekts der Inhibitor-Anwendung wurde eine real time RT-PCR zum Nachweis von viraler und genomischer RNA durchgeführt. Die Quantifizierung wurde wie unter 3.1.5 ermittelt.

3.3.4.1 RNA-Isolation

Die unter 3.3.1.5 beschriebenen Proben (rechte Nasenhälfte und rechte Gehirnhälfte) wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen in Anlehnung an das von Qiagen vorgeschlagene Protokoll (RNeasy Mini Handbook, Purification of Total RNA

from Animal Tissue) aufgearbeitet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Zerkleinern und Homogenisieren des Gewebes in 600 µl RLT-Puffer und 6 µl β -Mercaptoethanol (Merck KGaA) unter Verwendung von Keramik- und Glasbeads (BigPrep™ MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) im Homogenisator (FastPrep® MP Biomedicals Germany GmbH) für 5 x 45 s.
2. Zentrifugieren des Homogenats für 3 min bei höchster Geschwindigkeit.
3. Überstand durch Zugabe von 600 µl 70%igem Ethanol lysieren.
4. 700 µl des Lysats auf die in einem 2 ml Collection Tube befindliche Spin Column des RNeasy Mini Kits (Qiagen N.V.) geben.
5. Weiter wie unter 3.1.5.1 beschrieben, dabei Schritt 15 auslassen

Die RNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe des Nanodrop 2000 Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific Inc.) bestimmt. Zur Tarierung wurde das RNase-freie Wasser aus dem Kit verwendet und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert.

3.3.4.2 RT-Reaktion

Die RT-Reaktion wurde wie unter 3.1.5.2 beschrieben durchgeführt.

3.3.4.3 Quantitative real time Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Die quantitative real time PCR wurde wie unter 3.1.5.3 beschrieben durchgeführt.

3.3.4.4 Statistische Datenanalyse des Nachweises viraler und genomischer RNA

Für die Auswertung der Daten wurde das Programm BMDP/Dynamic, Release°8.1 (DIXON, 1993) verwendet. Eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Zeit wurde durchgeführt. Zudem wurde ein T-Test für verbundene

Stichproben angewendet. Bei den Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt.

3.4 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG AUF ZELLTOD BEI EXPERIMENTELL INTRANASAL BoDV-1- UND MOCK-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN

Um den Einfluss der BoDV-1-Infektion auf einen möglichen Zelltod im olfaktorischen Epithel experimentell intranasal-infizierter Lewis-Ratten zu charakterisieren, wurde das olfaktorische Gewebe immunhistochemisch untersucht. Zur Untersuchung der **Apoptose** wurde die Caspase 3 (**cysteinyI-aspartate specific protease**) gewählt. Sie ist Bestandteil einer Enzymkaskade zur Einleitung des intrinsischen Wegs der Apoptose. Das hier untersuchte Enzym Caspase 3 gehört zu den Effektor-Caspasen und markiert den „*point of no return*“. Um auch den Caspase-unabhängigen Weg des Zelltods, den sogenannten **Parthanatos**, zu erforschen, wurde das Epithel zudem auf das Vorkommen von AIF (apoptosis-inducing-factor) untersucht.

3.4.1 Probenmaterial

Dazu standen mit Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete definierte Nasenabschnitte (wie in Abb. 13 schematisch dargestellt) von jeweils fünf BoDV-1-infizierten und zwei Mock-behandelten Tiere zu den Untersuchungszeitpunkten 3 hpi, 1 dpi, 2 dpi, 4 dpi, 7 dpi, 14 und 21 dpi aus einem zuvor durchgeführten Versuchsvorhaben (KUPKE, 2016) zur Verfügung.

3.4.2 Immunhistologischer Nachweis von aktivierter Caspase 3

Das Gewebe der Versuchstiere wurde mittels ABC-Methode immunhistologisch auf die Expression der Caspase 3 untersucht.

1. Wie in den Schritten 1. bis 3. unter 3.3.3.1 beschrieben.
2. Inkubieren der Schnitte bei 99 °C in 10mM Zitratpuffer (pH 6) für 20 min.

3. Abkühlen der Schnitte für 15 min in der Lösung.
4. Waschen der Schnitte 1x 5 min in TBS.
5. Einsetzen der Schnitte in Cassette Racks, dazu die Objektträger auf die mit TBS angefeuchteten Shandon Coverplates™ (beides Thermo Fisher Scientific Inc.) legen.
6. Blocken unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit 5%igem Ziegenserum (PAA Laboratories GmbH) in TBS für 10 min.
7. Inkubation der Schnitte mit dem polyklonalen Anti-Caspase 3-Primärantikörper (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA), verdünnt 1:500 in TBS mit 1 % BSA, über Nacht bei 4 °C.
8. Waschen der Schnitte 3 x 5 min mit TBS.
9. Inkubation der Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Ziege anti-Kaninchen IgG (Vector Laboratories, Inc.) für 30 min (9 µl in 1000 µl TBS + 1 % BSA).
10. Weiter wie in den Schritten 12. bis 24. unter 3.3.3.1 beschrieben.

3.4.3 Immunhistologischer Nachweis von AIF

Hier wurde das Gewebe der Tiere, welche zwei, vier und sieben Tagen nach der Infektion euthanasiert wurden mittels ABC-Methode immunhistologisch untersucht.

1. Wie in den Schritten 1. bis 5. unter 3.3.3.1 beschrieben.
2. Blocken unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation mit unverdünntem Pferdeserum (PAA Laboratories GmbH) für 10 min.
3. Inkubation der Schnitte mit dem Anti-AIF-Primärantikörper (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), verdünnt 1:100 in TBS mit 1 % BSA, über Nacht bei 4 °C.
4. Waschen der Schnitte 3 x 5 min in TBS.
5. Inkubation der Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Pferd anti-Ziege IgG (Vector Laboratories, Inc.) für 30 min (9 µl in 1000 µl TBS + 1 % BSA).
6. Weiter wie in den Schritten 12. bis 24. unter 3.3.3.1 beschrieben.

3.4.4 Auswertung der Daten aus der immunhistologischen Untersuchung

Die immunhistologische Auswertung erfolgte quantitativ und wurde mit Hilfe des Programms NIS Elements BR 3.2 und dem Eclipse 80i (beides Nikon GmbH) durchgeführt. Pro Tier wurden 20 Strecken des olfaktorischen Epithels mit jeweils 250 µm abgemessen und die Gesamtheit der immunhistochemisch markierten Zellen gezählt. Als positives Signal wurde für die Caspase 3 ein braunes, meist feingranuläres Präzipitat im Zellkern und im Zytoplasma der Zellen gewertet, welches in einer Ebene mit dem Gewebeschnitt lag und nicht in der Negativkontrolle der Immunhistochemie zu detektieren war. Für das AIF wurde ein entsprechender Farbniederschlag im Zellkern als positives Signal gewertet. Die Daten gingen in die statistische Datenanalyse ein.

3.4.5 Statistische Analyse der Daten aus der immunhistologischen Untersuchung

Die Daten wurden unter Zuhilfenahme des Programms BMDP ausgewertet. Dazu wurde mit dem Modul 7D eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit den Faktoren Infektion und Zeit durchgeführt. Ergebnisse mit einer Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

4 ERGEBNISSE

Die Primärdaten der Untersuchungen dieser Arbeit sind unter 8.3 (Anhang) zu finden.

4.1 DISSOZIATIONSKULTUR DES OLFAKTORISCHEN EPITHEL

Die durchgeführten Modifikationen am Protokoll zur Gewinnung der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels führten zu einer, im Nativzustand der Kulturen wahrnehmbar, deutlichen Zunahme der Zelldichte (Zellen pro mm² in Kultur, nativ) im Vergleich zur einfachen Sedimentation wie bei KUPKE (2016) durchgeführt.

4.1.1 Inhibitor-Anwendung nach BoDV-1-Infektion

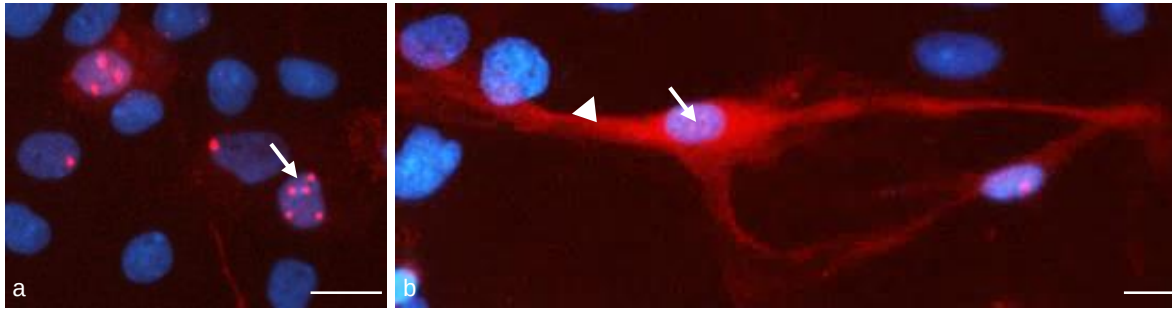
Sowohl nach der BoDV-1-Infektion als auch nach der Anwendung des Inhibitors MI-0701 sowie in Kombination beider Behandlungen konnte anhand der nativen Kultur bei den untersuchten Konzentrationen nach vier, sieben und zehn dpi keine signifikante Änderung der Zellmorphologie oder der Zelldichte festgestellt werden.

4.1.1.1 Nachweis von BoDV-1-N nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701

Um zu untersuchen, ob eine Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 zu einer Reduktion der Infektionsrate führte, wurden die infizierten und behandelten vier, sieben und zehn Tage nach der Infektion fixiert. Die nicht-infizierten Kontrollen wurden zu den gleichen Zeitpunkten fixiert. Durch die Detektion des Virusantigens mittels Immunfluoreszenz konnten infizierte und nicht-infizierte Zellen in der Kultur visualisiert werden. Als positives Signal wurde für den Nachweis von BoDV-1-N mittels des Antikörpers Bo18 eine deutliche punktförmige, intranukleäre und intrazytoplasmatische, rote Färbung gewertet (Abb. 14), welche in den Negativkontrollen der Immunfluoreszenz nicht zu

finden war. Für den Nachweis von Neuronen mittels anti- β -III-Tubulin-Antikörper hingegen galt eine diffuse Grünfärbung des Zytoplasmas als positives Signal.

Abb. 14: Nachweis von BoDV-1-N mittels Immunfluoreszenz in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels, 10 dpi



Rotes Signal: Nachweis von BoDV-1-N (Bo18); blaues Signal: Zellkern (DAPI);
a: intranukleäres Signal zum Nachweis von BoDV-1-N (Pfeil), b: intranukleäres (Pfeil) und intrazytoplasmatisches (Pfeilspitze) Signal zum Nachweis von BoDV-1-N; Balken: 10 μ m

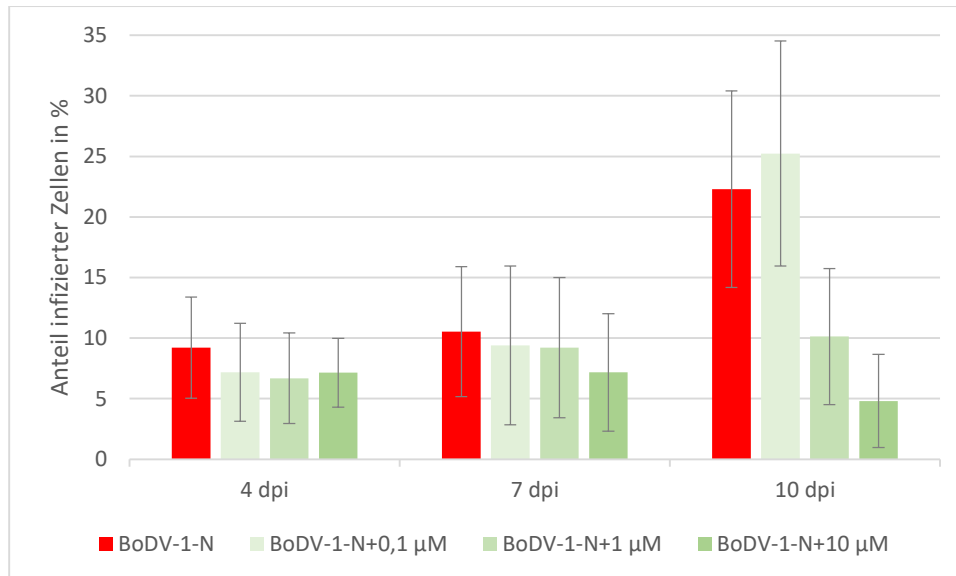
4.1.1.1.1 BoDV-1-Infektionsrate der Dissoziationskultur nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701

Als Messgröße wurde die Anzahl aller infizierten Zellen an einem bestimmten Zeitpunkt gewählt und auf die ausgezählte Gesamtzellzahl bezogen. Verglichen wurde die unbehandelte, BoDV-1-infizierte Kultur mit jenen, welchen der Inhibitor MI-0701 nach der Infektion in den Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M zugesetzt wurde. Als Negativkontrollen dienten stets nicht-infizierte und nur MI-0701-behandelte Kulturen. Die Rohdaten finden sich in Tab. 13 (Anhang).

Nach **vier Tagen** zeigte sich ohne Behandlung eine Infektionsrate der untersuchten Zellen von durchschnittlich 9,2 %, wohingegen bei einer Behandlung mit 0,1 μ M Inhibitor MI-0701 7,2 % der Zellen, bei einer Behandlung mit 1 μ M 6,7 % und bei einer Behandlung mit 10 μ M 7,1 % infiziert waren. **Sieben Tage** nach der Infektion fand sich eine durchschnittliche Infektionsrate von 10,5 % bei den unbehandelten Kulturen. Dagegen konnten zu diesem Zeitpunkt bei einer Behandlung mit 0,1 μ M MI-0701 9,4 %, bei einer Behandlung mit 1 μ M 9,2 % und bei einer Behandlung mit 10 μ M 7,2 % BoDV-1-infizierte Zellen nachgewiesen werden. Nach **zehn Tagen** konnte bei den infizierten Kulturen ohne Behandlung eine durchschnittliche Rate der Infektion von

22,3 % gefunden werden. Nach einer Behandlung von 0,1 μM Inhibitor waren dabei 25,2 %, bei 1 μM 10,1 % und bei 10 μM 4,8 % der Zellen infiziert. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 15 dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt konnte BoDV-1-N in den nicht-infizierten Kulturen nachgewiesen werden.

Abb. 15: Anteil der infizierten Zellen nach BoDV-1-Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701



x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: prozentualer Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellzahl; dpi: *days post infection*; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

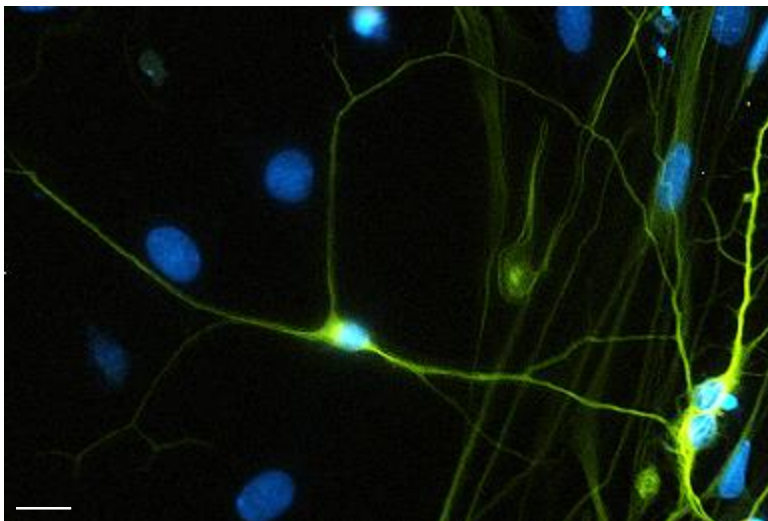
Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse konnte ein statistisch signifikanter Gruppeneffekt in Bezug auf die Behandlung ($p < 0,0001$), ein signifikanter Zeiteffekt ($p < 0,0001$) sowie eine signifikante Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren ($p < 0,0001$) herausgestellt werden. Der Anteil der infizierten Zellen lag demnach nach BoDV-1-Infektion im Mittel höher als jener der zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Zellen. Durchschnittlich zeigten - abgesehen von den Kulturen, welche nach der Infektion mit 10 μM Inhibitor behandelt wurden - alle Gruppen einen Anstieg der Infektionsrate über die Zeit. Es konnten signifikante Unterschiede bei der Entwicklung der Infektionsrate über den Verlauf der Zeit zwischen den Gruppen aufgezeigt werden. Während die BoDV-1-infizierten Kulturen sowie jene nach einer zusätzlichen Behandlung mit 0,1 und 1 μM Inhibitor MI-0701 im Verlauf der Zeit einen ansteigenden Anteil infizierter Zellen zeigten, konnte nach 10 dpi in den mit 10 μM Inhibitor

behandelten Kulturen sogar ein abfallender Anteil infizierter Zellen nachgewiesen werden.

4.1.1.1.2 Anteil der Neurone der Dissoziationskultur nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701

Um den Einfluss der BoDV-1-Infektion und der Inhibitor-Applikation auf die olfaktorischen Neurone zu untersuchen, wurde der Neuronenanteil in den beschriebenen Kulturen nach 4, 7 und 10 dpi bestimmt. Als Neurone wurden jene β -III-Tubulin-positiven Zellen definiert, welche einzeln oder in Gruppen lagen und ein bipolares Aussehen aufwiesen (Abb. 16). Der Anteil der β -III-Tubulin-markierten Zellen an der Gesamtzellzahl der Kultur wurde bestimmt, dabei konnte nicht unterschieden werden, ob es sich um infizierte oder nicht-infizierte Neurone handelte. Die Rohdaten finden sich in Tab. 13 (Anhang).

Abb. 16: Nachweis durch Immunfluoreszenz von Neuronen mittels β -III-Tubulin-Antigen in der Dissoziationskultur, 10 dpi

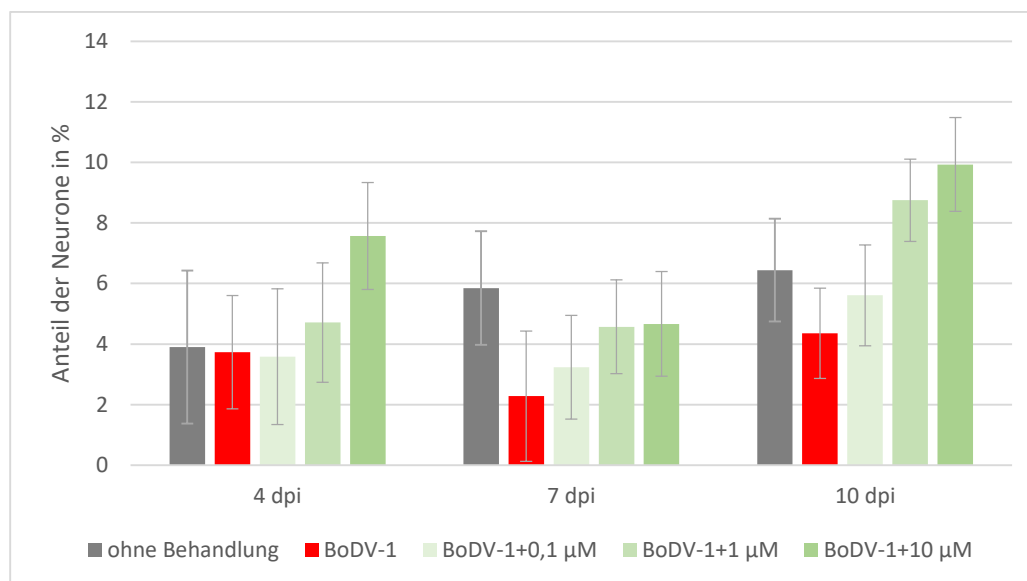


Grünes Signal: bipolare Neurone mit intrazytoplasmatischem Signal (β -III-Tubulin); blaues Signal: Zellkern (DAPI); Balken: 10 μ m

Die erhobenen Anteile der β -III-Tubulin-positiven Neurone an der Gesamtzellzahl der Kultur waren nicht normal, sondern rechtsschief verteilt, sodass eine Transformation mittels Logarithmierung durchgeführt wurde. Der geometrische Mittelwert des

Neuronenanteils lag nach **vier Tagen** in unbehandelten Kulturen bei 3,9 %, wohingegen BoDV-1 infizierte Kulturen 3,7 %, bei Zugabe von 0,1 μM MI-0701 3,6 %, bei Zugabe von 1 μM 4,7 % und bei Zugabe von 10 μM 7,6 % der Zellen Neurone darstellten. Nach **sieben Tagen** waren im Durchschnitt 5,8 % der unbehandelten Zellen Neurone, dagegen 2,3 % bei den infizierten Kulturen ohne Inhibitorbehandlung. Nach Zugabe von 0,1 μM Inhibitor lag der Neuronenanteil in den infizierten Kulturen bei 3,2 %, nach Zugabe von 1 μM bei 4,6 % und nach Zugabe von 10 μM bei 4,7 %. Nach **zehn Tagen** lag der Neuronenanteil der unbehandelten Kulturen im Mittel bei 6,4 %, der der BoDV-1-infizierten Kulturen bei 4,4 %. Nach Behandlung mit dem Inhibitor zeigte sich bei einer Zugabe von 0,1 μM ein Anteil von 5,6 %, bei 1 μM von 8,7 % und bei 10 μM von 9,9 % Neuronen. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 17 dargestellt. Auch hier konnte zu keinem Zeitpunkt ein positives Signal für BoDV-1-N in den nicht-infizierten Kulturen nachgewiesen werden.

Abb. 17: Anteil der Neurone nach BoDV-1-Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701



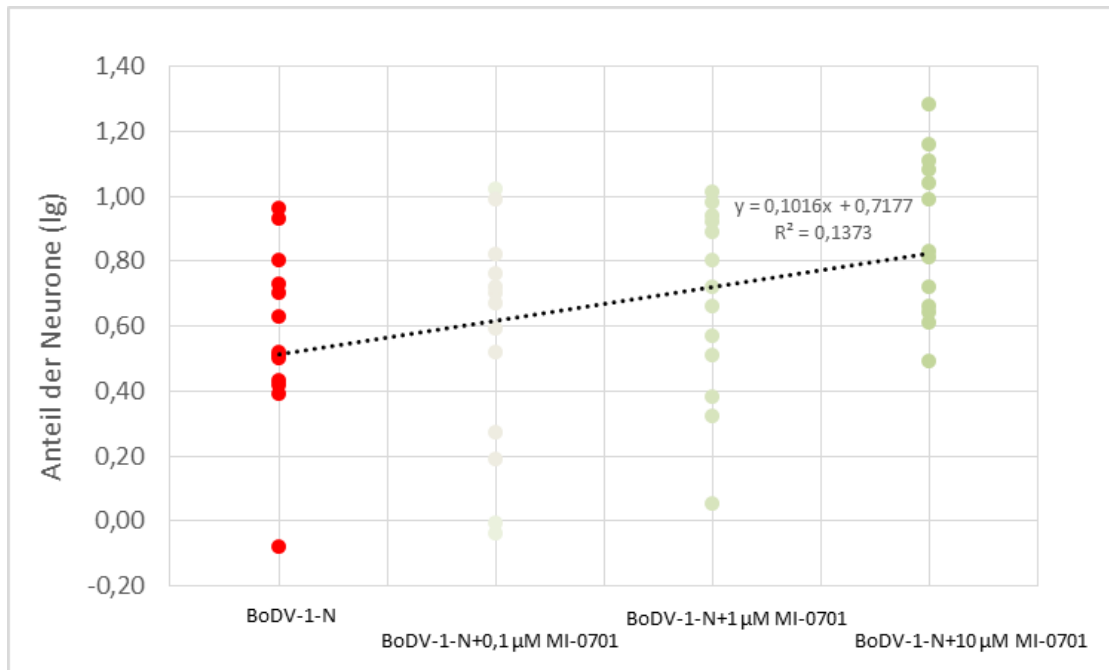
x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: prozentualer Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl; dpi: *days post infection*; geometrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Streufaktor

Der Neuronenanteil der Kulturen war abhängig von der durchgeführten Behandlung. Während die BoDV-1-infizierten Kulturen stets den niedrigsten Anteil an der Gesamtzellzahl aufwiesen, zeigten die zusätzlich mit 10 μM MI-0701 behandelten

Kulturen den höchsten Neuronenanteil. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse konnte eine statistische Signifikanz bezüglich des Haupteffekts der Behandlung ($p=0,0001$) festgestellt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Neurone in den untersuchten Gruppen über die Zeit im Mittel stets anstieg, mittels Varianzanalyse konnte auch statistisch eine Signifikanz bezüglich der Zeit ($p=0,0002$) bei den behandelten Kulturen festgestellt werden. In diesem Fall bestand keine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren ($p=0,8070$), denn der Neuronenanteil veränderte sich in jeder Gruppe im Mittel gleichmäßig, der Abstand zwischen den Gruppenmittelwerten blieb zu jedem Zeitpunkt gleich. Während der Anteil der Neurone in infizierten Kulturen stets geringer war als in unbehandelten Kulturen, zeigten mit dem Inhibitor behandelte Kulturen immer teils deutlich höhere Neuronenanteile im Vergleich zu den infizierten Kulturen, nach 4 und 10 dpi auch im Vergleich zu den unbehandelten Kulturen.

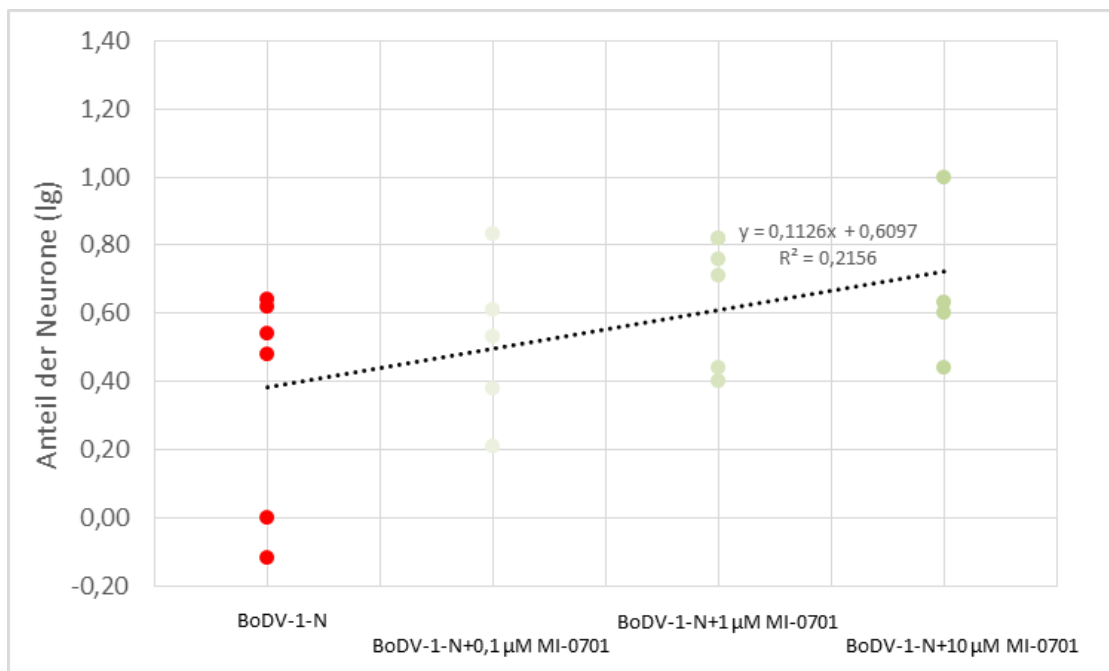
Eine zeitbezogene Trendanalyse der Daten konnte zudem eine statistische Signifikanz nach 4 dpi ($p=0,006$), nach 7 dpi ($p=0,032$) und nach 10 dpi ($p<0,001$) bei den behandelten Kulturen mit nahezu identischer Steigung und identischem y-Achsenabschnitt der Regressionsgeraden aufzeigen (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20). Dies verdeutlicht das vom Zeitpunkt unabhängige, konstante Verhältnis des Neuronenanteils zwischen den untersuchten Kulturen.

Abb. 18: Darstellung der statistischen Trendanalyse des Neuronenanteils in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels in Bezug auf die Behandlung nach 4 dpi



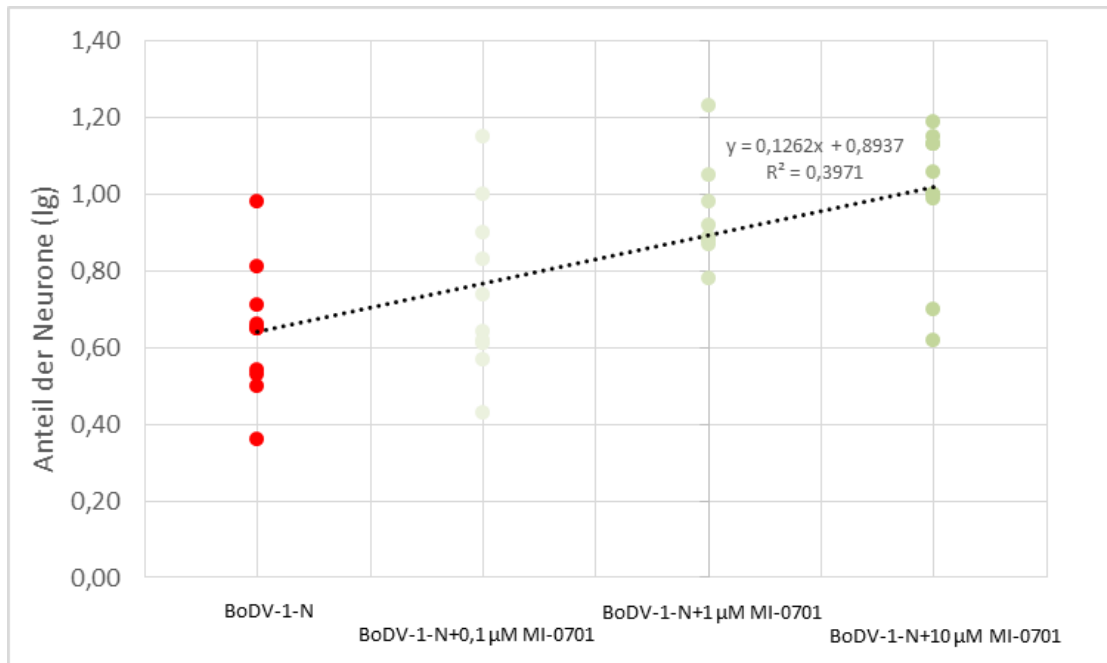
x-Achse: Behandlung der Kultur; y-Achse: prozentualer Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl (lg); $y=mx+b$: Regressionsgerade; R^2 : Bestimmtheitsmaß

Abb. 19: Darstellung der statistischen Trendanalyse des Neuronenanteils in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels in Bezug auf die Behandlung nach 7 dpi



x-Achse: Behandlung der Kultur; y-Achse: prozentualer Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl (lg); $y=mx+b$: Regressionsgerade; R^2 : Bestimmtheitsmaß

Abb. 20: Darstellung der statistischen Trendanalyse des Neuronenanteils in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels in Bezug auf die Behandlung nach 10 dpi



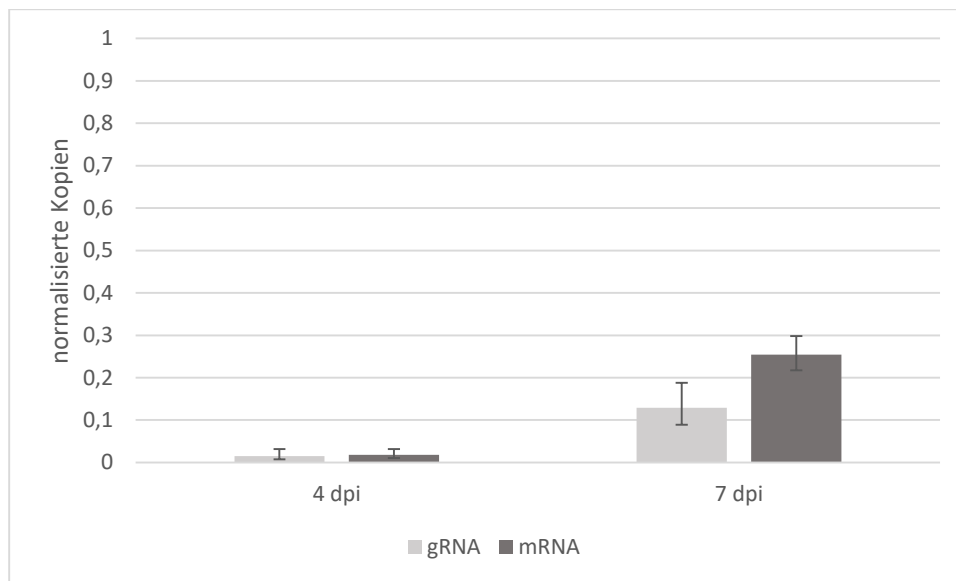
x-Achse: Behandlung der Kultur; y-Achse: prozentualer Anteil der Neurone an der Gesamtzellzahl (lg); $y=mx+b$: Regressionsgerade; R^2 : Bestimmtheitsmaß

4.1.2 Nachweis viraler genomischer RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA)

Um die Relevanz des olfaktorischen Epithels für die initiale, intranasale BoDV-1-Infektion zu untersuchen, wurde die auf das *housekeeping gene* GAPDH normalisierte Kopienzahl für die genomische RNA (gRNA) sowie messenger RNA (mRNA) vier und sieben Tage nach der Infektion der olfaktorischen Dissoziationskultur bestimmt. Zu keinem Zeitpunkt waren dabei in einer no-template-control (NTC) virale gRNA oder mRNA nachweisbar. Die Rohdaten finden sich in Tab. 14 (Anhang).

Nach **vier Tagen** konnten durchschnittlich 0,02 Kopien sowohl für die gRNA als auch für die mRNA detektiert werden. **Sieben Tage** nach der Infektion waren 0,14 Kopien für die gRNA und 0,26 Kopien für die mRNA vorhanden. Eine graphische Darstellung findet sich in Abb. 21.

Abb. 21: Darstellung der normalisierten Kopienzahl für die genomische und messenger RNA vier und sieben Tage nach der Infektion des olfaktorischen Epithels



x-Achse: Zeit in Kultur; y-Achse: auf das *housekeeping gene* normalisierte Kopienzahl; dpi: *days post infection*; gRNA: genomische RNA; mRNA: messenger RNA; geometrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Streufaktor

Während die normalisierten Kopienzahlen nach 4 dpi keinen signifikanten Unterschied aufwiesen, konnte nach 7 dpi eine deutlich höhere Kopienzahl für die mRNA als für die gRNA festgestellt werden. Bei beiden Messgrößen war ein signifikanter Anstieg über die Zeit zu verzeichnen. Nach logarithmischer Transformation der Daten konnte mittels t-Test für verbundene Stichproben sowohl für die Expression der genomischen RNA ($p=0,0357$) als auch für die der messenger RNA ($p=0,0098$) - bezogen auf die Zeit - eine statistisch signifikante Abhängigkeit herausgestellt werden.

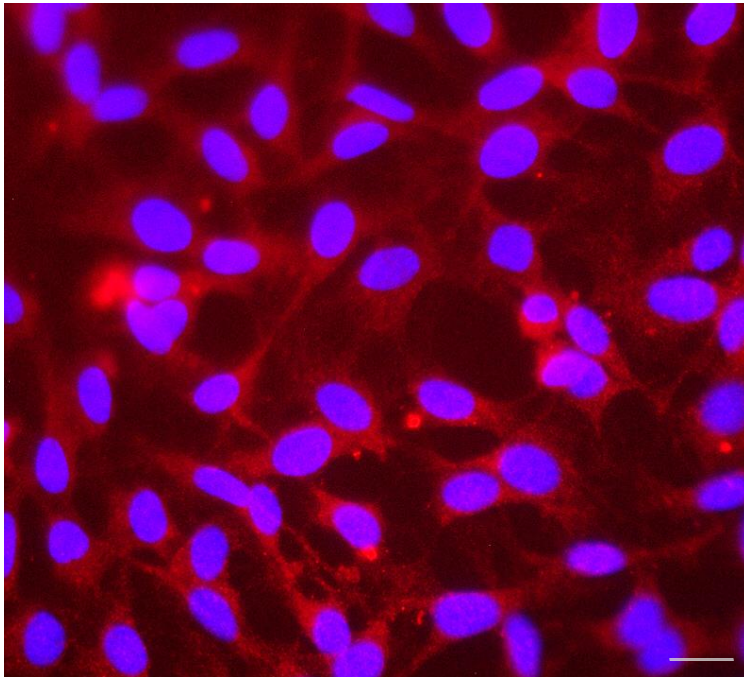
4.2 ROLF B1.T – KULTUR PERMANENTER ADULTER OLFAKTORISCHER HÜLLZELLEN DER RATTE

4.2.1 Immunhistologischer Nachweis von p75

Zur Identifikation der Zelllinie Rolf B1.T wurde eine immunhistologische Untersuchung auf die Expression von p75 durchgeführt. Als positives Signal wurde dabei eine diffuse intrazytoplasmatische, rote Färbung gewertet, welche nicht in der Negativkontrolle der

Immunfluoreszenz zu finden war (Abb. 22). 100 % der Zellen zeigten ein positives Signal.

Abb. 22: Nachweis olfaktorischer Hüllzellen der Ratte (Rolf B1.T) mittels Immunfluoreszenz

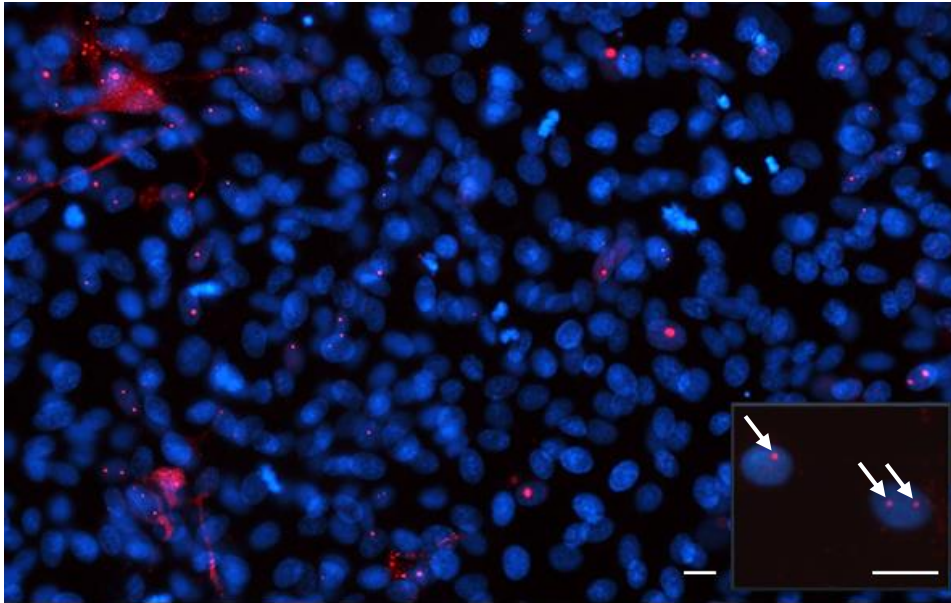


Rotes Signal: Nachweis des *low affinity neurotrophin receptor* p75; blaues Signal: Zellkerne (DAPI); Balken 20 µm

4.2.2 Infektion mit BoDV-1

Die BoDV-1-Infektion dieser Zelllinie wurde durch den Nachweis des BoDV-1-N mittels Immunfluoreszenz (Abb. 23) zwei, drei, vier, fünf und sechs Tage nach der Infektion untersucht. Zu keinem Zeitpunkt konnte in den nicht infizierten Kontrollen ein spezifisches Signal nachgewiesen werden.

Abb. 23: Nachweis von BoDV-1-N in der permanenten Kultur olfaktorischer Hüllzellen der Ratte mittels Immunfluoreszenz (5 dpi)

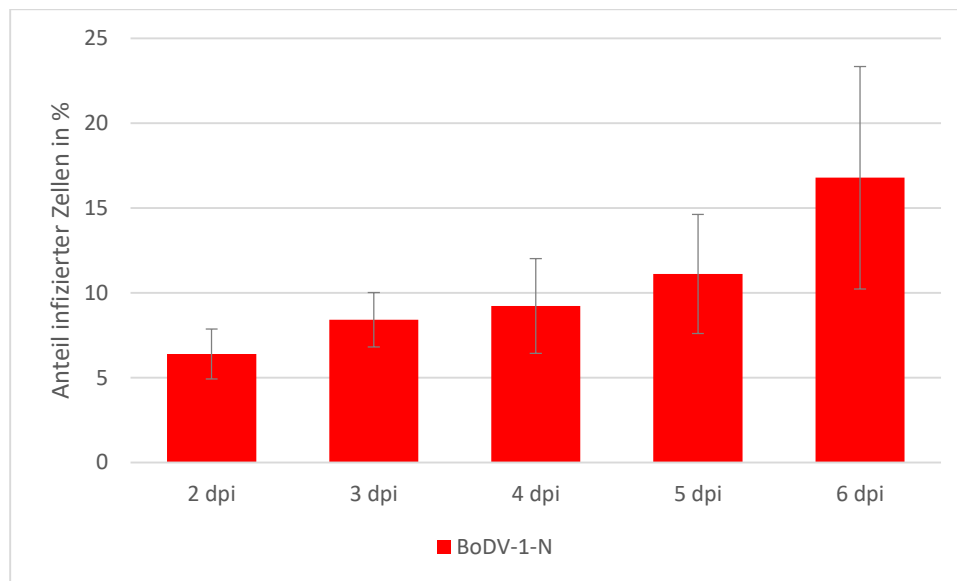


Rotes Signal: Nachweis von BoDV-1-N (Bo18). blaues Signal: Zellkern (DAPI); Insert: Vergrößerung; Nachweis von BoDV-1-N im Zellkern (Pfeile); Balken: 20 µm

Zudem wurde der Anteil der BoDV-1-N-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und so eine Infektionskinetik über den Untersuchungszeitraum von zwei bis sechs Tagen erstellt. Die Rohdaten finden sich in Tab. 15 (Anhang).

Nach **zwei Tagen** p.i. war im Durchschnitt bei 6,4 % der Zellen BoDV-1-N nachweisbar. **Drei Tage** nach der Infektion waren es 8,4 %, **vier Tage** nach der Infektion bereits 9,2 %. Nach **fünf Tagen** war eine Infektionsrate von 11,1 % zu verzeichnen, nach **sechs Tagen** schließlich eine Rate von 16,8 %. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 24 dargestellt.

Abb. 24: Darstellung des Anteils der BoDV-1-infizierten Hüllzellen der Ratte (Rolf B1.T) an der Gesamtzellzahl



x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: prozentualer Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellzahl; dpi: *days post infection*; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

Der Anteil infizierter Zellen in der Kultur stieg mit fortschreitendem Untersuchungszeitpunkt. Nach logarithmischer Transformation der schief-verteilten Daten konnte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ein statistisch signifikanter Zusammenhang bezüglich des Zeiteffekts ($p < 0,0001$) festgestellt werden.

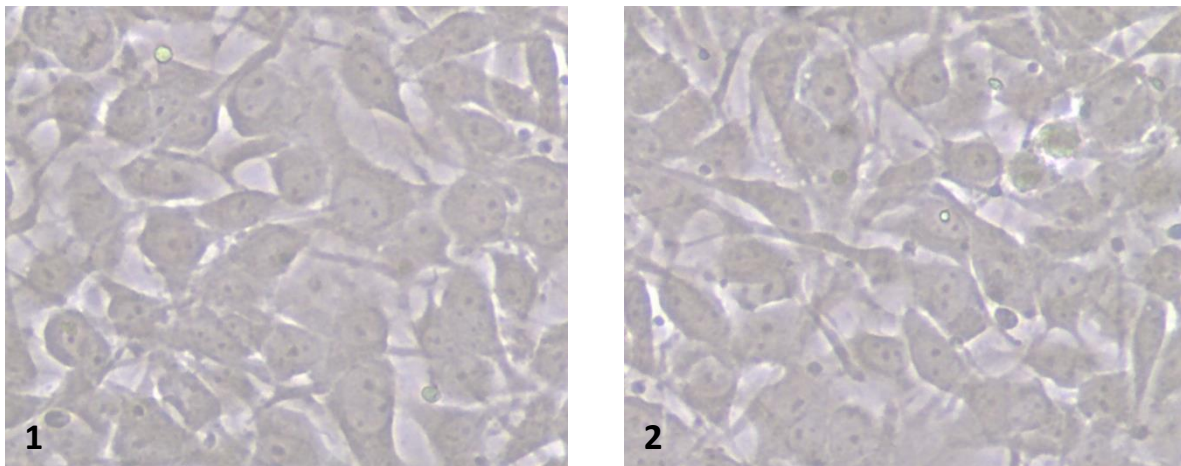
4.2.3 Einfluss der Beschichtung auf das Zellwachstum und die Infektionsrate

Die Beschichtung der Wachstumsoberfläche kann die Entwicklung adhärenter Zellen positiv beeinflussen. Neben einer Behandlung mit Poly-L-Lysin ist ein zusätzlicher Gebrauch von Laminin für olfaktorische Hüllzellen in der Literatur als wachstumsfördernd beschrieben (SONIGRA *et al.*, 1996). Daher wurden olfaktorische Hüllzellen auf mit Poly-L-Lysin oder zusätzlich mit Laminin beschichtete Deckgläschen aufgebracht, infiziert und nach 2, 3, 4, 5 und 6 dpi fixiert. Als Kontrollen wurden stets nicht infizierte Kulturen auf einfach oder zweifach beschichteten Deckgläschen mitgeführt.

In der vitalen Kultur konnte unabhängig von der vorgenommenen Beschichtung keine Veränderung in der Zellmorphologie (Abb. 25) oder der Wachstumsrate festgestellt

werden. Nach einer initialen Aussaat von 125.000 Zellen waren die Deckgläschen aller Kulturen unabhängig von einer Infektion oder der Beschichtung nach sechs Tagen zu 100 % bewachsen. Mittels Immunfluoreszenz wurden die Kulturen hinsichtlich ihrer Infektionsrate untersucht und miteinander verglichen.

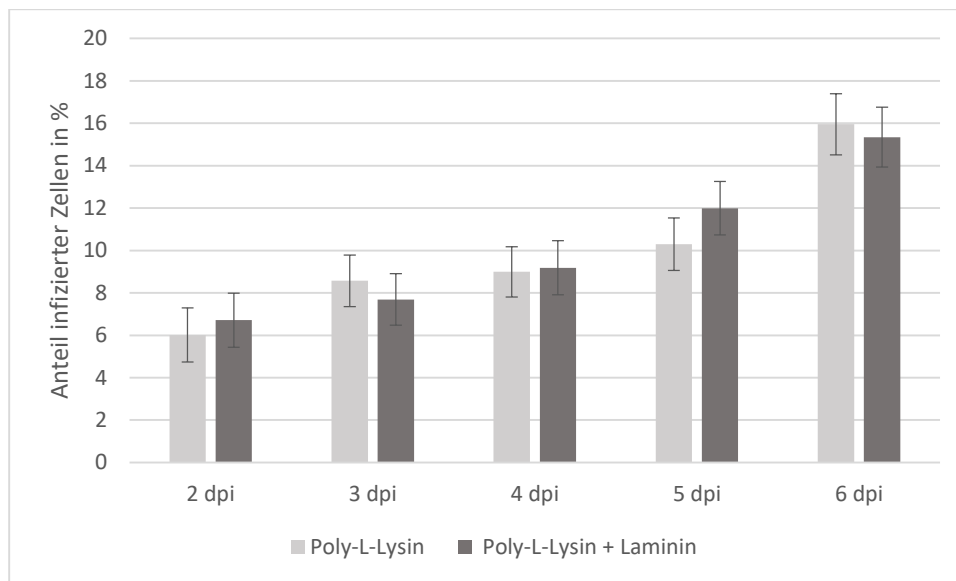
Abb. 25: Native olfaktorische Hüllzellen (Rolf B1.T) mit einfacher Poly-L-Lysin- und zusätzlicher Laminin-Beschichtung nach fünf Tagen



- 1: Zellwachstum auf Oberfläche mit einfacher Beschichtung durch Poly-L-Lysin;
2: Zellwachstum auf Oberfläche mit doppelter Beschichtung durch Poly-L-Lysin und Laminin

Nach **zwei Tagen** waren mit reiner Poly-L-Lysin-Beschichtung im Durchschnitt 6,0 % der Zellen mit BoDV-1 infiziert, bei zusätzlicher Beschichtung mit Laminin waren es zu diesem Zeitpunkt 6,7 %. **Drei Tage** nach der Infektion konnte eine Infektionsrate von 8,6 % bei den einfach beschichteten Varianten und 7,7 % bei doppelt beschichteten Kulturen nachgewiesen werden. Am **vierten Tag** p.i. waren 9,0 % und 9,2 % der Zellen bei einfacher, beziehungsweise zweifacher Beschichtung als positiv zu detektieren. Nach **fünf Tagen** p.i. zeigten sich auf Poly-L-Lysin behandelten Deckgläschen 10,3 % positive Zellen, während bei zusätzlicher Laminin-Behandlung 12,0 % zu verzeichnen waren. Zuletzt konnten nach **sechs Tagen** 16,0 % positive Zellen nach einfacher und 15,4 % positive Zellen nach doppelter Beschichtung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 26 dargestellt.

Abb. 26: Prozentualer Anteil der infizierten Zellen nach BoDV-1-Infektion der olfaktorischen Hüllzellen (Rolf B1.T) mit einfacher und doppelter Beschichtung



x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: prozentualer Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellzahl; dpi: *days post infection*; geometrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Streufaktor

Der Anteil der infizierten Zellen in der Kultur war unabhängig von der Beschichtung der Wachstumsoberfläche. Nach Transformation der Daten waren mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ein Gruppeneffekt in Hinsicht auf die Beschichtung ($p=0,6204$) sowie eine Wechselwirkung der beiden Faktoren Beschichtung und Zeit ($p=0,5938$) statistisch nicht signifikant.

4.2.4 Inhibitor-Anwendung nach BoDV-1-Infektion

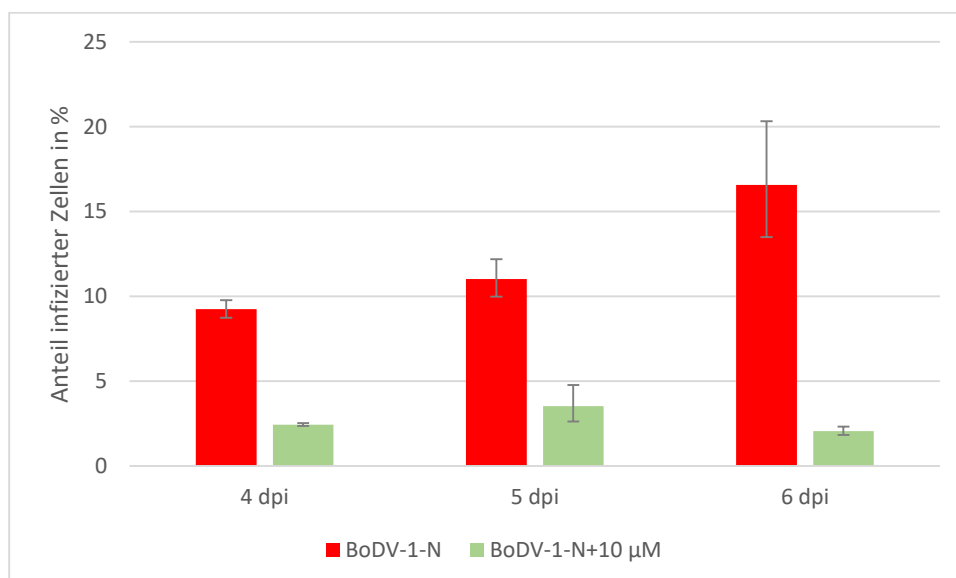
Der Einfluss des Inhibitors MI-0701 auf die Infektionsrate der olfaktorischen Hüllzellen sollte untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit BoDV-1 infiziert und einmalig mit dem Inhibitor in einer Konzentration von 10 μM behandelt. Nach der Fixation zu den Zeitpunkten 4, 5 und 6 dpi wurde jeweils die Infektionsrate bestimmt. Als Negativkontrollen wurden Kulturen, welche ausschließlich mit dem Inhibitor behandelt wurden, mitgeführt.

4.2.4.1 Nachweis von BoDV-1-N mittels Immunfluoreszenz und statistische Auswertung

Mittels Immunfluoreszenz konnten die BoDV-1-infizierten olfaktorischen Hüllzellen detektiert werden. Auch hier galt als positiver BoDV-1-N-Nachweis eine deutliche punktförmige, intranukleäre und intrazytoplasmatische, rote Färbung (Abb. 23), welche in den Negativkontrollen der Immunfluoreszenz nicht zu finden war. Die Rohdaten finden sich in Tab. 15 (Anhang).

Vier Tage nach der Infektion waren 9,2 % der Zellen infiziert, nach zusätzlicher Behandlung mit 10 μ M MI-0701 waren es 2,4 %. Nach **fünf Tagen** war in 11,1 %, beziehungsweise nach Inhibitor-Applikation 3,6 % der olfaktorischen Hüllzellen ein positives Signal zu verzeichnen, während nach **sechs Tagen** eine Infektionsrate von 16,8 % verglichen mit 2,1 % nach Inhibitor-Applikation bestand. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 27 dargestellt. In keiner nicht-infizierten Kultur konnte dabei ein positives Signal detektiert werden.

Abb. 27: Prozentualer Anteil der BoDV-1-infizierten olfaktorischen Hüllzellen (Rolf B1.T) nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701



x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: prozentualer Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellzahl; dpi: *days post infection*; geometrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Streufaktor

Der Anteil der infizierten Zellen in der Kultur war abhängig von der Behandlung der Zellen. Nach zusätzlicher Applikation von 10 μ M MI-0701 waren stets weniger infizierte Zellen zu detektieren als nach BoDV-1-Infektion ohne Inhibitorzugabe. Nach logarithmischer Transformation der Daten war dies mittels zweifaktorieller Varianzanalyse durch einen statistisch signifikanten Gruppeneffekt in Bezug auf die Behandlung der Kulturen mit dem Inhibitor MI-0701 ($p=0,0027$) zu verifizieren. Der Einfluss der Zeit war dabei gruppenabhängig. Es wurde eine statistische Signifikanz bezüglich der Wechselwirkung zwischen Behandlung und Zeit ($p=0,0180$) festgestellt. Während in den BoDV-1-infizierten Kulturen der Anteil der infizierten Zellen über die Zeit stets anstieg, war bei den zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Kulturen ein im Trend gleichbleibender prozentualer Anteil zu verzeichnen.

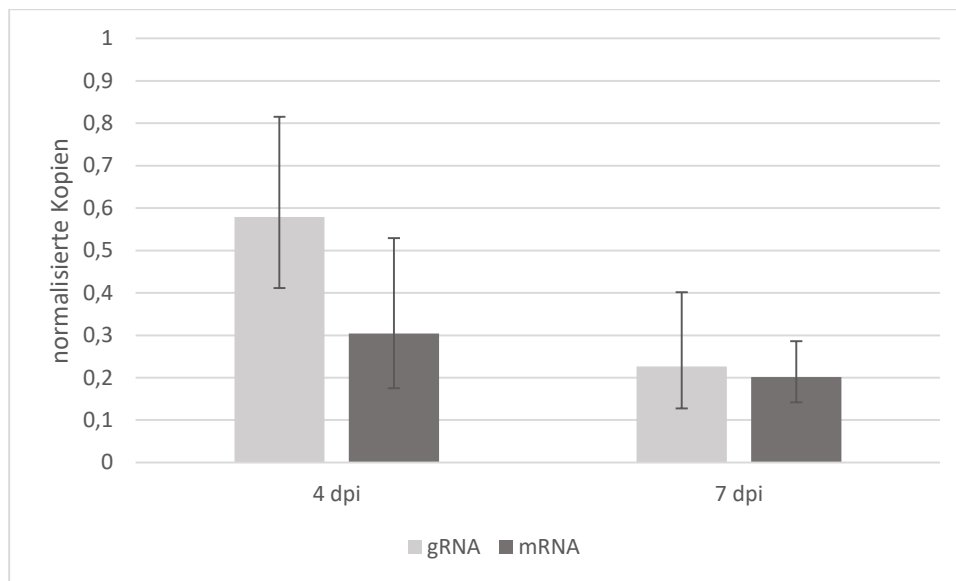
Nach 4 dpi konnte bei den Kulturen, welche mit dem Inhibitor behandelt wurden, im Vergleich zu den infizierten Kulturen ohne Inhibitorzugabe im Mittel eine Reduktion der Infektionsrate um 74 % verzeichnet werden. Nach 5 dpi waren es 68 %, nach 6 dpi 88 %.

4.2.5 Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA

Um die Rolle der olfaktorischen Hüllzellen bei der initialen viralen Infektion in Bezug auf die Effizienz der viralen Replikation und Transkription zu untersuchen, wurde die auf das *housekeeping gene* GAPDH normalisierte Kopienzahl für die virale gRNA sowie mRNA vier und sieben Tage nach der Infektion bestimmt. Zu keinem Zeitpunkt waren dabei in einer NTC spezifische Amplifikate nachweisbar.

Nach **vier Tagen** konnten durchschnittlich 0,6 Kopien für die gRNA und 0,34 Kopien für die mRNA detektiert werden. **Sieben Tage** nach der Infektion waren 0,25 Kopien für die gRNA und 0,21 Kopien für die mRNA vorhanden. Eine graphische Darstellung findet sich in Abb. 28.

Abb. 28: Darstellung der normalisierten Kopienzahl für die virale genomische und messenger RNA vier und sieben Tage nach der BoDV-1-Infektion der olfaktorischen Hüllzellen



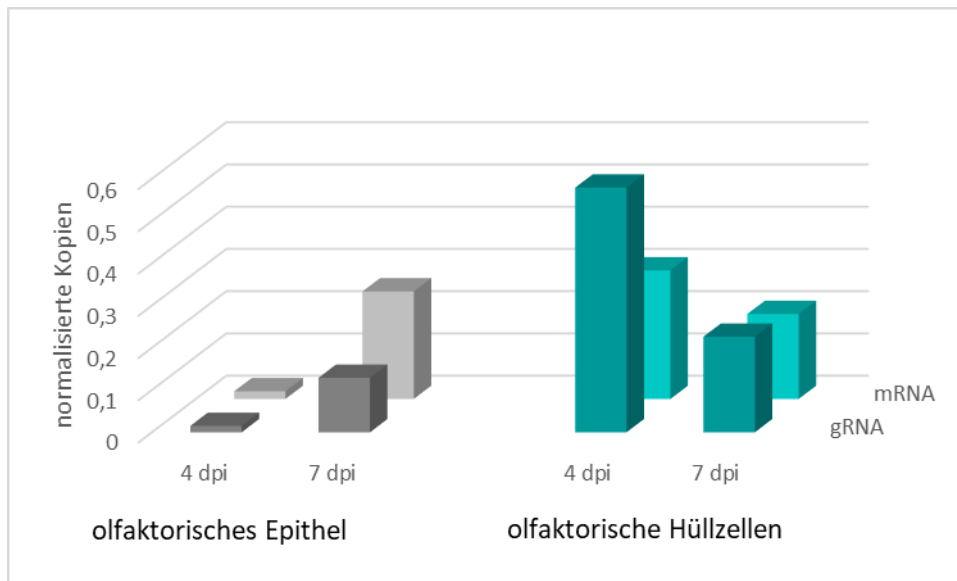
x-Achse: Zeit in Kultur; y-Achse: auf das *housekeeping gene* normalisierte Kopienzahl; dpi: *days post infection*; gRNA: genomische RNA; mRNA: messenger RNA; geometrischer Mittelwert; Fehlerbalken: Streufaktor

Die normalisierte Kopienzahl zeigte dabei weder für die genomische noch für die messenger RNA eine statistisch signifikante Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt. Nach logarithmischer Transformation der Daten konnte dabei mittels t-Test für verbundene Stichproben weder für die Expression der genomischen RNA ($p=0,1677$) noch für die der messenger RNA ($p=0,4965$) bezogen auf die Zeit eine statistisch signifikante Abhängigkeit herausgestellt werden. Während nach 4 dpi deutlich mehr normalisierte Kopien gRNA als mRNA nachgewiesen werden konnten, war die Differenz nach 7 dpi sehr gering.

4.2.6 Vergleichende statistische Untersuchung zum Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA *in-vitro*

Zur Verifizierung der Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien (Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels und Kultur olfaktorischer Hüllzellen) wurde eine vergleichende Betrachtung der normalisierten Kopienzahlen für die virale gRNA und mRNA vorgenommen. Eine vergleichende graphische Darstellung findet sich in Abb. 29.

Abb. 29: Vergleichende Darstellung des Nachweises viraler genomischer und viraler messenger RNA in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels (OE) und den olfaktorischen Hüllzellen (OEC)



x-Achse: Dauer in Kultur; y-Achse: auf das *housekeeping gene* normalisierte Kopienzahl; dpi: *days post infection*; gRNA: genomische RNA; mRNA: messenger RNA; geometrischer Mittelwert

Bei vergleichenden Untersuchungen zwischen den Daten der olfaktorischen Hüllzellen und der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels war die normalisierte Kopienzahl abhängig vom untersuchten Kultursystem, dabei zeigten die Kulturen der olfaktorischen Hüllzellen im Mittel höhere Werte für die virale mRNA und gRNA (siehe 4.2.5) als jene des olfaktorischen Epithels (siehe 4.1.2). Im Vergleich der beiden Kultursysteme zeigten sich in der Dissoziationskultur nach 4 dpi nur geringe Mengen an normalisierten Kopien (gRNA und mRNA), wohingegen in der Kultur der olfaktorischen Hüllzellen zu diesem Zeitpunkt große Mengen viraler RNA nachzuweisen waren. Nach 7 dpi waren die Unterschiede zwischen den beiden Kultursystemen weniger ausgeprägt. Der Zeiteinfluss war dabei gruppenabhängig, während die Kopienzahl der genomischen und der messenger RNA in den Kulturen des olfaktorischen Epithels über die Zeit anstieg, fiel sie für die Kulturen der olfaktorischen Hüllzellen ab. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse zeigten sich dabei statistisch signifikante Haupteffekte in Bezug auf die untersuchten Kulturen (gRNA: $p=0,0023$; mRNA: $p=0,004$) sowie signifikante Wechselwirkungen zwischen dem Faktor Zellkultur und dem Faktor Zeit (gRNA: $p=0,0071$; mRNA: $p=0,0058$). Während

nach 4 dpi in den Kulturen der olfaktorischen Hüllzellen mehr Kopien gRNA als mRNA nachzuweisen waren, waren die Werte nach 7 dpi nahezu gleich. In den Kulturen des olfaktorischen Epithels waren nach 4 dpi annäherungsweise gleichviele Kopien für gRNA und mRNA nachweisbar, nach 7 dpi hingegen fanden sich mehr Kopien der viralen messenger als von der genomischen RNA. Es zeigte sich mit $p=0,0172$ ein statistisch signifikanter Haupteffekt bezüglich der Zeit für die Anzahl normalisierter Kopien der mRNA.

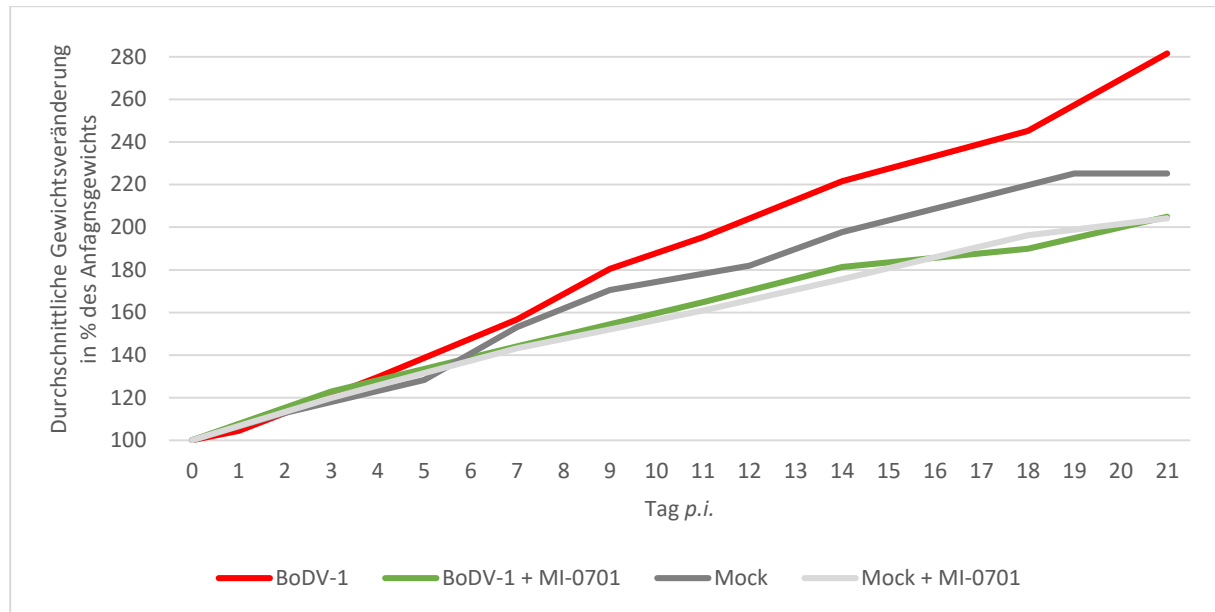
4.3 EXPERIMENTELLE INTRANASALE INHIBITOR-ANWENDUNG BEI BoDV-1-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN

Um den Einfluss des Inhibitors auf die BoDV-1-Infektion auch *in-vivo* zu untersuchen wurden adulte Lewis-Ratten intranasal mit dem Virus infiziert und zu zwei definierten Zeitpunkten mit MI-0701 behandelt. Die Tiere wurden regelmäßig klinisch untersucht und nach 14 und nach 21 Tagen p.i. euthanasiert und seziert. Neben ausschließlich BoDV-1-infizierten Tieren standen dabei auch Mock-infizierte Tiere sowie Mock-infizierte und Inhibitor-behandelte Tiere als Kontrollen zur Verfügung.

4.3.1 Klinik der Versuchstiere

Im Laufe des Untersuchungszeitraums konnten bei keinem Tier der verschiedenen Kohorten Anzeichen eines Erkrankungszustandes festgestellt werden, insbesondere fanden sich keine Hinweise auf neurologische Symptome. Die jeweiligen Untersuchungsergebnisse wurden für jedes Tier separat in den *Score Sheets* dokumentiert. Alle Tiere nahmen über den Zeitraum der Untersuchung stets zu. Während das Gewicht der BoDV-1-infizierten Tiere nach 21 dpi etwa 280 % des durchschnittlichen Ausgangsgewichts betrug, war bei den zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Tieren eine Zunahme auf etwa 205 % zu verzeichnen, ebenso wie bei den Mock-infizierten und zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Tieren. Das Gewicht der Mock-infizierten Tiere hingegen betrug nach 21 dpi etwa 225 % des durchschnittlichen Ausgangsgewichts. Ein Überblick über den Gewichtsverlauf der vier verschiedenen Untersuchungsgruppen ist in Abb. 30 zu finden.

Abb. 30: Darstellung der durchschnittlichen Gewichtsveränderung der Versuchstiere in Prozent des Anfangsgewichts bezogen auf die Zeit nach der Infektion bzw. Mock-Infektion



x-Achse: Zeit nach der Infektion bzw. Mock-Infektion; y-Achse: durchschnittliche Veränderung des Körpergewichts der Tiere in Prozent des Anfangsgewichts

4.3.2 Pathohistologische Befunde

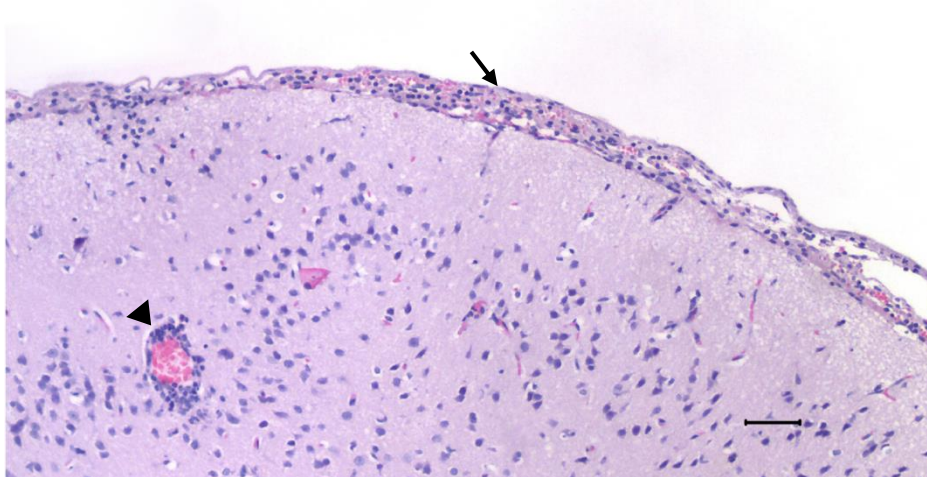
Das olfaktorische Epithel und die Gehirne der Tiere aus den verschiedenen Gruppen wurde pathohistologisch auf das Vorhandensein von perivaskulären, meningealen und parenchymatösen entzündlichen Veränderungen sowie degenerativen Läsionen untersucht.

Während zum Zeitpunkt **14 dpi** weder die BoDV-1-infizierten Tiere noch die zusätzlich mit MI-0701 behandelten BoDV-1-infizierten Tiere entzündliche oder degenerative Veränderungen im Gehirn aufwiesen, konnte nach **21 dpi** in beiden Gruppen bei allen Tieren eine geringgradige Infiltration der Meningen weitestgehend über alle untersuchten Bereiche des ZNS mit Lymphozyten und Makrophagen sowie wenigen Plasmazellen (nicht-eitrige Meningitis) nachgewiesen werden. Ganz vereinzelt fanden sich auch gleichartige perivaskuläre Infiltrate in beiden Gruppen (nicht-eitrige Meningoenzephalitis) (siehe Abb. 31). Zu keinem Zeitpunkt waren entzündliche oder degenerative Veränderungen bei Mock-infizierten sowie zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Mock-infizierten Tieren nachweisbar. Unter Verwendung des exakten

Fisher-Tests konnte für die BoDV-1-infizierten Tiere ein statistisch signifikanter Zusammenhang in Bezug auf die Zeit ($p < 0,00001$) herausgestellt werden.

Im Bereich der Nasenschleimhaut konnten zu keinem Untersuchungszeitpunkt und in keiner Gruppe Anzeichen einer Inflammation oder Degeneration gefunden werden.

Abb. 31: Histologischer Nachweis von mononukleären, meningealen und perivaskulären Infiltraten nach 21 dpi

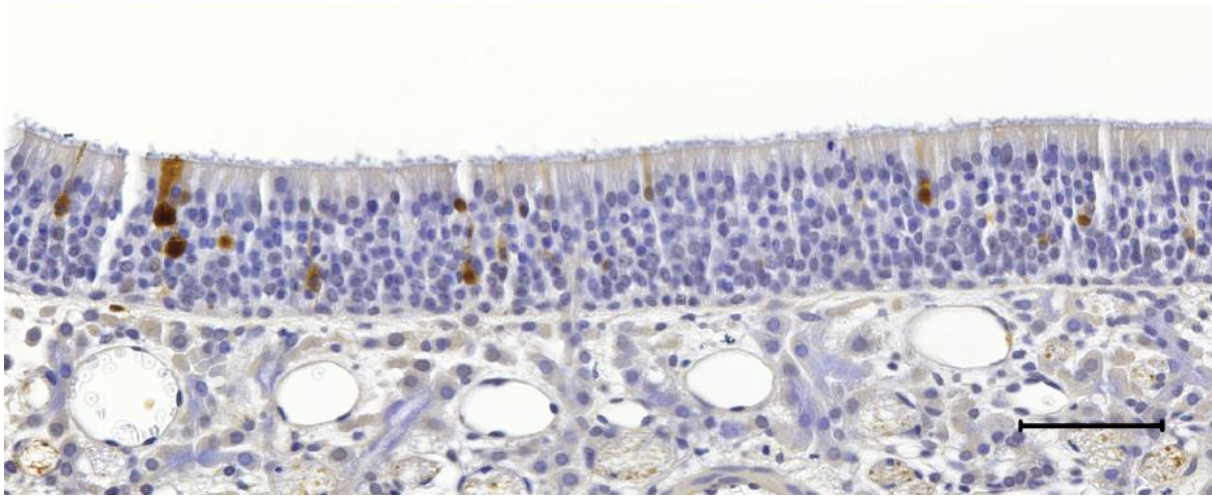


Cortex cerebri einer BoDV-1-infizierten und MI-0701-behandelten Ratte; nicht-eitrige Meningitis (Pfeil); perivaskuläre, mononukleäre Infiltrate (Pfeilspitze); 21 dpi; Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Balken: 100 μ m

4.3.3 Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N

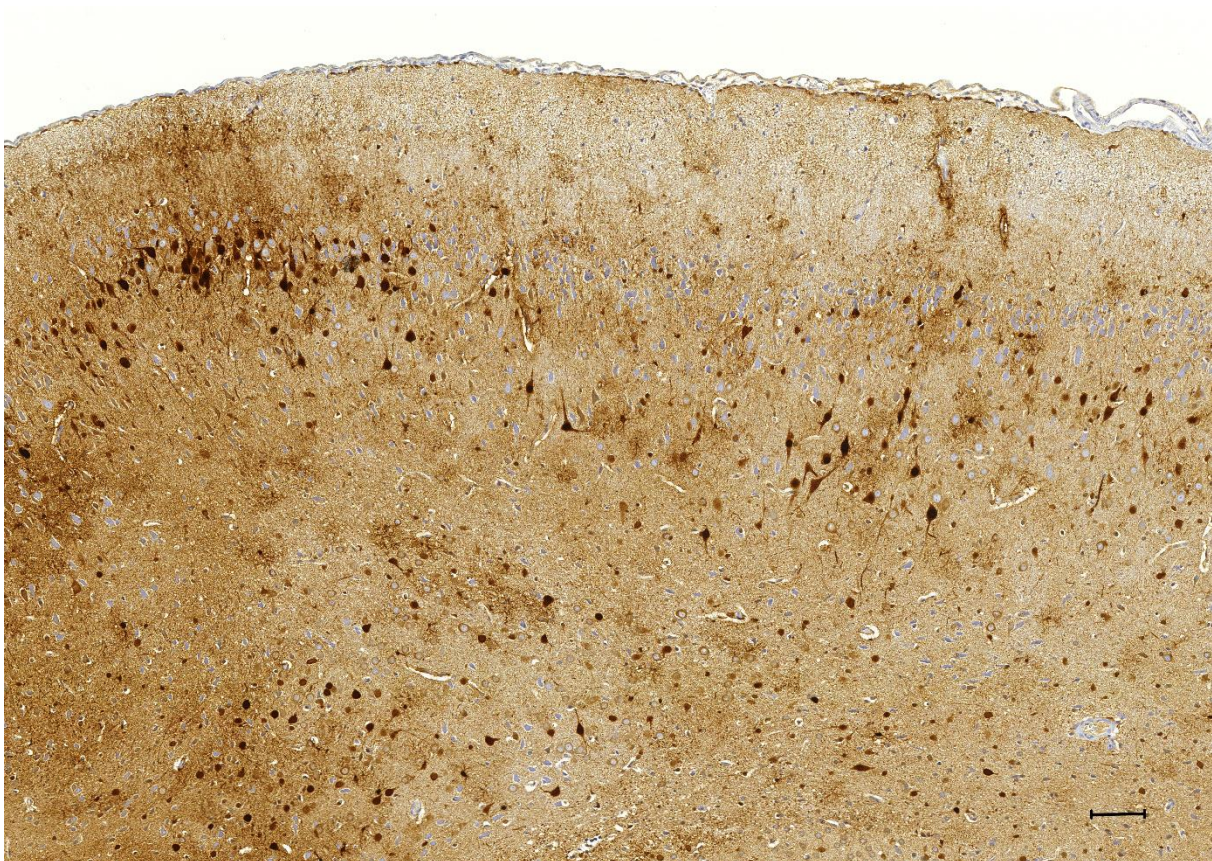
Zur Untersuchung des Effekts der Inhibitor-Applikation wurden Gehirn und Nase mittels Immunhistologie auf das Vorhandensein und die Verteilung von BoDV-1-N untersucht. Der Nachweis von BoDV-1-N war durch einen braunen, feingranulären bis diffusen Farbniederschlag in den Zellkernen, dem Zytoplasma, den Zellfortsätzen sowie im Neuropil gekennzeichnet, der sich histologisch in der gleichen Ebene wie das zu untersuchende Gewebe befand und weder in der Negativkontrolle der Immunfluoreszenz noch in den Mock-behandelten Tieren vorhanden war (Abb. 32 und Abb. 33).

Abb. 32: Nachweis von BoDV-1-N im olfaktorischen Epithel nach 21 dpi mittels Immunhistologie



Olfaktorisches Epithel einer BoDV-1-infizierten Ratte, 21 dpi; Nachweis von BoDV-1-N (braun), Balken: 50 μ m

Abb. 33: Nachweis von BoDV-1-N im Gehirn nach 21 dpi mittels Immunhistologie

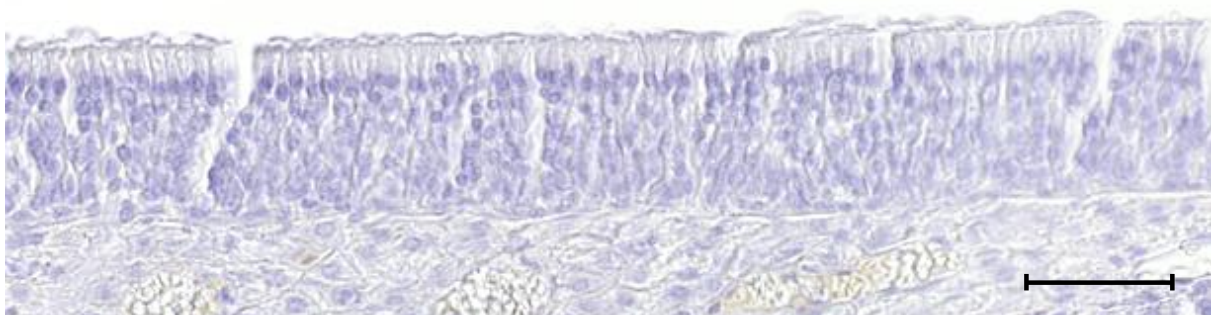


Cortex cerebri einer BoDV-1-infizierten Ratte, 21 dpi; Nachweis von BoDV-1-N (braun), Balken: 200 μ m

4.3.3.1 Statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung zum Nachweis von BoDV-1-N und vergleichende Infektionskinetik des olfaktorischen Epithels

BoDV-1-N fand sich **14** sowie **21 Tage** nach der Infektion in beiden Gruppen, den BoDV-1-infizierten und zusätzlich mit dem Inhibitor MI-0701-behandelten infizierten Tieren, als nukleäres und häufig zusätzlich zytoplasmatisches, braunes, fleckiges bis diffuses Signal in olfaktorischen Neuronen, in Basalzellen, in Stützzellen, in olfaktorischen Hüllzellen (OEC) sowie in Nervenfasern. Zu keinem Zeitpunkt waren spezifische Signale in den Gruppen mit Mock-Infektion zu finden (Abb. 34).

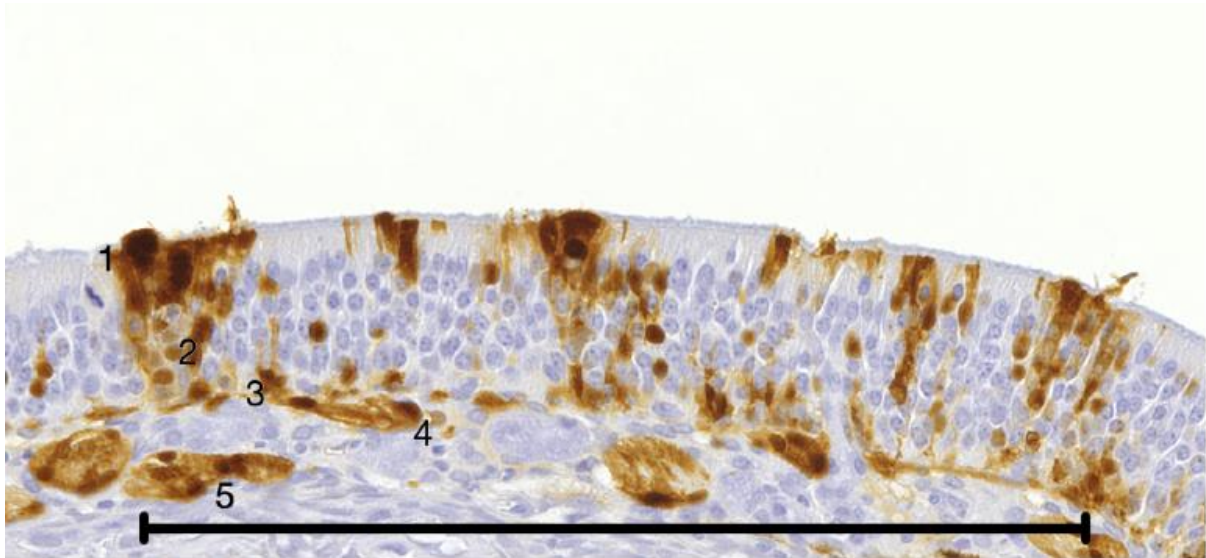
Abb. 34: Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N im olfaktorischen Epithel nach 21 dpi (Mock-Infektion)



Olfaktorisches Epithel einer Mock-infizierten Ratte, 21 dpi, Nachweis von BoDV-1-N (kein spezifisches Signal), Balken 50 µm

Von allen Versuchstieren konnte ausreichend Gewebe gewonnen werden, um zwanzig 250 µm lange Abschnitte des olfaktorischen Epithels zu analysieren. Es konnten speziell auch die unterschiedlichen Zelltypen des olfaktorischen Epithels untersucht werden (siehe Abb. 35).

Abb. 35: Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N im olfaktorischen Epithel nach 21 dpi



Olfaktorisches Epithel einer BoDV-1-infizierten Ratte, 21 dpi, Bildbeschriftung: 1: Stützzellen; 2: olfaktorische Neurone; 3: Basalzellen; 4: olfaktorische Hüllzellen (OEC); 5: Nervenfasern; Balken: 250 µm

Bei der Untersuchung der unterschiedlichen Abschnitte der Nase (Abb. 13) ergab sich, dass die Lokalisationen D-G jene mit dem höchsten Anteil an olfaktorischem Epithel waren. Aus diesem Grund wurden die Lokalisationen für die folgenden Auswertungen herangezogen. Die Rohdaten finden sich in Tab. 19 (Anhang).

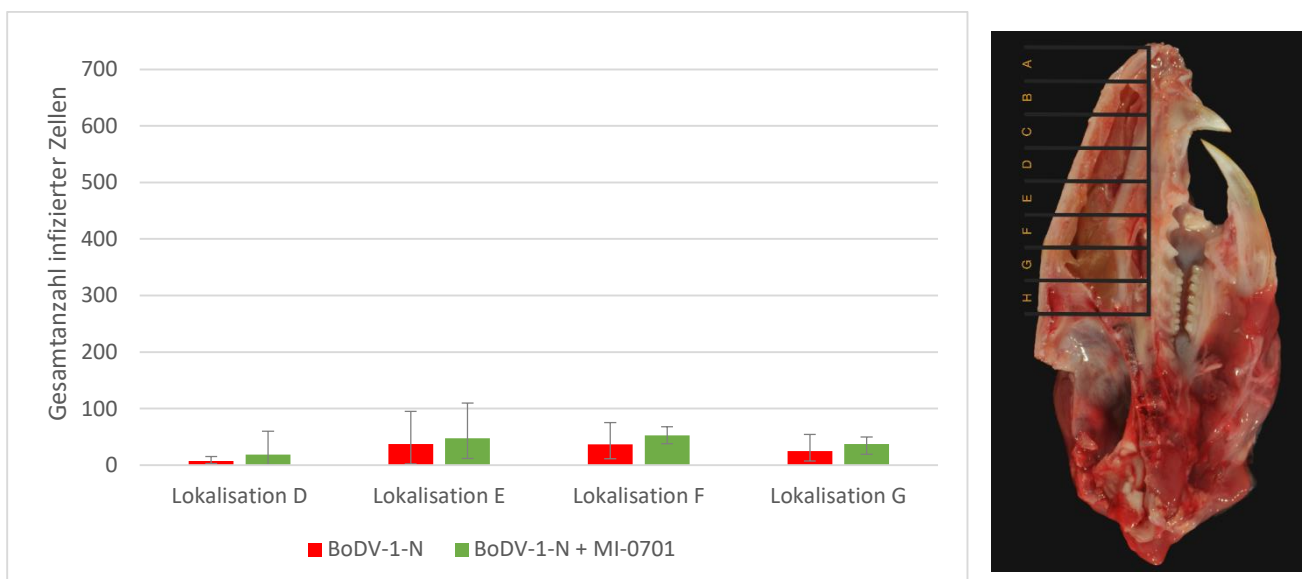
Zu beiden Untersuchungszeitpunkten war die Gesamtzahl BoDV-1-N-positiver Zellen in den Lokalisationen E und F stets höher als im Vergleich zu den Lokalisationen D und G. Einen Anstieg über die Zeit von 14 zu 21 dpi konnte in allen infizierten Gruppen verzeichnet werden. Unter Zuhilfenahme des parametrischen Wald-Tests konnte dabei ein **globaler**, statistisch signifikanter Haupteffekt in Bezug auf die Lokalisation in der Nase ($p < 0,00001$) sowie bezüglich der Zeit ($p = 0,00004$) festgestellt werden.

Die Behandlung der Tiere zeigte auf die globale Gesamtzahl positiver Zellen in der Nase keinen statistisch signifikanten Effekt. Mit $p = 0,22950$ war der Einfluss der Behandlung weder nach 14 noch nach 21 dpi statistisch signifikant. Die Gesamtzahl positiver Zellen veränderte sich global gesehen jedoch in den definierten Lokalisationen abhängig von der Behandlung und der Zeit. Signifikante Wechselwirkungen zwischen der Behandlung und der Lokalisation ($p = 0,00019$), sowie

der Zeit und der Lokalisation ($p=0,00991$) konnten nachgewiesen werden. Die Wechselwirkung zwischen Zeit und Behandlung konnte mit einem p-Wert von 0,05921 errechnet werden und war somit knapp nicht signifikant.

Die Untersuchung der Gesamtzahl positiver Zellen zeigte in der rostralsten Lokalisation D nach **14 Tagen** durchschnittlich 7,5 positive Zellen in der Gruppe der infizierten Tiere und 18,4 bei den Tieren, welche zudem mit dem Inhibitor behandelt wurden. In Lokalisation E waren zum gleichen Zeitpunkt 37,4 bzw. 47,6 infizierte Zellen nachweisbar. Die kaudaler gelegene Lokalisation F zeigte im Mittel 36,6 infizierte Zellen in der Gruppe der BoDV-1-infizierten Tiere und 52,4 bei jenen nach zusätzlicher Inhibitor-Applikation. In Lokalisation G, als kaudalstem Anteil der Untersuchung des olfaktorischen Epithels, waren in der Gruppe der infizierten Tiere durchschnittlich 24,6 und 37,25 infizierte Zellen in der Gruppe, welche zudem mit dem Inhibitor behandelt wurde. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 36 dargestellt.

Abb. 36: Gesamtanzahl der infizierten Zellen 14 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 in der Nase (Lokalisation D-G)

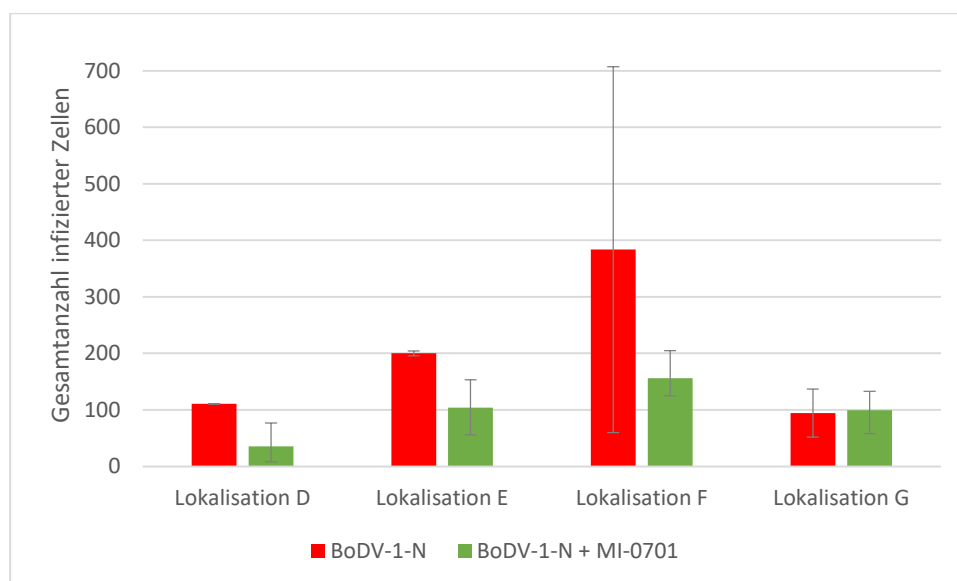


x-Achse: definierte Lokalisationen der Nase (D-G); y-Achse: Gesamtanzahl infizierter Zellen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert, Zuordnung der Lokalisationen mittels schematischer Darstellung (Abb. 13)

Nach **14 Tagen** zeigten sich stets mehr positive Zellen in den Lokalisationen E und F als in den beiden übrigen Lokalisationen (D, G). Unter Zuhilfenahme des parametrischen Wald-Tests konnte dazu ein statistisch signifikanter Haupteffekt in Bezug auf die Lokalisation in der Nase festgestellt werden ($p < 0,00001$). Ein deutlicher Unterschied zwischen der infizierten und der zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Gruppe war nicht zu sehen. Der Haupteffekt bezüglich der Behandlung war mit einem p-Wert von 0,26609 statistisch nicht signifikant, ebenso die Wechselwirkung zwischen den beiden Faktoren ($p = 0,24781$).

21 Tage nach der Infektion konnten in der Gruppe der infizierten Tiere in Lokalisation D im Durchschnitt 111 positive Zellen detektiert werden, hingegen in der infizierten und Inhibitor-behandelten Gruppe 35,7. Die kaudaler gelegene Lokalisation E zeigte durchschnittlich 200 infizierte Zellen in der Gruppe der BoDV-1-infizierten Tiere und 104,2 bei jenen nach zusätzlicher Inhibitor-Applikation. In Lokalisation F waren zum gleichen Zeitpunkt 383,5 zu 155,8 infizierte Zellen zu verzeichnen. In der kaudalsten Lokalisation G zeigten sich in der Infektionsgruppe im Mittel 94,5, in der zusätzlich Inhibitor-behandelten Gruppe 99,6 positive Zellen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 37.

Abb. 37: Gesamtanzahl der infizierten Zellen 21 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 in der Nase (Lokalisation D-G)

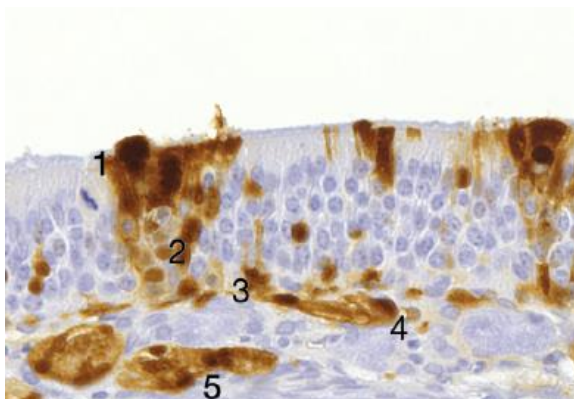


x-Achse: definierte Lokalisationen der Nase (siehe Abb. 13); y-Achse: Gesamtanzahl infizierter Zellen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Im Mittel waren bei additiver Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 nach 21 Tagen in nahezu allen untersuchten Lokalisationen deutlich weniger Zellen BoDV-1-infiziert als nach der Infektion alleine. Für die Lokalisation D konnte eine Reduktion der im Mittel detektierten positiven Zellen um 67,9 %, in Lokalisation E um 48 % und in Lokalisation F um 59 % festgestellt werden. Der Mittelwert der positiven Zellen war für die Lokalisation G in beiden Gruppen statistisch gesehen nahezu identisch.

Eine detaillierte morphologische und immunhistologische Untersuchung der Stützzellen, olfaktorischen Neurone, Basalzellen, Nervenfasern und olfaktorischen Hüllzellen sollte den Einfluss des Inhibitors bei der BoDV-1-Infektion auf die unterschiedlichen Zelltypen des olfaktorischen Epithels charakterisieren.

Abb. 38: Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N in diversen Zelltypen des olfaktorischen Epithels nach 21 dpi



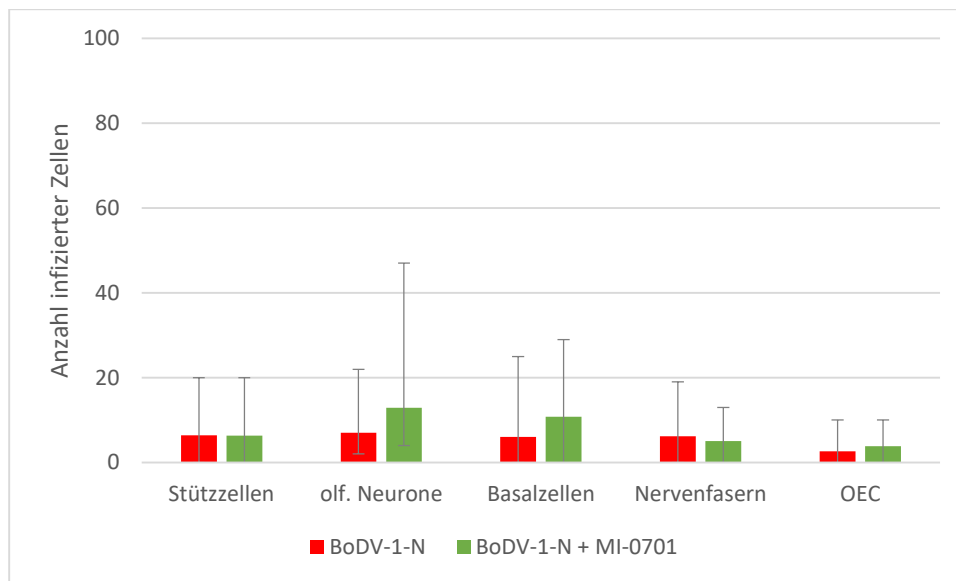
Olfaktorisches Epithel einer BoDV-1-infizierten Ratte, 21 dpi, Bildbeschriftung: 1: Stützzellen; 2: olfaktorische Neurone; 3: Basalzellen; 4: olfaktorische Hüllzellen (OEC); 5: Nervenfasern

Die Anzahl der positiven Zellen stieg für alle untersuchten Zelltypen in allen infizierten Gruppen über die Zeit an. Im Wald-Test ergab sich in der **globalen** Betrachtung der Daten eine statistische Signifikanz bezüglich des Haupteffekts Zeit ($p=0,00002$) und bezüglich der Lokalisation ($p<0,00001$). Dagegen zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen den Zelltypen untereinander oder den Zellen der BoDV-1-infizierten und zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Tiere ($p=0,24810$). Der Anstieg der positiven Zellen veränderte sich über die Zeit abhängig vom untersuchten Zelltypen. Statistisch signifikante Wechselwirkungen waren zwischen dem Faktor Zeit

und Zelltyp ($p=0,04046$) und zwischen dem Faktor Behandlung und der Lokalisation ($p=0,00566$) nachweisbar. Global gesehen zeigte die zusätzliche Behandlung der Tiere mit dem Inhibitor keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der unterschiedlichen positiven Zellen, verglichen mit den nur BoDV-1-infizierten Tieren. Signifikante Wechselwirkungen zwischen dem Faktor Zeit und der Lokalisation ($p=0,20461$), zwischen dem Faktor Behandlung und Zelltyp ($p=0,12709$) und zwischen dem Faktor Zelltyp und der Lokalisation ($p=0,59173$) waren nicht darstellbar. Abhängig von der untersuchten Zellart konnte im Vergleich der Untersuchungszeitpunkte teils eine Verminderung der positiven Zellen aufgezeigt werden. Die Wechselwirkung zwischen Zeit und Behandlung konnte mit einem p-Wert von 0,05209 errechnet werden und war somit knapp nicht signifikant.

14 Tage nach der Infektion mit BoDV-1 konnten im Durchschnitt 6,4 positive Stützzellen, 7,0 positive olfaktorische Neurone, 6,0 positive Basalzellen, 6,2 positive Nervenfasern und 2,6 positive olfaktorische Hüllzellen nachgewiesen werden. Zum gleichen Zeitpunkt wurden im olfaktorischen Epithel der zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Tiere im Mittel 6,3 positive Stützzellen, 12,9 positive olfaktorische Neurone, 10,8 positive Basalzellen, 5,0 positive Nervenfasern und 3,8 positive olfaktorische Hüllzellen detektiert. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 39 dargestellt.

Abb. 39: Anzahl der infizierten Zellen 14 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Zelltypen



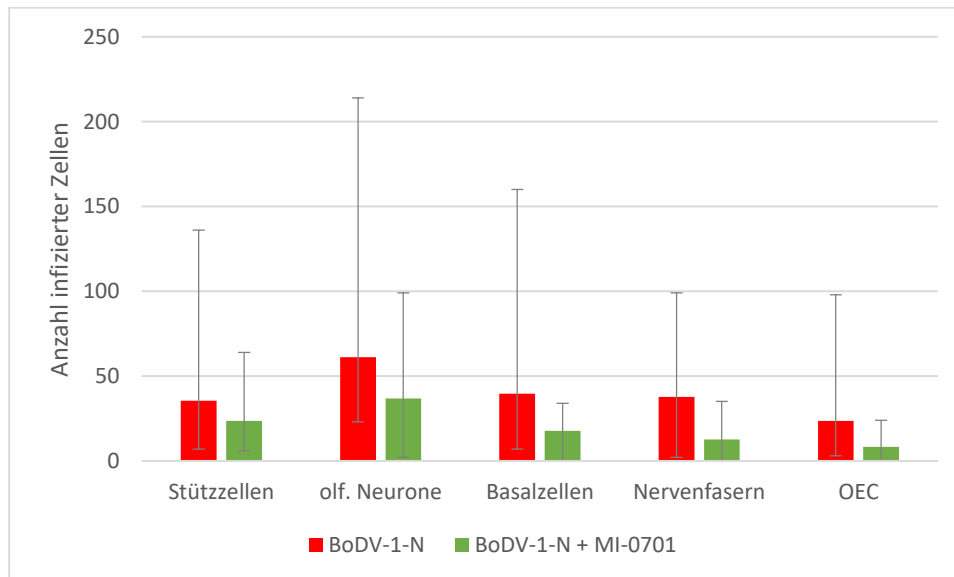
x-Achse: Zelltypen: Stützzellen (1), olfaktorische Neurone (2), Basalzellen (3), Nervenfasern (4), OEC/olfaktorische Hüllzellen (5); y-Achse: Anzahl infizierter Zellen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Nach **14 Tagen** zeigten sich in keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe der BoDV-1-infizierten und zusätzlich Inhibitor-behandelten Tiere in der Anzahl der BoDV-1-N-positiven Zellen bei den untersuchten Zelltypen. Im Mittel waren in beiden Gruppen mehr positive olfaktorische Neurone und Basalzellen zu finden als Stützzellen, Nervenfasern sowie OECs. Die Haupteffekte bezüglich Behandlung ($p=0,45672$) und Zelltyp ($p=0,53975$) zeigten keinen signifikanten Einfluss. Statistisch signifikante Wechselwirkungen zwischen der Behandlung und dem Zelltyp ($p=0,1619$), der Behandlung und der Lokalisation ($p=0,7701$) und zwischen dem Zelltyp und der Lokalisation ($p=0,70916$) konnten nicht nachgewiesen werden.

Nach **21 Tagen** waren es in der Infektionsgruppe 35,4 positive Stützzellen, 61,1 positive olfaktorische Neurone, 39,5 positive Basalzellen, 37,6 positive Nervenfasern und 23,6 positive OECs. In der Gruppe, welche zusätzlich zu der Infektion mit dem Inhibitor behandelt wurde, waren zur gleichen Zeit 23,6 positive Stützzellen, 36,8 positive olfaktorische Neurone, 17,7 positive Basalzellen, 12,6 positive Nervenfasern

und 8,2 positive olfaktorische Hüllzellen nachzuweisen. Eine graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 40.

Abb. 40: Anzahl der infizierten Zellen 21 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Zelltypen



x-Achse: Zelltypen: Stützzellen (1), olfaktorische Neurone (2), Basalzellen (3), Nervenfasern (4), OEC/olfaktorische Hüllzellen (5); y-Achse: Anzahl infizierter Zellen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

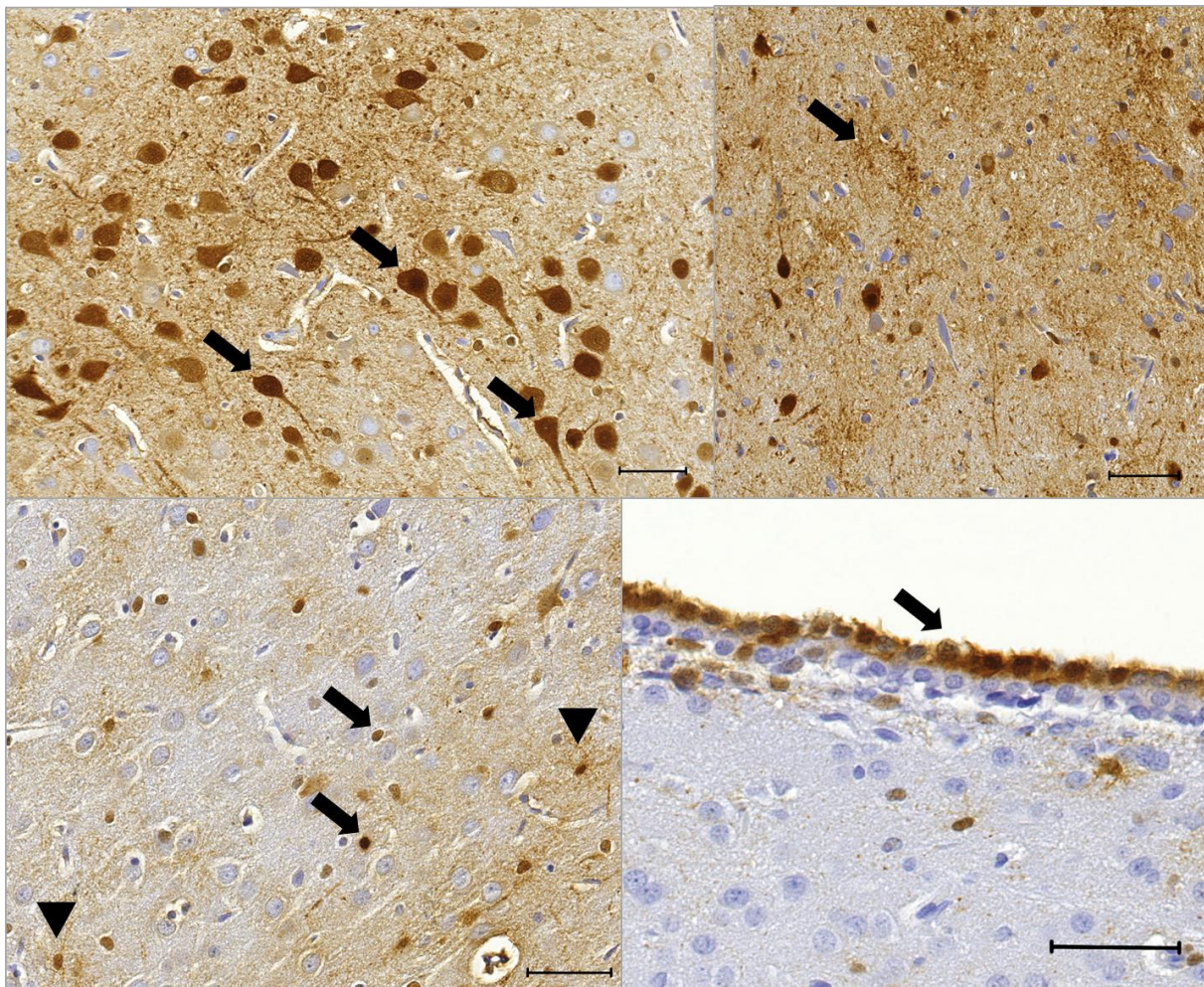
Im Durchschnitt waren bei additiver Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 nach 21 Tagen in allen untersuchten Lokalisationen deutlich weniger Zellen Bo18-positiv als nach BoDV-1-Infektion alleine. Für die Stützzellen konnte eine Reduktion der detektierten positiven Zellen um 33,3 %, für die olfaktorischen Neurone um 39,8 % und für die Basalzellen um 55,3 % festgestellt werden. Der Mittelwert der positiven Nervenfasern war um 66,6 % reduziert, der der olfaktorischen Hüllzellen um 65,4 %.

4.3.3.2 Statistische Auswertung der immunhistologischen Untersuchung zum Nachweis von BoDV-1-N und vergleichende Infektionskinetik des Gehirns

Sowohl **14** als auch **21** Tage nach der Infektion konnte BoDV-1-N als nukleäres und zytoplasmatisches Signal detektiert werden. Dabei stellte sich die nukleäre Reaktion

meist als granuläre bis grobschollige Anfärbung, die zytoplasmatische Reaktion eher als diffuse Anfärbung dar (Abb. 41). Zusätzlich konnte im Gehirn das Virusantigen auch im Neuropil als feingranuläres Signal wahrgenommen werden. Diese Reaktionsmuster konnten in der Gruppe der infizierten und der zusätzlich Inhibitor-behandelten Tiere in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, dem Neuropil sowie in Ependymzellen beobachtet werden. Zu keinem Zeitpunkt waren spezifische Signale in den Gruppen mit Mock-Infektion zu finden.

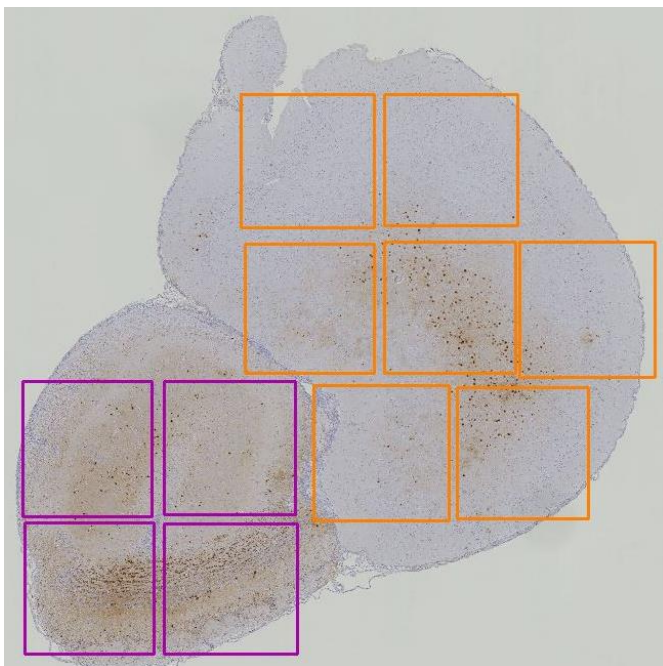
Abb. 41: Nachweis von BoDV-1-N mittels Immunhistologie im Gehirn nach intranasaler Infektion (21 dpi)



Nachweis von BoDV-1-N in unterschiedlichen Geweben des Gehirns 21 Tage nach der intranasalen BoDV-1-Infektion: 1: Ependymzellen (Pfeil), 2: Oligodendrozyten (Pfeil) und Astrozyten (Pfeilspitze), 3: Neurone (Pfeil), 4: Neuropil (Pfeil); Balken: 50 µm

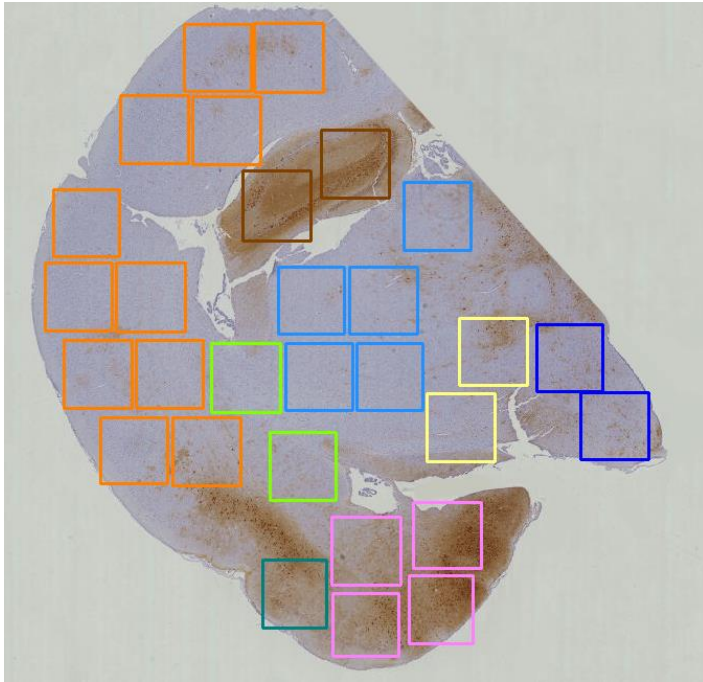
Die Gehirnschnitte zum Nachweis von BoDV-1-N aller Tiere wurden digitalisiert und anschließend unter Zuhilfenahme spezieller Software manuell - wie unter 3.3.3.2.2 beschrieben - ausgewertet. Dazu wurden die Gewebe zunächst digital kartiert (Beispiele siehe Abb. 42 und Abb. 43) und anschließend unter Verwendung eines Score-Systems entsprechend definierter anatomischer Strukturen (siehe 3.3.3.2.2) semiquantitativ ausgewertet. Die Rohdaten finden sich in Tab. 20 (Anhang).

Abb. 42: Kartierung am Beispiel der Lokalisation II des Gehirns (nach Abb. 12) eines BoDV-1-infizierten Tieres nach 21 dpi



Orange: Cortex cerebri, lila: Bulbus olfactorius; Kasten: 1 mm²

Abb. 43: Kartierung am Beispiel der Lokalisation IV des Gehirns (nach Abb. 12) eines BoDV-1-infizierten Tieres nach 21 dpi

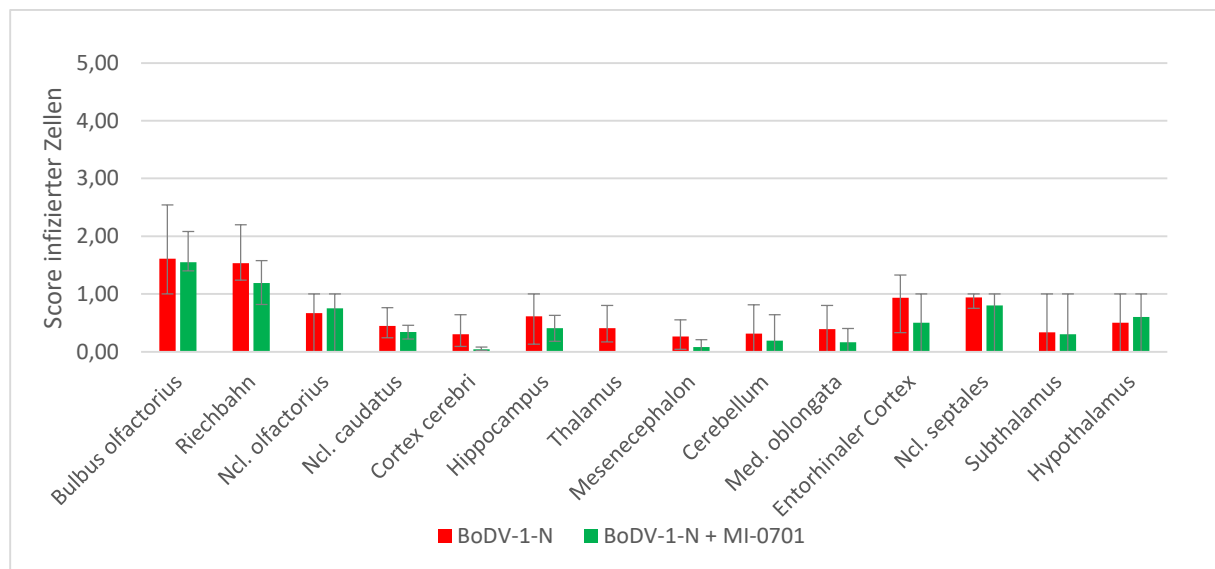


Orange: Cortex cerebri, braun: Hippocampus; hellblau: Thalamus; gelb: Subthalamus; grün: Nucleus caudatus/Putamen; dunkelblau: Hypothalamus; rosa: Riechbahn; türkis: Cortex entorhinalis; Kasten: 1 mm²

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten war der gemittelte Score aller positiven Zellen in der Gruppe der infizierten und zusätzlich mit dem Inhibitor behandelten Tiere stets geringer als jener der Vergleichsgruppe. Der Effekt war zudem von der untersuchten anatomischen Struktur abhängig. Unter Zuhilfenahme des parametrischen Wald-Tests konnte ein **globaler** statistisch signifikanter Haupteffekt in Bezug auf die Zeit ($p < 0,0001$), auf die Behandlung ($p < 0,0001$) und auf die anatomische Struktur ($p < 0,0001$) festgestellt werden. Der mittlere Infektionsscore veränderte sich in den definierten Lokalisationen abhängig von der Behandlung sowie der Zeit. Es waren statistisch signifikante Wechselwirkungen zwischen dem Faktor Zeit und Behandlung ($p < 0,0001$), zwischen dem Faktor Zeit und der anatomischen Struktur ($p < 0,0001$) und zwischen dem Faktor Behandlung und der anatomischen Struktur ($p = 0,0210$) vorhanden.

Nach **14 Tagen** lag in der Infektionsgruppe der durchschnittliche Infektionsscore bei 1,61 im Bereich des Bulbus olfactorius, bei 1,53 in der Riechbahn, bei 0,67 im Nucleus olfactorius, bei 0,45 im Bereich des Nucleus caudatus/dem Putamen, bei 0,30 im Cortex cerebri, bei 0,61 im Hippocampus, bei 0,41 im Thalamus, bei 0,26 im Mesencephalon, bei 0,32 im Cerebellum, bei 0,39 in der Medulla oblongata, bei 0,93 im Cortex entorhinalis, bei 0,94 in den Nuclei septales, bei 0,33 im Subthalamus und bei 0,5 im Hypothalamus. Bei den Tieren, welche mit dem Inhibitor MI-0701 behandelt wurden, zeigte sich im Mittel ein Score von 1,55 im Bulbus olfactorius, von 1,19 in der Riechbahn, von 0,75 im Nucleus olfactorius, von 0,34 im Nucleus caudatus/dem Putamen, von 0,04 im Cortex cerebri, von 0,41 im Hippocampus, von 0,0 im Thalamus, von 0,08 im Mesencephalon, von 0,19 im Cerebellum, von 0,17 in der Medulla oblongata, von 0,5 im Cortex entorhinalis, von 0,8 in den Nuclei septales, von 0,3 im Subthalamus und von 0,6 im Hypothalamus. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 44 dargestellt.

Abb. 44: Score der infizierten Zellen 14 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701



x-Achse: anatomische Strukturen; y-Achse: Score infizierter Zellen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

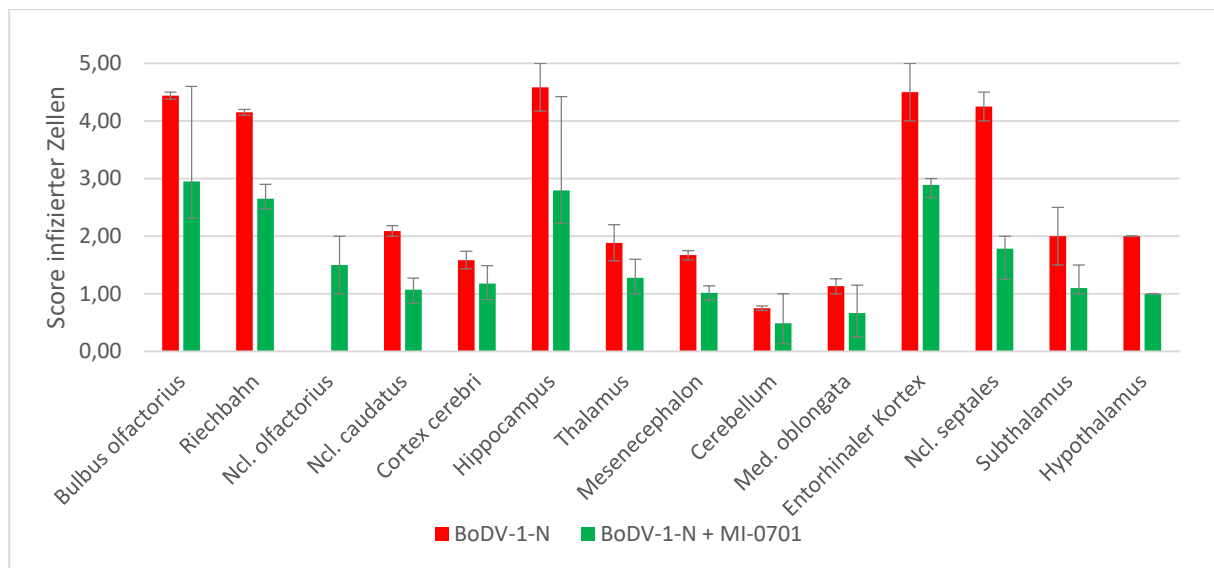
Nach 14 Tagen zeigten sich lokalisationsabhängig unterschiedliche Infektionsscores. Während der über die Tiere einer Gruppe gemittelte Infektionsscore des Bulbus

olfactorius und der Riechbahn in allen Gruppen stets über 1 lag, konnte für Strukturen wie den Cortex cerebri, das Cerebellum und die Medulla oblongata ein Score unter 0,5 ermittelt werden. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und parametrischem Wald-Test konnte nach 14 Tagen ein statistisch signifikanter Haupteffekt bezüglich der anatomischen Struktur ($p < 0,0001$) festgestellt werden. Die unterschiedliche Behandlung der infizierten sowie der zusätzlich Inhibitor-behandelten Gruppe zeigte keine statistisch signifikanten Differenzen im Infektionsscore zu diesem Zeitpunkt. In Bezug auf den Haupteffekt Behandlung ($p = 0,2032$) sowie die Wechselwirkung zwischen dem Faktor anatomischer Struktur und dem Faktor Behandlung ($p = 0,7382$) war keine Signifikanz nachweisbar.

Im Durchschnitt war jedoch bei additiver Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 nach 14 Tagen im Trend in nahezu allen untersuchten Strukturen ein geringerer mittlerer Infektionsscore als nach BoDV-1-Infektion alleine zu verzeichnen. Für den Thalamus konnte eine Reduktion um 100 %, für den Cortex cerebri und das Mesencephalon um 86 bzw. 69 % und für die Medulla oblongata um 56 % festgestellt werden. Der gemittelte Infektionsscore war zudem für den Cortex entorhinalis um 46 % reduziert, der des Cerebellums um 40 %.

21 Tage nach der Infektion konnte bei den BoDV-1-infizierten Versuchstieren im Durchschnitt ein Score von 4,44 im Bulbus olfactorius, von 4,15 in der Riechbahn, von 2,09 im Nucleus caudatus/im Putamen, von 1,59 im Cortex cerebri, von 4,59 im Hippocampus, von 1,89 im Thalamus, von 1,67 im Mesencephalon, von 0,75 im Cerebellum, von 1,13 in der Medulla oblongata, von 4,5 im Cortex entorhinalis, von 4,25 in den Nuclei septales, von 2,0 im Subthalamus und von 2,0 in Hypothalamus festgestellt werden. In der Gruppe mit Inhibitor-Applikation war ein durchschnittlicher Score im Bulbus olfactorius von 2,95, in der Riechbahn von 2,65, im Nucleus olfactorius von 1,5, im Nucleus caudatus/im Putamen von 1,07, im Cortex cerebri von 1,18, im Hippocampus von 2,80, im Thalamus von 1,28, im Mesencephalon von 1,02, im Cerebellum von 0,49, in der Medulla oblongata von 0,67, im Cortex entorhinalis von 2,89, in den Nuclei septales von 1,78, im Subthalamus von 1,1 und im Hypothalamus von 1,0 zu verzeichnen. Eine graphische Darstellung der Daten findet sich in Abb. 45.

Abb. 45: Score der infizierten Zellen 21 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701



x-Achse: anatomische Strukturen; y-Achse: Score infizierter Zellen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

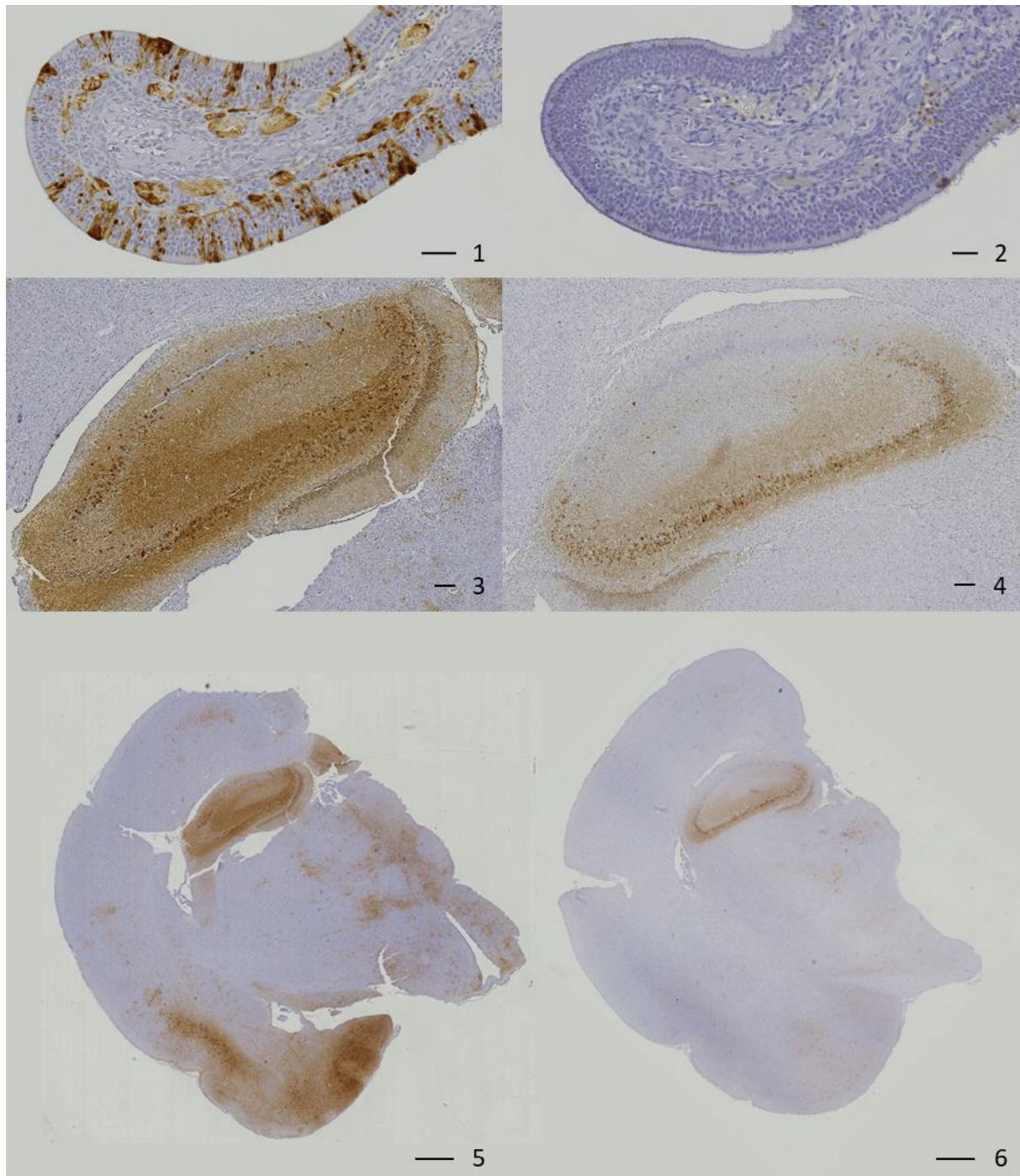
Nach 21 Tagen konnte in der Gruppe, welche nach BoDV-1-Infektion zusätzlich mit dem Inhibitor behandelt wurde, stets ein geringerer Infektionsscore festgestellt werden als in der Vergleichsgruppe. Zudem zeigten der Hippocampus, der entorhinale Cortex, der Bulbus olfactorius, die Nuclei septales und die Riechbahn in beiden Gruppen den höchsten mittleren Score, während für das Cerebellum und die Medulla oblongata in beiden Gruppen die niedrigsten Scores ermittelt wurden. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und parametrischem Wald-Test konnte dabei ein statistisch signifikanter Haupteffekt in Bezug auf die Behandlung ($p < 0,0001$) sowie in Bezug auf die anatomische Struktur ($p < 0,0001$) festgestellt werden. Der Effekt der Behandlung war dabei abhängig von der anatomischen Struktur (Abb. 45). Statistisch war dazu eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Faktor Behandlung und der anatomischen Struktur ($p < 0,0001$) darstellbar.

Im Durchschnitt war bei additiver Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 nach 21 Tagen in allen untersuchten Strukturen ein deutlich geringerer mittlerer Infektionsscore als nach der BoDV-1-Infektion alleine zu verzeichnen. Für die Nuclei septales konnte eine Reduktion um 58 %, für den Hypothalamus um 50 %, für den

Nucleus caudatus/das Putamen um 49 % und für den Subthalamus um 45 % festgestellt werden. Der gemittelte Infektionsscore war zudem für die Medulla oblongata um 41 % reduziert, der des Hippocampus um 39 %.

Eine exemplarische Gegenüberstellung des immunhistologischen Nachweises von BoDV-1-N in ausgewählten Gehirnlokalisationen von BoDV-1-infizierten und zusätzlich MI-0701-behandelten Tieren nach 21 dpi findet sich in Abb. 46.

Abb. 46: Gegenüberstellung ausgewählter Gehirnlokalisationen von BoDV-1-infzierten und zusätzlich MI-0701-behandelten Tieren nach 21 dpi mittels immunhistologischem Nachweis von BoDV-1-N



Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N in ausgewählten Gehirnlokalisationen nach 21 dpi: Olfaktorisches Epithel (1, 2; Balken: 50 μ m), Hippocampus (3, 4; Balken: 100 μ m) und Lokalisation VI (5, 6; Balken: 1000 μ m); nach der BoDV-1-Infektion (1, 3, 5) und zusätzlicher Inhibitor-Applikation (2, 4, 6)

4.3.4 Nachweis viraler genomischer RNA und viraler messenger RNA in der Nase und im Gehirn der Versuchstiere

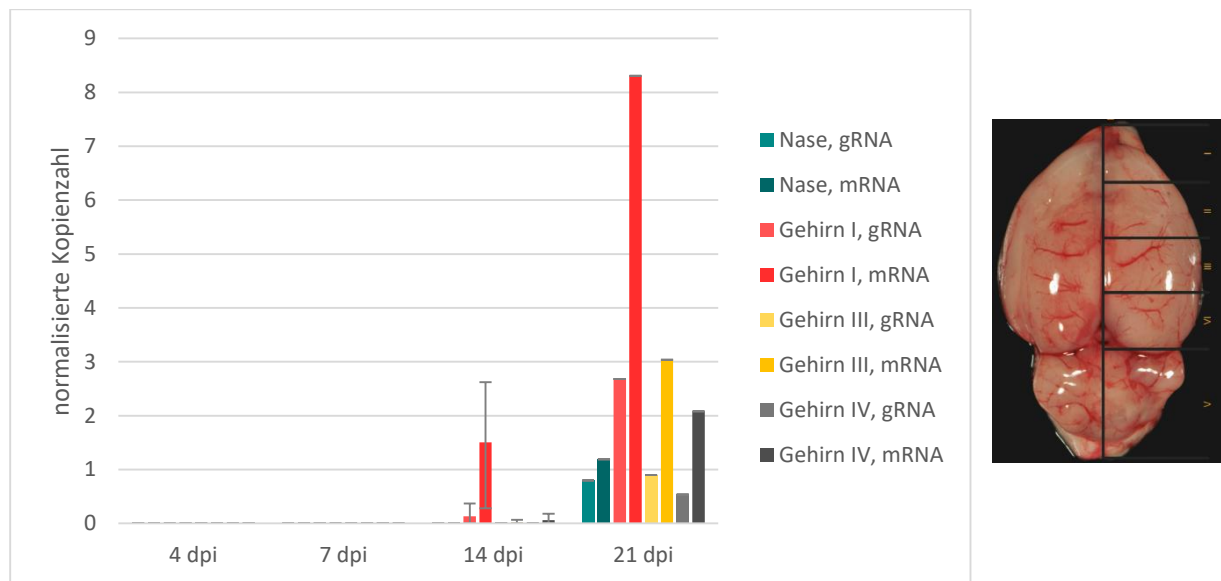
Die Gewebeproben der Nase und des zentralen Nervensystems (Lokalisationen I, III und IV; siehe Abb. 11) wurden nach 14 sowie 21 dpi auf das Vorhandensein viraler genomischer und viraler messenger RNA mittels real time RT-PCR untersucht.

Dabei konnte für die eingesetzten Positivkontrollen (Standardverdünnungsreihen) in sämtlichen Untersuchungen stets BoDV-1-N-spezifische cDNA nachgewiesen werden, hingegen in den als NTC mitgeführten Ansätzen zu keinem untersuchten Zeitpunkt. Auch in den als Negativkontrollen verwendeten Proben der nicht-infizierten und Mock-infizierten Tiere konnte in den Untersuchungen kein derartiges Signal detektiert werden. In allen Proben war zu jedem Zeitpunkt GAPDH-spezifische cDNA nachweisbar, ausgenommen in den als NTC mitgeführten Proben. Die Rohdaten finden sich in Tab. 21 (Anhang).

4.3.4.1 Kinetik des Nachweises von BoDV-1-N-spezifischer mRNA und gRNA in der Nase und im Gehirn

Vier Tage nach alleiniger BoDV-1-Infektion konnte keine BoDV-1-N-spezifische mRNA oder gRNA in den Proben der Nase und des Gehirns nachgewiesen werden. Auch nach **sieben Tagen** war keine derartige, spezifische RNA nachweisbar. **14 Tage** nach der Infektion waren in den Nasen der rein BoDV-1-infizierten Versuchstiere keine Kopien für BoDV-1-N-spezifische mRNA und gRNA zu detektieren. Im kranialsten Abschnitt I des Gehirns (G-I) (siehe Abb. 11) konnten zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt 0,1 normalisierte Kopien BoDV-1-N-spezifischer gRNA und 1,5 Kopien mRNA ermittelt werden. In den Abschnitten III und IV (G-III und G-IV) hingegen konnte keine virale gRNA und <0,1 Kopien mRNA nachgewiesen werden. Nach **21 Tagen** waren in der Nase durchschnittlich 0,8 Kopien gRNA und 1,2 Kopien mRNA nachweisbar. Im Gehirn konnten zum gleichen Zeitpunkt in Abschnitt I 2,7 normalisierte Kopien gRNA und 8,3 Kopien mRNA, in Abschnitt III 0,9 Kopien gRNA und 3,0 Kopien mRNA und in Abschnitt IV 0,5 normalisierte Kopien gRNA und 2,1 Kopien mRNA nachgewiesen werden. Eine graphische Darstellung der Daten findet sich in Abb. 47.

Abb. 47: Kinetik des Nachweises von BoDV-1-N-spezifischer gRNA und mRNA in der Nase und im Gehirn



x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: normalisierte Kopienzahl der BoDV-1-N-spezifischen gRNA und mRNA; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert; Zuordnung der Lokalisationen mittels schematischer Darstellung Abb. 11

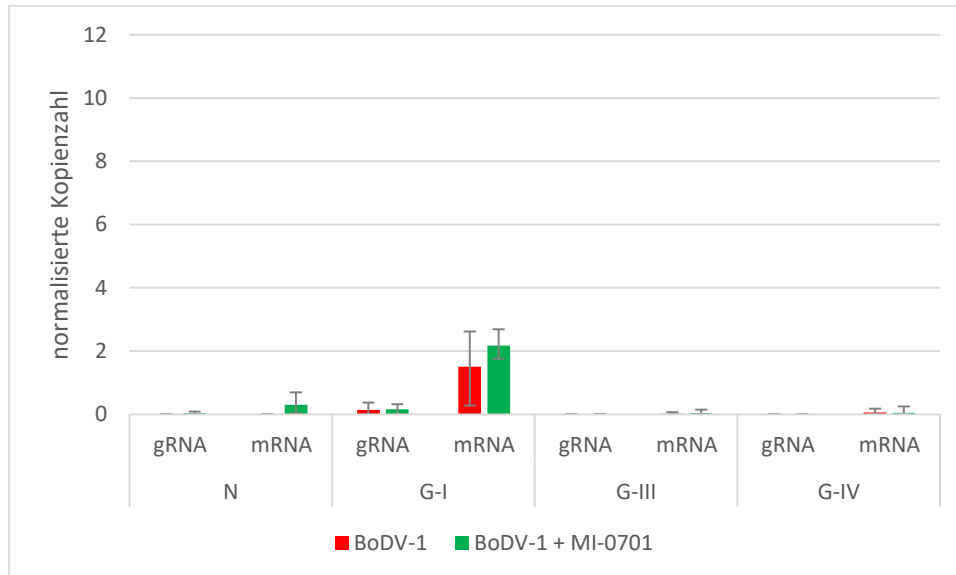
Die normalisierte Kopienzahl der BoDV-1-N-spezifischen gRNA und mRNA zeigte bei den BoDV-1-infizierten Tieren in allen Lokalisationen einen stetigen Anstieg über die Zeit. Zur statistischen Untersuchung wurden der exakte Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman sowie der zugehörige P-Wert ermittelt. Dabei war der Zusammenhang bezüglich der Zeit statistisch signifikant (siehe Tab. 22). Die normalisierte Kopienzahl der BoDV-1-N-spezifischen gRNA und mRNA nach 14 dpi war dabei abhängig von der untersuchten Lokalisation im Gehirn, der höchste Wert war in Abschnitt I (G-I) zu verzeichnen. Mittels exaktem Friedman-Test konnte dafür ein statistisch signifikanter Zusammenhang, getrennt nach der viralen gRNA ($p=0,0156$) und viralen mRNA ($p=0,0013$), herausgestellt werden.

4.3.4.2 Nachweis von BoDV-1-N-spezifischer mRNA und gRNA in der Nase und im Gehirn nach Inhibitor-Applikation

14 Tage nach der Infektion fanden sich in der Gruppe der Inhibitor-behandelten Tiere im Durchschnitt 0,04 Kopien viraler gRNA und 0,3 Kopien viraler mRNA in der Nase, 0,2 normalisierte Kopien gRNA und 2,2 Kopien mRNA in der Lokalisation G-I und keine Kopien viraler gRNA in den Lokalisationen G-III und G-IV. Dafür im Mittel 0,03 Kopien

mRNA in G-III und 0,05 Kopien mRNA in G-IV. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 48 dargestellt.

Abb. 48: Vergleichende Infektionskinetik 14 Tage nach intranasaler BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Lokalisation (Nase und Gehirn)

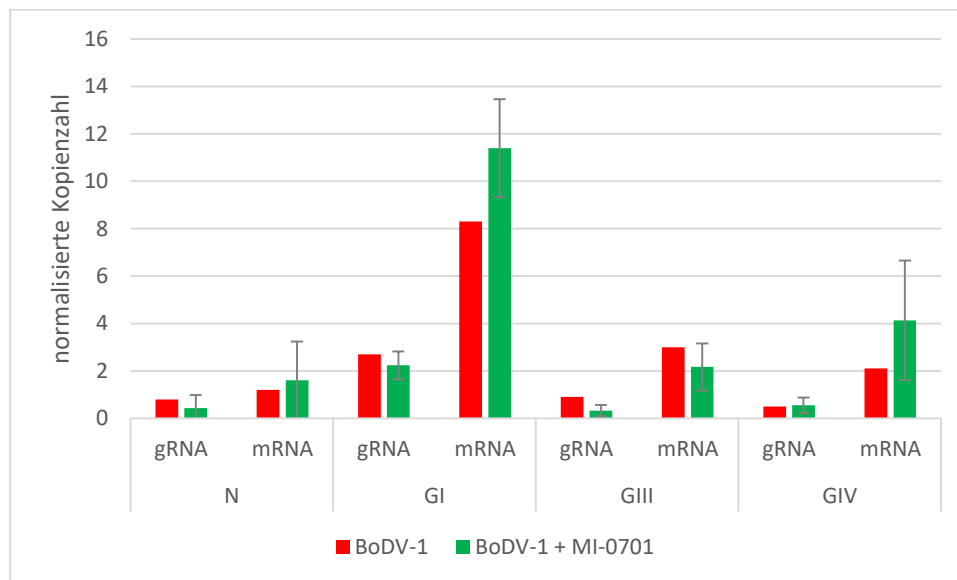


x-Achse: untersuchte Lokalisationen [Nase (N), Gehirnlokalisationen (G-I, -III und -IV)];
y-Achse: normalisierte Kopienzahl der BoDV-1-N-spezifischen viralen gRNA und viralen mRNA; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

Die Anzahl der normalisierten Kopien war stets abhängig von der untersuchten Lokalisation, wobei in der Gehirnlokalisation I (G-I) die meisten Kopien viraler gRNA und mRNA detektiert wurden. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse konnte sowohl für die Anzahl normalisierter Kopien der gRNA ($p=0,0002$) als auch der mRNA ($p<0,00001$) ein statistisch signifikanter Haupteffekt bezüglich der Lokalisation herausgestellt werden. Nach 14 dpi zeigte sich kein Einfluss der Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 auf die Anzahl der normalisierten Kopien der gRNA und mRNA in den untersuchten Lokalisationen. Mit $p=0,4400$ für die gRNA und $p=0,0959$ für die mRNA war der Gruppeneffekt der Behandlung nicht statistisch signifikant. Auch die Wechselwirkung der beiden Faktoren erbrachte kein signifikantes Ergebnis (gRNA: $p=0,8985$; mRNA: $p=0,2037$).

Nach **21 Tagen** waren in der Gruppe der BoDV-1-infizierten und zusätzlich Inhibitor-behandelten Tiere im Mittel 0,4 normalisierte Kopien gRNA und 1,9 Kopien mRNA in der Nase nachweisbar. Im Abschnitt G-I des Gehirns waren es 2,2 Kopien gRNA und 11,4 Kopien mRNA, im Abschnitt G-III 0,3 Kopien viraler gRNA und 1,9 Kopien viraler mRNA, wohingegen es in G-IV durchschnittlich 0,6 normalisierte Kopien gRNA und 5,0 Kopien mRNA waren. Die vergleichenden Ergebnisse sind graphisch in Abb. 49 dargestellt.

Abb. 49: Vergleichende Infektionskinetik 21 Tage nach intranasaler BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Lokalisation (Nase und Gehirn)



x-Achse: untersuchte Lokalisationen [Nase (N), Gehirnlokalisationen (G)I, III und IV];
y-Achse: normalisierte Kopienzahl der BoDV-1-N-spezifischen viralen gRNA und viralen mRNA; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

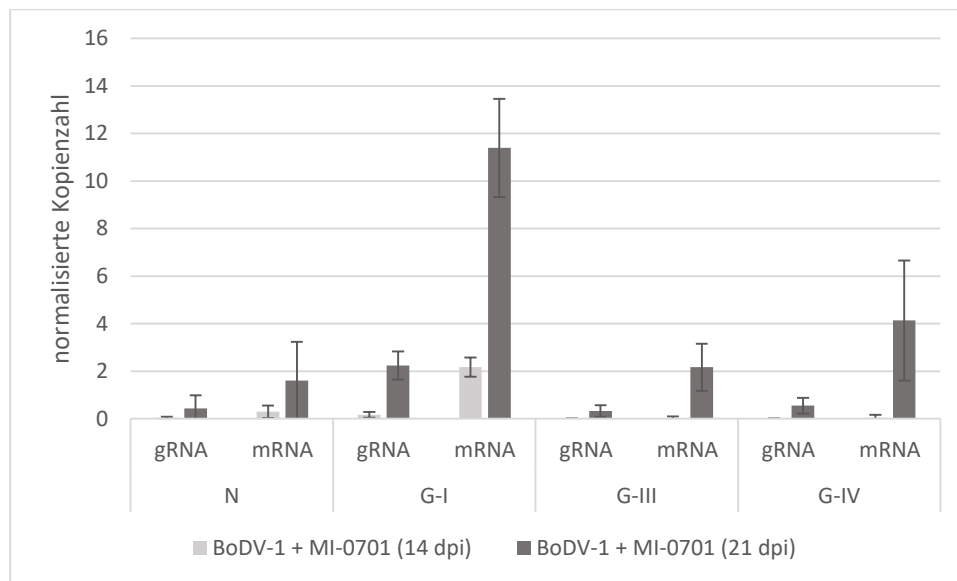
Für die Lokalisationen N, G-I und G-III konnte in der Versuchsgruppe der MI-0701-behandelten Tiere im Vergleich zur reinen Infektionsgruppe eine Reduktion um bis zu 63 % der normalisierten Kopienzahl von BoDV-1-N-spezifischer **gRNA** gefunden werden, die Lokalisation G-IV zeigte eine annähernd gleichbleibende Anzahl normalisierter Kopien. Für die normalisierte Kopienzahl der BoDV-1-N-spezifischen **mRNA** war abgesehen von der Lokalisation G-III (27,8 %) keine Reduktion nachzuweisen. Vielmehr war in den Lokalisationen N, G-I und G-IV eine vergleichsweise höhere Anzahl von Kopien zu finden als in der reinen

Infektionsgruppe. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ($n=1$) war eine umfassende statistische Analyse nicht möglich.

Global betrachtet war die Anzahl der normalisierten Kopienzahlen der viralen gRNA und der viralen mRNA auch abhängig von der Lokalisation. In den untersuchten Gruppen waren unabhängig von der Behandlung und der Zeit p.i. in der Gehirnlokalisation G-I stets die höchsten Werte zu detektieren. Mittels exaktem Friedman-Test ergaben sich dabei statistisch signifikante Abhängigkeiten beim Vergleich der Lokalisationen innerhalb der Untergruppen (siehe Tab. 23).

In der Gruppe der zusätzlich zur BoDV-1-Infektion **mit dem Inhibitor MI-0701 behandelten Tiere** zeigten sich in allen untersuchten Lokalisationen nach 21 dpi immer mehr normalisierte Kopienzahlen für die virale gRNA und die virale mRNA als nach 14 dpi. Dabei war die konkrete Anzahl abhängig von der untersuchten Lokalisation. In Gehirnlokalisation I waren die höchsten Werte der normalisierten Kopienzahlen zu detektieren. Bei den vergleichenden Untersuchungen konnte dabei mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ein statistisch signifikanter Haupteffekt in Bezug auf die Zeit (gRNA: $p=0,0015$; mRNA: $p<0,00001$) und die Lokalisation (gRNA: $p<0,00001$; mRNA: $p<0,00001$) herausgestellt werden. Zusätzlich ergaben sich signifikante Wechselwirkungen zwischen den beiden Faktoren (gRNA: $p<0,00001$; mRNA: $p<0,00001$). Eine graphische Darstellung findet sich in Abb. 50.

Abb. 50: Vergleichende Infektionskinetik 14 und 21 Tage nach intranasaler BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Lokalisation (Nase und Gehirn)



x-Achse: untersuchte Lokalisationen [Nase (N), Gehirnlokalisationen (G-I, -III und -IV)];
y-Achse: normalisierte Kopienzahl der BoDV-1-N-spezifischen viralen gRNA und viralen mRNA; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

4.4 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ZUM NACHWEIS DES ZELLTODS BEI EXPERIMENTELL INTRANASAL BODV-1- UND MOCK-INFIZIERTEN LEWIS-RATTEN

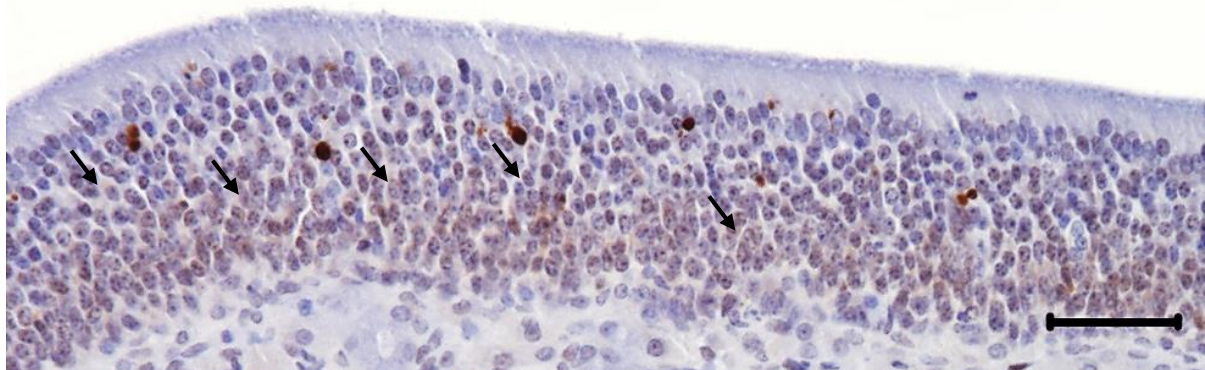
Mittels immunhistologischer Untersuchungen sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der BoDV-1-Infektion und bestimmter Zelltodformen im olfaktorischen Epithel charakterisiert werden. Dazu wurden Abschnitte des olfaktorischen Epithels experimentell BoDV-1-infizierter sowie Mock-infizierter Ratten zu den Untersuchungszeitpunkten 3 hpi, 1 dpi, 2 dpi, 4 dpi, 7 dpi, 14 und 21 dpi beziehungsweise 2 dpi, 4 dpi und 7 dpi immunhistologisch auf die Expression von Caspase 3 sowie AIF untersucht.

4.4.1 Immunhistologischer Nachweis von aktivierter Caspase 3 und AIF

Als positives Signal wurde für die Caspase 3 ein braunes, meist feingranuläres Präzipitat im Zellkern und im Zytoplasma der Zellen gewertet, welches in einer Ebene

mit dem Gewebeschnitt lag und nicht in der Negativkontrolle der Immunhistochemie zu detektieren war (Abb. 51). Für AIF wurde ein entsprechender Farbniederschlag im Zellkern als positives Signal gewertet. Die Rohdaten finden sich in Tab. 24 (Anhang).

Abb. 51: Immunhistologischer Nachweis von Caspase 3 im olfaktorischen Epithel, 14 dpi

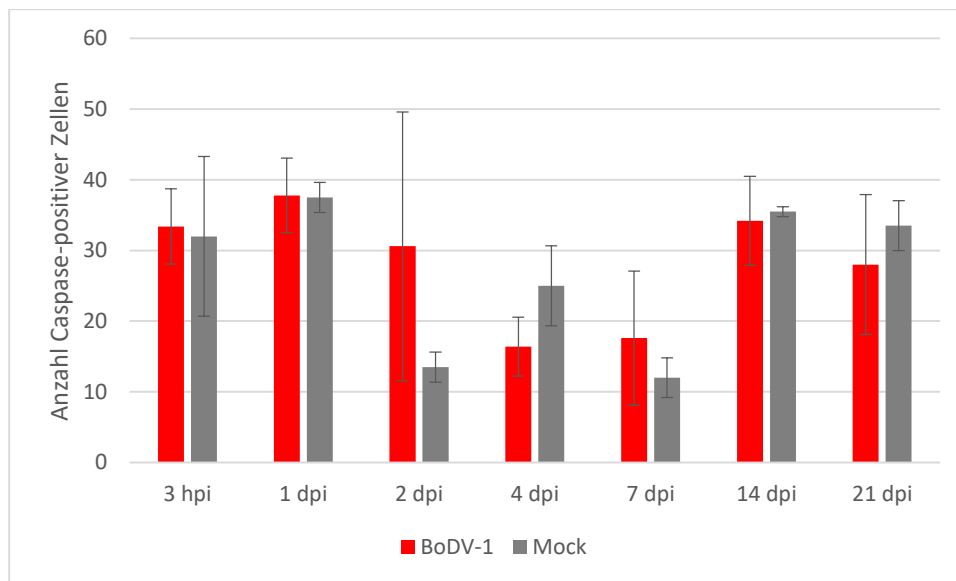


Olfaktorisches Epithel: intranukleäres, braunes Signal (Pfeile); Balken: 25 µm

4.4.1.1 Statistische Auswertung und vergleichende Zelltodrate in BoDV-1- und Mock-infizierten Tieren

3 Stunden nach der Infektion konnten im Mittel 33 Caspase-positive Zellen bei den BoDV-1-infizierten Tieren gefunden werden, bei den Mock-infizierten Kontrolltieren hingegen 32. Nach **einem Tag** waren in beiden Gruppen im Durchschnitt 38 positive Zellen zu detektieren. An **Tag zwei** nach der Infektion zeigten sich durchschnittlich 31 Zellen der infizierten Tiere und 14 Zellen der Mock-infizierten Tiere positiv. **Vier Tage** nach der Infektion konnte im Mittel in 16 Zellen der infizierten Tiere ein positives Signal nachgewiesen werden, hingegen etwa 25 positive Zellen bei den Mock-infizierten Tieren. Nach **sieben Tagen** waren 18 positive Zellen in der Gruppe der infizierten Tiere und 12 positive Zellen bei den Mock-infizierten Tieren zu finden. An **Tag 14** nach der Infektion zeigten 34 Zellen im olfaktorischen Epithel infizierter Ratten ein positives Signal, hingegen 36 Zellen der Mock-infizierten Tiere. Zum Untersuchungszeitpunkt nach **21 Tagen** konnten durchschnittlich 28 positive Zellen bei BoDV-1-infizierten Tieren gezählt werden, dagegen 34 bei den Kontrolltieren. Die Ergebnisse sind graphisch in Abb. 52 dargestellt.

Abb. 52: Anzahl der Caspase-positiven Zellen des olfaktorischen Epithels nach BoDV-1-Infektion



x-Achse: Zeit nach der Infektion; y-Achse: Anzahl der Caspase-positiven Zellen in 20 definierten Gewebestrecken (je 250 µm); hpi: *hours post infection*; dpi: *days post infection*; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: Standardabweichung

Die Anzahl der Caspase-positiven Zellen war abhängig vom Untersuchungszeitpunkt, während ein Tag nach der Infektion die höchsten Werte ermittelt wurden, zeigte sich nach vier und sieben Tagen eine geringe Anzahl positiver Zellen. Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse konnte eine statistische Signifikanz in Bezug auf den Zeiteffekt ($p=0,0009$) herausgestellt werden. Dabei war die Anzahl der positiven Zellen nicht davon abhängig, ob die Tiere BoDV-1 infiziert oder Mock-behandelt wurden. Der Gruppeneffekt der Behandlung ($p=0,6613$) sowie die Wechselwirkung zwischen den Faktoren ($0,3253$) waren statistisch nicht signifikant.

Zu keinem Zeitpunkt war in den beiden Gruppen ein positives Signal für das AIF-Antigen im olfaktorischen Epithel der Tiere zu detektieren.

5 DISKUSSION

Das Borna disease virus 1 (BoDV-1) verursacht typischerweise eine tödliche neurologische Erkrankung bei Pferden und Schafen (NARAYAN *et al.*, 1983b). Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass es bei Menschen mit und ohne Organtransplantation eine tödliche Enzephalitis verursachen kann. Die durch metagenomische Analysen detektierten Sequenzen der vor allem aus Süddeutschland stammenden Patienten zeigten dabei deutliche Homologien zu den bekannten equinen Virussequenzen. BoDV-1-Sequenzinformationen und epidemiologische Analysen zeigten, dass höchstwahrscheinlich eine *spill-over*-Übertragung aus dem lokalen Wildtierreservoir erfolgt (RUBBENSTROTH *et al.*, 2018b; SCHLOTTAU *et al.*, 2018; CORAS *et al.*, 2019; LIESCHE *et al.*, 2019; NILLER *et al.*, 2020). Trotz jahrzehntelanger Forschung ist der Hauptweg der natürlichen Infektion weiter nicht genau bekannt. Es wird angenommen, dass das BoDV-1, wie experimentell bewiesen, über den Riechweg in das ZNS eintritt (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988; KUPKE *et al.*, 2019). Eine intranasale Infektion mit psittaciformen Bornaviren war in experimentellen Studien jedoch nicht erfolgreich (HECKMANN *et al.*, 2017) und es ist immer noch nicht bekannt, wie sich Menschen mit dem BoDV-1 oder dem VSBV-1 infizieren (HOFFMANN *et al.*, 2015; SCHLOTTAU *et al.*, 2018).

Dem olfaktorischen System kommt in unserer Zeit nicht nur aufgrund seiner herausragenden physiologischen Funktionen wie Orientierung, Nahrungserkennung und Kommunikation (MASON, 1959; CHEAL, SPROTT, 1971; MORRIS, UDRY, 1978) eine besondere Wichtigkeit zu. Es ist zudem eine bedeutende Eintrittspforte des tierischen sowie menschlichen Organismus bei der Infektion mit zahlreichen pathogenen Erregern (DOTY, 2008; DE CHIARA *et al.*, 2012; HEMACHUDHA *et al.*, 2013; VAN RIEL *et al.*, 2015). Eine detaillierte Kenntnis der frühen intranasalen Phase der Infektion mit neurotrophen Viren und über die empfänglichen Zelltypen ist eine wesentliche Voraussetzung, um wirksame antivirale prophylaktische und therapeutische Maßnahmen entwickeln zu können. Die infizierten Zelltypen, die das BoDV-1 für eine erfolgreiche Replikation und Verbreitung benötigt, und die Rolle von olfaktorischen Hüllzellen (OECs) sind bisher weitestgehend unklar. Die Daten von KUPKE *et al.* (2019) weisen auf eine besondere Rolle der olfaktorischen Neurone bei der initialen Virusinfektion hin, olfaktorische Hüllzellen scheinen unter anderem durch

ihren engen Kontakt zu den Nervenfasern einen positiven Effekt auf die Weiterleitung ins ZNS zu haben.

Auch die ubiquitär im Körper vorkommende Proproteinkonvertase Furin hat in diesem Zusammenhang neben diversen physiologischen Funktionen, wie der Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Enzymen eine pathophysiologische Bedeutung, indem sie unter anderem an der Aktivierung bakterieller sowie viraler Pathogenitätsfaktoren beteiligt ist (THOMAS, 2002; BONTEMPS *et al.*, 2007; PASQUATO *et al.*, 2013; COUTURE *et al.*, 2015). Das auch in der Nase vorkommende, extrazelluläre und membrangebundene Furin der Wirtszelle prozessiert und aktiviert diese Faktoren. Eine Inhibition dieser Endoprotease hat bereits in diversen Untersuchungen mit reversibel bindende Peptidmimetika *in-vitro* und *in-vivo* unter anderem auch bei Infektionen mit Viren der Ordnung *Mononegavirales* zu einer beträchtlichen Reduktion der Infektionsrate geführt, (VON MESSLING *et al.*, 2004; BAYER, 2010; LABITZKE, 2011; HARDES *et al.*, 2015; KEHR, 2016; LENNARTZ *et al.*, 2016).

Ein Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der initialen Vermehrung des BoDV-1 sowie der initial infizierten Zellen. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf den die Nervenfasern umhüllenden *olfactory ensheathing cells* (OEC) liegen. Zudem wurde der Einfluss des Furininhibitors MI-0701 auf die intranasale Infektion der Ratte mit dem Borna disease virus 1 untersucht. Daten aus vorangegangenen *in-vitro*-Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf das zentrale Nervensystem (KEHR, 2016; LENNARTZ *et al.*, 2016), solche zu Untersuchungen am olfaktorischen System sind nicht vorhanden. *In-vivo*-Untersuchungen mit dem Inhibitor an BoDV-1-infizierten Tieren wurden bislang nicht durchgeführt. Weiterhin war es Ziel der Arbeit, die Rolle der olfaktorischen Hüllzellen bei der Infektion mit dem BoDV-1 genauer zu charakterisieren - vorherige Untersuchungen ließen eine zentrale Bedeutung bei der Pathogenese der Bornaschen Krankheit vermuten (HARRIS *et al.*, 2009; KUPKE, 2016; KUPKE *et al.*, 2019).

Zudem wurden antivirale Interventionsstrategien getestet, die eine erfolgreiche Virusausbreitung in das Gehirn verhindern sollen. Es wurde getestet, ob eine

intranasale Virusausbreitung durch Hemmung der Spaltung des für die virale Ausbreitung notwendigen biologisch aktiven viralen Glykoproteins möglich ist. Das Promotionsvorhaben leistet somit einen essentiellen Beitrag zum Verständnis der initialen Phasen intranasaler Infektionen mit neurotrophen Viren und möglicher antiviraler Therapieansätze bislang unzulänglich behandelbarer neurotroper Virusinfektionen.

5.1 WIRKUNG DES FURININHIBITORS MI-0701 AUF DIE BODV-1-INFEKTION *IN-VITRO*

Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels

Es ist bekannt, dass der Einsatz des peptidomimetischen Inhibitors MI-0701 in mit Geflügelpestviren infizierten Zellkulturen abhängig von der Dosis eine Senkung der Viruslast um bis zu 100 % erwirken konnte (GARTEN *et al.*, 1994; BECKER, 2011). Weiterhin war auch ein signifikant reduzierter Virus-Titer bei Versuchen an Zellkulturen zu verzeichnen, welche zuvor mit dem kaninen Staupevirus infiziert wurden (HARDES *et al.*, 2015). Obgleich die Verbindung MI-1148 mit 5,5 pM einen niedrigeren K_i -Wert und damit eine höhere Substratspezifität aufweist, wurde aufgrund der schädlichen Wirkung dieser Verbindung in *in-vivo*-Untersuchungen (IVANOVA, 2017; IVANOVA *et al.*, 2017) das Derivat MI-0701 als reversibel bindendes Peptidmimetikum in der vorliegenden Arbeit gewählt.

Die **Ratte** gilt in der experimentellen Infektionsforschung als zuverlässiges Modelltier für die Infektion mit dem Borna disease virus 1 (LUDWIG *et al.*, 1973; HERZOG, ROTT, 1980; NARAYAN *et al.*, 1983a, b). In Anlehnung an die bisher bekannten und vielfach angenommenen Bedingungen der natürlichen Infektion wurde eine Kultur des **olfaktorischen Epithels** gewählt. Ziel war es, eine Zellkultur zu verwenden, welche die intranasale Infektion von adulten immunkompetenten Lewis-Ratten widerspiegelt (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988). Dabei wurde bewusst auf die Verwendung von „feeder layern“ verzichtet, die zum größten Teil aus Astrozyten oder anderen Gliazellen des Cortex cerebri bestehen, und laut Literatur die Lebensdauer der Zellen erhöhen können (LISCHKA *et al.*, 2018; SCHUTTE *et al.*, 2018), da

Gliazellen leicht mit BoDV-1 infiziert werden können (RICHT, STITZ, 1992; CARBONE *et al.*, 1993; LENNARTZ *et al.*, 2016) und so möglicherweise die Ergebnisse beeinflusst hätten. Nach geringfügiger Modifikation der Kulturpräparation konnte eine Infektionskinetik erstellt werden, welche bei effektiv erhöhter Zelldichte analoge Werte in Bezug auf die Zellzusammensetzung und Infektionsrate zu denen vorheriger Untersuchungen (KUPKE, 2016; KUPKE *et al.*, 2019) lieferte und somit als vergleichbar anzusehen ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei zusätzlicher Applikation des Inhibitors nach der Infektion eine dosisabhängige sowie zeitabhängige **Reduktion** der Infektionsrate - gemessen am Vorkommen von BoDV-1-N - nachgewiesen werden. Dabei kam es zu keinem Zeitpunkt zu einer sichtbaren Veränderung der zellulären Morphologie oder Dichte, welche eine derartige Reduktion hätte artifiziell bedingen können, auch nicht nach reiner Behandlung der Kulturen mit dem Inhibitor. Dies spricht für eine gute Verträglichkeit der Substanz und ist eine entscheidende Eigenschaft für den späteren Einsatz *in-vivo*. Während vier und sieben Tage nach der Infektion der Unterschied in Bezug auf den Anteil BoDV-1-infizierter Zellen zwischen den infizierten und Inhibitor-behandelten Kulturen nur klein war, zeigte sich nach **zehn Tagen** ein zum Teil deutlich geringerer prozentualer Anteil an infizierten Zellen. Dabei war die größte Reduktion der Infektionsrate (knapp **80 %**) nach einer Behandlung mit 10 μM zu verzeichnen, doch auch bei der Behandlung mit 1 μM lag die durchschnittliche Reduktion bei 50 %. Eine Reduktion der Infektionsrate war bei der Behandlung mit 0,1 μM MI-0701 nach zehn Tagen nicht zu verzeichnen, die Konzentration erscheint bei derartigem Versuchsaufbau keine ausreichende Hemmwirkung zu haben. Die wirksamste Konzentration in Hinblick auf eine Reduktion der Infektionsrate war in den durchgeführten Untersuchungen jene von **10 μM** , wobei es sogar innerhalb dieser Versuchsgruppe in Bezug auf die Zeit zu einer Reduktion der Infektionsrate unter den gemessenen Ausgangswert nach 4 dpi kam (4 dpi: 7 %; 10 dpi: 4,8 %). Der Einsatz höherer Konzentrationen (25 μM) führte in vorherigen Experimenten mit primären Zellkulturen zu einer deutlich verminderten Überlebensrate der verwendeten Zellen (HERDEN, persönliche Mitteilung) und wurde daher hier nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse der Inhibitorapplikation bei BoDV-1-infizierten Zellen des olfaktorischen Epithels bestärken die Annahme, dass es erst nach obligater Spaltung des viralen Glykoproteins durch Furin zur Infektion der umliegenden Wirtszelle kommt.

Die Furininhibition verhindert die Spaltung des Glykoproteins und somit den Viruseintritt sowie die Zellfusion und damit indirekt auch eine effiziente Virusausbreitung. Initial werden weniger Zellen durch das Virus infiziert und auch bei nachfolgender Replikation entsteht ein reziprok proportionaler Effekt, wodurch sich der positive Zeitfaktor erklären lässt. Das Ausbleiben einer Reduktion um 100 % kann seine Erklärung in einer unvollständigen Hemmung der Furinspaltung, bedingt durch eine ineffiziente Affinität der verwendeten Verbindung zu seinem Effektorenzym Furin, durch eine unterschiedliche Konzentration von Furin in den diversen Zellen des olfaktorischen Epithels sowie den zellspezifischen Ausbreitungsmechanismen des Virus haben oder auch durch eine nicht ausreichende Konzentration des Inhibitors erklärt werden (CLEMENTE, DE LA TORRE, 2007; LENNARTZ *et al.*, 2016). Zukünftige Untersuchungen sollen durch simultane Markierung mittels Immunfluoreszenz der unterschiedlichen Zelltypen sowie des BoDV-1-N einen Schluss über die genaue Art der infizierten Zellen des olfaktorischen Epithels - auch in der Zellkultur - zulassen.

Wie auch vorangehende Untersuchungen, die einen stetigen Anstieg des Anteils **olfaktorischer Neurone** korrespondierend zur Kulturdauer nachweisen (LIU *et al.*, 1998), zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen statistisch signifikanten Anstieg des Neuronenanteils in Bezug auf die fortschreitende Zeit in Kultur des olfaktorischen Epithels. Dabei ist immer zu beachten, dass eine globale Vergleichbarkeit von Daten dieser Art aufgrund teilweise erheblich abweichender Versuchsbedingungen schwierig ist. Da sich in den eigenen Untersuchungen die Gesamtzellzahl in Kultur nicht signifikant reduziert hat, kann davon ausgegangen werden, dass es *in-vitro* auch zu einer echten Vermehrung der Neurone gekommen ist. Eine mitotische Aktivität basaler Stammzellen mit anschließender Ausdifferenzierung zu adulten Neuronen in der Kultur erscheint dabei am wahrscheinlichsten (PIXLEY, 1992b).

Es fiel auf, dass in Kulturen, welche mit BoDV-1 infiziert wurden, konstant ein signifikant geringerer Anteil an Neuronen vorlag, verglichen mit der nicht-infizierten Kontrollgruppe. Der viralen Infektion kommt in diesem Kontext somit eine Rolle bei dem Erhalt und/oder der Vermehrung der olfaktorischen Neurone in Kultur zu. Um ihr Genom in der Wirtszelle zu replizieren und neue virale Teile zu generieren, bedürfen Viren bestimmter zellulärer Faktoren, welche typischerweise die infizierte Zelle zur

Verfügung stellt. Dabei ist die Störung der zellulären Mechanismen, die die Replikation der infizierten Wirtszelle kontrollieren, eine häufig von Viren genutzte Strategie (EMMETT *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2012). Zudem verwenden Viren unterschiedliche Mechanismen, um Kontrollpunkte des Zellzyklus zu deregulieren und die Wege der Zellproliferation zu modulieren. Eine Reihe von DNA- und RNA-Viren kodieren beispielsweise für Proteine, die auf kritische Zellzyklus-Regulatoren abzielen, um zelluläre Bedingungen zu schaffen, die für die Virusreplikation vorteilhaft sind (DAVY, DOORBAR, 2007; CHAURUSHIYA, WEITZMAN, 2009). Viele DNA-Viren veranlassen dafür ruhende Zellen, in den Zellzyklus einzutreten. Man nimmt an, dass dies die Anzahl von Nukleotiden erhöht und somit die Virusreplikation erleichtert. Im Gegensatz dazu können manche Viren die Zelle in einer bestimmten Phase des Zyklus arretieren, die für die virale Replikation günstig ist. Durch den Arrest des Zellzyklus kann der Zelltod infizierter Zellen gehemmt werden, die Zellen können sich der körpereigenen Immunantwort entziehen oder der Virusaufbau kann gefördert werden (DE BEECK, CAILLET-FAUQUET, 1997). Obwohl sie für den viralen Lebenszyklus von Nutzen sind, können virusvermittelte Veränderungen der Kontrollmechanismen des Zellzyklus nachteilige Auswirkungen auf die Zellphysiologie haben (BAGGA, BOUCHARD, 2014).

Im Falle des BoDV-1 kommt es bei experimentell infizierten, neonatalen Ratten zum Untergang von Neuronen im Hippocampus und im Cerebellum, dies führt zu den charakteristischen Verhaltensänderungen (WILLIAMS, LIPKIN, 2006). GONZALES-DUNIA *et al.* (2000) konnten weiterhin zeigen, dass es nach der Infektion zu einer progressiven und deutlichen Abnahme der Expression synaptischer Marker (growth-associated protein 43 und Synaptophysin) kommt, was auf einen signifikanten Verlust von kortikalen Neuronen hindeutet. Forschungen in den letzten Jahren haben mehrere Wechselwirkungen von BoDV-1 mit intrazellulären Signalwegen gezeigt, einschließlich der prototypischen Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade, des NF- κ B-Systems, der pleiotropen Proteinkinase C (PKC), des Tumorsuppressors p53 und des Typ I-Interferon (IFN)-Systems (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000; BOURTEELE *et al.*, 2005; PLANZ *et al.*, 2009; HERDEN *et al.*, 2013; TIZARD *et al.*, 2016; NOBACH *et al.*, 2020). Fortwährend, aber vor allem sieben Tage nach der Infektion, war auch in den eigenen Untersuchungen ein sichtlich reduzierter Neuronenanteil im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollkulturen zu verzeichnen, ein negativer Effekt der BoDV-1-

Infektion ist also anzunehmen. Während die Aktivierung des NF- κ B physiologischerweise eine antiapoptotische sowie antiinflammatorische und antivirale Wirkung hat, verhindert die Infektion mit BoDV-1 die Kerntranslokation und somit Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors und führt damit möglicherweise zu einem gesteigerten Zelluntergang. Die Dissoziationskultur des olfaktorischen Systems scheint dabei nach der Infektion einer besonderen Dynamik zu unterliegen, welche nach sieben Tagen unabhängig von der weiteren Behandlung einen in Relation zu den anderen Untersuchungszeitpunkten niedrigen Neuronenanteil aufzeigt, bevor dieser zum Zeitpunkt nach zehn Tagen wieder ansteigt. Grund für diesen relativ gesehen geringen Wert kann die initiale Infektion der basalen Stammzellen sein, welche basierend auf *in-vivo*-Untersuchungen auf den Zeitpunkt um sieben Tage nach der Infektion terminiert werden konnte (KUPKE, 2016). Die damit einhergehende reduzierte Vermehrung der Neuronen kann sich, wie in Abb. 17 dargestellt, in einem vorübergehenden Minimum des Neuronenanteils widerspiegeln. Mit fortschreitender Zeit und Infektion der übrigen Bestandteile des olfaktorischen Epithels (KUPKE, 2016) scheint die zuvor festgestellte Reduktion der olfaktorischen Neurone nicht mehr derart bedeutend, sodass letztlich sogar - relativ gesehen - ein erhöhter Anteil an der Gesamtzellzahl vernommen werden kann.

Hingegen war, korrelierend mit ansteigender Inhibitor-Dosierung, ein signifikant erhöhter Anteil an Neuronen im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe über die Zeit zu verzeichnen. Speziell nach zehn Tagen lag der Neuronenanteil deutlich über dem der infizierten (> 50 %) und sogar über dem der unbehandelten Kulturen (~35 %). Obwohl die Rolle von Furin unter pathologischen Bedingungen, wie viralen Infektionen, umstritten ist, hat sich herausgestellt, dass es speziell in Neuronen bei erfolgter Spaltung des proBDNF (BDNF: *Brain-derived neurotrophic factor*) durch die Wirkung einer Proproteinkonvertase wie Furin zum neuronalen Zelltod kommt (TENG *et al.*, 2005). Ein direkter zellschädigender neuronaler Effekt wird zudem diskutiert (YAMADA *et al.*, 2018). Die Inhibition von Furin kann sich somit per se zugunsten einer **Neuroprotektion** auswirken. Ein potentiell protektiver Effekt des Inhibitors MI-0701 in steigender Konzentration kann auch in den vorliegenden Untersuchungen für die beobachteten Unterschiede im Neuronenanteil verantwortlich sein. Bei zeitgleich vorliegender viraler Infektion, kann der Inhibitor durch eine zusätzliche Hemmung der zellulären Infektion (siehe oben) und konsekutiven Verminderung des neuronalen

Zelluntergangs zu einem erhöhten Neuronenanteil führen. Eine Inhibitor-Konzentration von 10 μM stellte sich als die wirksamste der getesteten dar, Konzentrationen von 0,1 μM hatten in den Untersuchungen keinen signifikanten Effekt auf die Erhöhung des Neuronenanteils im Vergleich zu den infizierten Kontrollen und lag stets unter den Werten der unbehandelten Kulturen.

Olfaktorische Hüllzellen (OEC)

Olfaktorische Hüllzellen begleiten die Axone der olfaktorischen Neurone auf ihrem Weg zum zentralen Nervensystem. Dabei ist bekannt, dass dieser einzigartigen Gliazellart bei diversen viralen Infektionen auch eine besonders wichtige Rolle hinsichtlich der Virusausbreitung zukommt und sie *in-vitro* insbesondere die Virusreplikation fördern kann (MORI *et al.*, 2002; HARBERTS *et al.*, 2011). Eine herausragende Eigenschaft dieser Zellen ist die Umhüllung olfaktorischer Axone im Bereich zwischen dem olfaktorischen Epithel und dem Bulbus olfactorius. Dabei entsteht ein geeigneter Reaktionsraum mit einem definierten Milieu für die initiale und kontinuierliche Übertragung viraler Partikel sowie Viren unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke, die OECs bieten so einen permanenten Zugang zum zentralen Nervensystem (VAN RIEL *et al.*, 2015). Dies konnte explizit für das humane Herpesvirus 6 gezeigt werden (HARBERTS *et al.*, 2011) und wird in ähnlicher Form auch für das Borna disease virus 1 angenommen. Vorherige Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass kanine olfaktorische Hüllzellen mit dem BoDV-1 infizierbar sind (KUPKE, 2016). OECs der Ratte hingegen wurden in Reinkultur bisher nicht für virale Infektionsversuche verwendet, speziell von einer erfolgreichen BoDV-1-Infektion war bisher nicht berichtet. In der vorliegenden Arbeit gelang erstmalig der Nachweis einer BoDV-1-Infektion der olfaktorischen Hüllzellen der Ratte. Das Reaktionsmuster in immunhistochemischen Untersuchungen zeigte ein zu anderen Zelltypen z. B. des olfaktorischen Epithels vergleichbares zytoplasmatisches sowie nukleäres Signal. Dies spricht für eine floride Infektion der Zelle. Bei Betrachtung des Anteils infizierter Zellen über die Zeit war stets ein Anstieg zu verzeichnen, so wie es für diverse andere Kultursysteme und eine BoDV-1-Infektion beschrieben ist. Sechs Tage nach der Infektion waren bereits durchschnittlich 17 % der Zellen infiziert, dies spricht für eine besonders effiziente Ausbreitung der Infektion in dieser Kultur. Die zuvor vermutete

besondere Rolle wird durch diese Beobachtung weiter gestärkt. Gegenstand weiterführender Untersuchungen sollte unter anderem die Rolle dieser Zellen in der chronischen Phase der Infektion sowie gegebenenfalls bei einer Viruspersistenz sein.

Bei Untersuchungen zum Einfluss der Beschichtung des Zellkultursystems konnte kein signifikanter vorteilhafter Effekt der zu Poly-L-Lysin additionalen Behandlung mit Laminin bezüglich des Zellwachstums, der Zellmorphologie und der Infektionsrate festgestellt werden. Entgegen der Empfehlungen der European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) zur Kultivierung dieser immortalisierten Zelllinie kann demnach auf eine zusätzliche Beschichtung verzichtet werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Inhibitoranwendung an den OECs zeigten eine signifikante Reduktion der Infektionsrate zu allen untersuchten Zeitpunkten. Dabei wurde eine Inhibitorkonzentration von 10 μ M gewählt, da diese sich aus den Versuchen der Dissoziationskultur am wirksamsten herausstellte. Die eindrucksvollste Differenz zeigte sich bei den OECs nach sechs Tagen (längste untersuchte Zeit in Kultur), hier waren in Inhibitor-behandelten Kulturen durchschnittlich 88 % weniger Zellen im Vergleich zu den Kontrollen infiziert. Eine derartige, bislang unvergleichbare Reduktion der Infektionsrate weist auf ein besonderes Ansprechen dieser Gliazellen in Hinblick auf den Einsatz des Furininhibitors bei BoDV-1-Infektionen hin. Sie können somit eine wichtige Zielzelle für die Metaphylaxe bei einer neurotrophen viralen Infektion, speziell der BoDV-1-Infektion, darstellen. In weiterführenden Studien sollte die Expression des Glykoproteins in dieser Zelllinie nach BoDV-1-Infektion und anschließender Inhibitor-Behandlung untersucht werden, um zu erforschen, ob der Effekt der Reduktion der Infektionsrate auf der inhibierten Glykoproteinspaltung oder auf einem bisher unbekannten Effekt beruht.

Um die Relevanz der OECs während der neurotrophen BoDV-1-Infektion zu untersuchen, wie sie beispielsweise für das humane Herpesvirus-6 postuliert wird (HARBERTS *et al.*, 2011), wurde die Replikation und Transkription von BoDV-1 in Kulturen des olfaktorischen Epithels und in Kulturen von OECs mittels RT-PCR verglichen. Zum Zeitpunkt vier Tage nach der Infektion, welcher ein frühes Infektionsstadium *in-vitro* darstellt, waren die normalisierten Kopienzahlen für die BoDV-1-N-spezifische gRNA und mRNA in den Hüllzellen signifikant höher als in den Zellen des olfaktorischen Epithels. Nach diesen Beobachtungen scheinen OECs

BoDV-1 vor allem zu **frühen Zeitpunkten** nach der Infektion effizient *in-vitro* zu replizieren, während in Untersuchungen von KUPKE (2016) *in-vivo* eine erste Infektion der Hüllzellen erst nach 14 Tagen p.i. nachzuweisen war. Nach 7 dpi nahmen in den eigenen Untersuchungen die normalisierten Kopienzahlen für BoDV-1-N spezifische gRNA und mRNA hingegen für die OECs ab und differierten zwischen den beiden Zellkultursystemen nicht mehr signifikant. Obwohl der Effekt nicht statistisch signifikant war, scheint eine etwas höhere Replikationsrate in den OECs im Vergleich zu den Zellen des OE zu bestehen, was ihre Fähigkeit zur effizienten Replikation von BoDV-1 unterstreicht. Das Vorkommen von viraler genomischer und messenger RNA im olfaktorischen Epithel deutet darauf hin, dass initial sowohl Replikation als auch Transkription in einem ähnlichen Maß stattfinden und virale RNA sowie Virusproteine und Enzyme in vergleichbarer Quantität hergestellt werden könnten. Zu einem späteren Zeitpunkt waren, wie bei einer floriden Infektion zu erwarten, deutlich mehr Kopien viraler messenger als genomischer RNA nachweisbar, wobei das Verhältnis zugunsten der Transkription ausfiel. Daraus kann geschlossen werden, dass im olfaktorischen Epithel mit fortschreitender Zeit und Infektionsdauer verhältnismäßig weniger Replikation und dafür mehr Transkription stattfindet. Die Transkriptionsrate war im olfaktorischen Epithel geringgradig höher als in den olfaktorischen Hüllzellen. Die absolute Kopienzahl der beiden untersuchten BoDV-1-RNAs stieg in beiden Kultursystemen von 4 auf 7 dpi. Da diese Zunahme auch für das *housekeeping gene* GAPDH festgestellt werden konnte, stiegen die normalisierten Kopien für das OE nur geringfügig und nahmen für die OECs ab. Diese Tendenz in Bezug auf GAPDH ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Zunahme an Zellen zwischen 4 und 7 dpi zurückzuführen, da gezeigt wurde, dass GAPDH als *housekeeping gene* für neuronale Zellen zuverlässig zur Normalisierung funktioniert und nicht durch die BoDV-1-Infektion beeinflusst wird (POROMBKA *et al.*, 2006; POROMBKA *et al.*, 2008a; POROMBKA *et al.*, 2008b).

Dies unterstreicht die Rolle der olfaktorischen Hüllzellen während der BoDV-1-Infektion und die Hypothese, dass sie in der **initialen** Infektionsphase die virale Replikation fördern, wie es bereits für das humane Herpesvirus-6 gezeigt wurde (HARBERTS *et al.*, 2011). Es bleibt zu diskutieren, ob die Zellen des olfaktorischen Epithels weitere unterschiedliche Präferenzen bei der Virusinfektion, der -replikation und der -transkription aufweisen und ob beispielsweise ein synergistischer Effekt

dieser die Gehirngängigkeit des Virus letztlich sogar begünstigt oder bedingt. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die OECs hier unter optimalen Bedingungen kultiviert wurden und sich die Infektion daher aufgrund der geringen Abstände zwischen den Zellen, wie sie für Zelllinien und andere Primärkulturen des ZNS üblich sind, durch Teilung der infizierten Zellen und durch Zell-zu-Zell-Kontakt leichter verbreiten als dies *in-vivo* anzunehmen ist (BAJRAMOVIC *et al.*, 2003; AHLEMEYER *et al.*, 2013; LENNARTZ *et al.*, 2016). Weiterführende Untersuchungen, z. B. unter Zuhilfenahme organotypischer Gewebeschnitte des olfaktorischen Epithels oder zellulärer Fluoreszenzmarkierungen, sind nötig.

In den eigenen Untersuchungen haben sich die verwendeten Kulturen als geeignete Systeme zur *in-vitro*-Analyse der viralen Infektion und zur Erforschung potentieller Effekte des eingesetzten Inhibitors herausgestellt. Im Sinne des 3R-Prinzips (RUSSELL, BURCH, 1959) lieferten die Experimente valide Daten, die biologische Komplexität des lebenden Organismus und die Interaktion mit der Umgebung und infektiösen Agentien erfordert jedoch die Untersuchung in geeigneten *in-vivo*-Systemen, denn viele Wechselwirkungen und Effekte lassen sich nur im Gesamtsystem erforschen. So ist die Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels sowie der Kulturen der olfaktorischen Hüllzellen beispielsweise dadurch eingeschränkt, dass eine Wirkung des Immunsystems nicht berücksichtigt werden kann. Organotypische olfaktorische Schnittkulturen können in weiteren Studien nützlich sein, um zelluläre und molekulare Mechanismen des peripheren olfaktorischen Systems umfassender zu untersuchen (GONG *et al.*, 1996; KANAKI *et al.*, 2000; MARKOPOULOS *et al.*, 2008).

5.2 WIRKUNG DES FURININHIBITORS MI-0701 AUF DIE BoDV-1-INFEKTION *IN-VIVO*

Während der Inhibitor MI-0701 zahlreiche unterschiedliche Anwendungen *in-vitro* gefunden hat, sind die Untersuchungen *in-vivo* bislang relativ begrenzt. Die wenigen *in-vivo*-Studien zielen dabei hauptsächlich auf die Verbesserung der Stabilität, der Affinität zum Zielsubstrat sowie der oralen Bioverfügbarkeit der Verbindung ab und

nicht auf die effektive Inhibition einer viralen oder bakteriellen Infektion. IVANOVA *et al.* (2017) zeigten in einer Toxizitätsstudie, dass eine intraperitoneale Applikation der strukturell ähnlichen Verbindung MI-1148 (4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Arginin-**Leucin**-Arginin-4-Aminobenzylamid, $K_i = 5,5 \text{ pM}$), welche sich *in-vitro* als nicht zytotoxisch erwies, in einer Dosierung von 2,5 mg/kg Körpergewicht von adulten Mäusen toleriert wurde, wohingegen 75 % der Versuchstiere nach einer Erhöhung der Dosis auf 5 mg/kg verstarben. Es wird vermutet, dass diese Toxizität unter anderem mit dem stark basischen Charakter der Verbindung zusammenhängt, wie bereits für ähnliche Verbindungen postuliert (GAGNON *et al.*, 2014; KWIATKOWSKA *et al.*, 2016). Aus diesem Grund wurden verschiedene strukturelle Modifikationen an der Verbindung vorgenommen und letztendlich muss ein Kompromiss zwischen ausreichender Bindungsaffinität, Wirksamkeit in Zellkulturtests und Verträglichkeit *in-vivo* gefunden werden.

Die in der eigenen Studie gewählte Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht wurde als gering genug eingeschätzt, um klinisch keine toxischen Auswirkungen auf die lebende Ratte zu haben, aber dennoch eine adäquate Inhibition zu bewirken (persönliche Mitteilung STEINMETZER).

Wie erwartet entwickelten die Versuchstiere nach erfolgter intranasaler Mock-Infektion und Inhibitor-Applikation in einem Untersuchungszeitraum von 21 Tagen p.i. keinerlei klinische Symptome oder histologisch nachweisbare inflammatorische sowie degenerative Veränderungen im Gehirn oder der Nase. Eine Toxizität nach intranasaler Applikation konnte daher nicht festgestellt werden. Es handelt sich hierbei um die erste *in-vivo*-Applikation des MI-0701 mit dem Ziel der Inhibition eines pathologischen Agens.

5.2.1 Vergleichende Klinik und pathohistologische Befunde von Nase und Gehirn der Versuchstiere

Nach intranasaler BoDV-1-Infektion adulter Ratten (10^4 TCID_{50}) kommt es in den meisten Fällen nach etwa 24 Tagen zum Auftreten klinisch manifester Symptome (MORALES *et al.*, 1988). In den eigenen durchgeführten Studien konnten zu keinem Zeitpunkt in einer der Gruppen Belastungsanzeichen festgestellt werden. Der **Gewichtsverlauf** der infizierten, Mock-behandelten und Inhibitor-behandelten Tiere

zeigte keinerlei signifikante Abweichungen, welche auf eine krankheitsbedingte verminderte Futteraufnahme oder einen erhöhten Verbrauch hindeuten könnten. Weder die Virusinfektion noch die Inhibitorapplikation oder die Kombination aus beidem scheint daher einen negativen Einfluss auf die Gewichtsentwicklung der experimentell infizierten Ratten zu haben. Das Gewicht kann dabei als Indikator des Wohlbefindens der Ratte gesehen werden (FOLTZ, ULLMAN-CULLERE, 1998). Weiterhin ist beschrieben, dass es im Gehirn, abhängig von der Viruspräparation und der Dosis, bei intranasaler Infektion nach etwa 18 Tagen zu pathohistologisch sichtbaren Veränderungen wie geringgradigen **Entzündungszellinfiltraten** kommt, ein Peak wird an Tag 27 beschrieben (MORALES *et al.*, 1988). In den vorliegenden Untersuchungen konnten diese Annahmen bestärkt werden. Während nach 14 Tagen kein Tier nach BoDV-1-Infektion pathohistologische Läsionen im Gehirn hatte, zeigten alle Ratten nach 21 Tagen eine nicht-eitrige Meningitis und infrequent eine gleichartige perivaskuläre Entzündungszellinfiltration im Gehirn. Der Inhibitor hatte dabei keinerlei Einfluss auf die Entstehung entzündlicher Infiltrate im Gehirn. Um auch den potentiellen Effekt des Inhibitors auf die Entwicklung klinisch manifester Symptome der Krankheit anzuzeigen, sollten in weiterführenden Studien auch spätere Untersuchungszeitpunkte nach der Infektion vergleichend beurteilt werden.

5.2.2 Effekte des Inhibitors MI-0701 auf die Infektionsrate im olfaktorischen System

Das olfaktorische System ist durch den direkten Kontakt zur Außenwelt und die gleichzeitige Verbindung zum zentralen Nervensystem Teil eines häufig von neurotrophen Erregern genutzten Infektionsweges (MORI, 2015). Die initiale Phase der intranasalen BoDV-1-Infektion ist derzeit nur wenig erforscht. Die Annahme, dass auch dieses Virus bei einer natürlichen Infektion zunächst das olfaktorische System infiziert, bevor es zur Ausbreitung im zentralen Nervensystem kommt, wird zunehmend postuliert (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988; KUPKE, 2016; KUPKE *et al.*, 2019). Wie zuvor gezeigt (KUPKE, 2016), konnte auch in dieser Arbeit *in-vivo* eine Infektion der olfaktorischen Neurone, der Stützzellen, der Basalzellen, der Nervenfasern und der olfaktorischen Hüllzellen des olfaktorischen Epithels nach 14 Tagen sowie nach 21 Tagen nachgewiesen werden. Auch bei intranasaler Applikation des Furininhibitors MI-0701 nach erfolgter Infektion konnte in allen

genannten Zelltypen zu beiden Untersuchungszeitpunkten ein BoDV-1-N-positives Signal detektiert werden. Untersuchungen von KUPKE (2016) zeigten eine initiale Virusreplikation im olfaktorischen Epithel, namentlich in olfaktorischen Neuronen, Nervenfasern und olfaktorischen Hüllzellen, erstmals sieben Tage nach der Infektion. Während nach 14 dpi noch kein signifikanter hemmender Effekt der Behandlung mit dem Inhibitor auf die **Gesamtzahl** der infizierten Zellen des olfaktorischen Epithels bei der Lewis-Ratte detektiert werden konnte, waren nach 21 dpi im Mittel in allen untersuchten Lokalisationen der Nase deutlich weniger infizierte Zellen zu finden. Dabei konnte eine signifikante Reduktion der Infektionsrate von bis zu 68 % registriert werden. Der Effekt der Behandlung war statistisch gesehen tendenziell zeitabhängig. Betrachtet man die **zellulären Komponenten** des olfaktorischen Epithels, so zeigte sich auch hier nach 14 dpi noch kein signifikanter Effekt der Inhibitorbehandlung auf die Anzahl der infizierten Zelltypen. 21 Tage nach der Infektion hingegen konnte eine deutliche und Zelltyp-abhängige Reduktion der Infektionsrate um bis zu 67 % verzeichnet werden. Dabei zeigten die olfaktorischen Neurone, die Nervenfasern sowie die OECs, als potentiell einflussreiche Schnittstellen bei der Infektion, eine besonders effiziente Reduktion. Die detektierte Reduktion im Bereich der olfaktorischen Hüllzellen um durchschnittlich 65 % bestärkt weiterhin die bedeutende Rolle dieses Zelltypen. Auch hier war der Effekt der Behandlung statistisch gesehen tendenziell zeitabhängig. Weiterführende Untersuchungen mit einem Schwerpunkt auf diese Zelltypen und späteren Untersuchungszeitpunkten können das Erstellen einer validen Infektionskinetik ermöglichen und so einen Aufschluss über die Inhibitorwirksamkeit in Langzeitstudien geben.

5.2.3 Effekte des Inhibitors MI-0701 auf die Infektionsrate im Gehirn

Die mittels Immunhistochemie markierten Gewebeschnitte der Versuchstiere wurden initial digitalisiert, um die Auswertung zeitlich effizienter und technisch präziser zu gestalten. Die Kartierung der Gewebeschnitt konnte dabei eine einheitliche Auswertung einer definierten Fläche gewährleisten und die Beurteilung objektivieren. Derartige Verfahren werden zur randomisierten histologischen Untersuchung im Rahmen von semiquantitativen Auswertungen häufig verwendet (JAGOE *et al.*, 1991; TADROUS, 2010; RIBER-HANSEN *et al.*, 2012; VODOVNIK, 2016).

Bei der Untersuchung des Gehirns konnte ein zeitabhängiger Effekt auf die Infektionsrate nachvollzogen werden, auch ist sie abhängig von der anatomischen Lokalisation im Gehirn. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von MORALES *et al.* (1988) gelang in den eigenen Untersuchungen bereits nach 14 Tagen der immunhistologische Nachweis des BoDV-1-N im Nucleus caudatus, in der Medulla oblongata sowie im Cerebellum. Unterschiede in den verwendeten Viruspräparationen sowie den Infektionsdosen können dafür verantwortlich sein.

Die Tatsache, dass rostrale Strukturen wie der Bulbus olfactorius und die Strukturen der Riechbahn nach 14 Tagen die höchsten Infektionsscores zeigen, unterstützt weiterhin die These, dass sich die Infektion ascendierend aus der Nase in das Gehirn ausbreitet. Weitere Strukturen mit hohem durchschnittlichem Infektionsscore wie der Cortex entorhinalis sind funktionell dem olfaktorischen System zugehörig und haben bekannterweise eine besondere Rolle bei der BoDV-1-Infektion inne (MORALES *et al.*, 1988; HEIMRICH *et al.*, 2009). Nach 21 Tagen zeigte zudem der Hippocampus, der unter anderem Efferenzen aus dem Cortex entorhinalis erhält, einen hohen Infektionsscore, was eine Erklärung für die häufig um diesen Zeitpunkt auftretenden, klinisch auffälligen, neurologischen Störungen bei den Ratten sein kann (CARBONE *et al.*, 1987; HERDEN *et al.*, 2000). Zusammengenommen legen auch die eigenen Daten nahe, dass sich das Virus entlang der Nerven des olfaktorischen Systems in anterograder Richtung auch intrazerebral ausbreitet.

Durch den Einsatz des Inhibitors konnte bereits nach 14 dpi, jedoch quantitativ noch deutlicher nach 21 dpi, eine signifikante Reduktion des Infektionsscores beobachtet werden. Zu beiden Zeitpunkten fielen vor allem Gehirnregionen wie der Hippocampus, der Nucleus caudatus und das Putamen sowie das Mesencephalon durch eine effektive Reduktion auf. Interessanterweise gehörten rostrale Anteile wie der Bulbus olfactorius und der Nucleus olfactorius sowie die Strukturen der Riechbahn zu keinem Zeitpunkt zu den deutlich (> 50 % Reduktion) im Score reduzierten Regionen, was suggeriert, dass das Virus in den genannten Strukturen vermutlich besser replizieren sowie persistieren kann. Dennoch war auch in diesen Regionen eine voranschreitende Reduktion des Infektionsscores vom frühen zum späten Untersuchungszeitpunkt zu verzeichnen. Ob die untersuchten Strukturen gegebenenfalls zu früheren sowie späteren als den gewählten Untersuchungszeitpunkten eine Reduktion des Infektionsscores durch eine Inhibitorapplikation zeigen, bleibt Gegenstand

weiterführender Untersuchungen. Weiterhin wurde in den Untersuchungen bisher eine zweimalige Applikation des Inhibitors im Abstand von drei Tagen gewählt. Eine Metabolisierung des Wirkstoffs durch zelleigene Enzyme oder auch die Aufnahme des Wirkstoffs in die Zelle können eine entscheidende Rolle bei der Verfügbarkeit der Substanz spielen. Aus *in-vitro*-Versuchen ist bekannt, dass eine wiederholte Darreichung der Verbindung zu teilweise noch deutlicheren Reduktionen der Infektionsrate geführt hat (BECKER, 2011), sodass weiterführende Experimente mit frequenten Inhibitor-Applikationen über den Zeitraum der Untersuchung Aufschluss über den Einfluss der Darreichungsfrequenz geben könnten. Weiterhin ist bekannt, dass die Effektivität der inhibierenden Verbindungen unter anderem auch von der Dosierung abhängig ist. Da in den durchgeführten Untersuchungen bei 0,5 mg/kg Körpergewicht keinerlei klinisch oder histologisch sichtbare Veränderungen zu detektieren waren, kann eine Erhöhung der Dosis *in-vivo* eventuell eine weitere Reduktion erwirken. Dies kann für den potentiellen empirischen Einsatz eines solchen Wirkstoffs in der Tier- oder auch Humanmedizin von nicht unwesentlicher Bedeutung sein. In einem infizierten Organismus kann eine zeitliche Verzögerung der Ausbreitung eines Agens die Anpassung des angeborenen Immunsystems begünstigen und so den Krankheitsverlauf modifizieren sowie die Symptome möglicherweise mindern.

5.2.4 Korrelation des Nachweises von BoDV-1-N, viraler genomischer RNA und viraler messenger RNA

Eine initiale Replikation des Borna disease virus 1 im olfaktorischen System konnte durch die Detektion genomischer RNA in olfaktorischen Neuronen, Nervenfasern und olfaktorischen Hüllzellen mittels In-situ-Hybridisierung bereits sieben Tage nach intranasaler Infektion nachgewiesen werden. Hinweise auf eine Virustranskription im olfaktorischen Epithel konnten bereits nach 4 dpi gefunden werden, zu diesem Zeitpunkt war virale mRNA in olfaktorischen Neuronen nachweisbar (KUPKE, 2016; KUPKE *et al.*, 2019). In den eigenen Untersuchungen waren genomische und messenger RNA mittels qPCR erst nach 14 Tagen im olfaktorischen Epithel/Gewebe nachzuweisen. Vorhandene Daten von SHANKAR *et al.* (1992) sind sehr unvollständig und zeigten den Nachweis der BoDV-1-RNA 26 Tage nach der intranasalen Infektion. Zu den Untersuchungszeitpunkten 4 und 7 dpi war bei keinem der Tiere in der Untersuchung von SHANKAR *et al.* (1992) in der Nasenschleimhaut BoDV-1-

spezifische RNA nachzuweisen. Die Diskrepanz zwischen den eigenen Ergebnissen und den bisher publizierten Daten kann verschiedene Gründe haben. Die kombinierte Detektion der viralen RNA bei der In-Situ-Hybridisierung und der morphologischen Information dieser Methode scheint insbesondere für derart geringe Mengen positiver Signale sensitiver zu sein, als die RT-PCR (BIESAGA *et al.*, 2012). Zudem hat auch die Auswahl des Materials für die Untersuchungen einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis. Ob eine Differenz zwischen den beiden Nasenhälften eines Tieres besteht, bleibt fraglich. Zudem besteht weiterhin die Möglichkeit, dass auch die Lagerung des Materials von mehreren Jahren einen Einfluss auf die Detektion in der RT-PCR gehabt hat (TRZCINSKA *et al.*, 2012; GROELZ *et al.*, 2018). In weiterführenden Studien sollte daher eine segmentale Untersuchung des olfaktorischen Epithels zugrunde gelegt werden, vergleichbar der immunhistologischen Untersuchung, um so detailliertere Informationen über die vermutete ascendierende Infektion und die Phasen der Virusreplikation und -transkription zu erlangen. Weiterhin erscheint sowohl die differenziertere Untersuchung von Zeitpunkten zwischen 14 und 21 Tagen nach der Infektion als auch die späterer interessant, um den Verlauf der Virusinfektion näher charakterisieren zu können.

Aufgrund der Tatsache, dass für die Kontrollgruppe nach 21 Tagen lediglich ein Tier zu Verfügung stand, sind die Ergebnisse weitestgehend als explorativ zu bewerten. Eine Wiederholung der Untersuchungen mit einer adäquaten Menge an Tieren sollte in weiterführenden Experimenten unbedingt durchgeführt werden, um den Trend, den diese Ergebnisse geliefert haben, weiter zu verifizieren. Die Untersuchungen an den infizierten und zudem mit dem Inhibitor behandelten Tieren ergaben, dass - wie auch in der Kontrollgruppe zu beobachten - konsistent zu allen Untersuchungszeitpunkten in allen untersuchten Lokalisationen des Gehirns deutlich mehr mRNA als gRNA nachweisbar war. Denkbar ist, dass an diesem Punkt der Infektion vermehrt virale Proteine zur Verfügung gestellt werden müssen, um die Synthese neuer Viren abzuschließen und so die Infektion fortschreitet. Die Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass die Applikation des Inhibitors MI-0701 zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten hemmenden Einfluss auf die Quantität der nachgewiesenen viralen messenger RNA hat. Hingegen konnte in drei der vier untersuchten Lokalisationen nach 21 Tagen eine teils deutliche Reduktion (bis 63 %) der viralen genomischen RNA

nachgewiesen werden, lediglich in der kaudalsten Stelle war ein zur Kontrollgruppe gleichbleibender Wert zu finden. Die intranasale Applikation der Verbindung kann einen entscheidenden Einfluss auf dieses Resultat haben, denn auch hier kann von einer rostral beginnenden und sich nach kaudal ausbreitenden Wirkung ausgegangen werden. Eine effiziente Inhibition der Rezeptorbindung des Virus sowie der Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran kann zu einer Verminderung der Replikationsrate führen. Weiterhin war auffällig, dass zu beiden untersuchten Zeitpunkten eine besonders hohe Transkriptionsrate in der Gehirnlokalisation G-I nachweisbar war, was die Rolle des dort inkludierten Bulbus olfactorius weiter hervorhebt. Die Ergebnisse bestätigen die Vorstellung, dass die Infektion und deren Ausbreitung von rostral nach kaudal ascendierend fortschreitet.

5.3 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG ZUM NACHWEIS DES ZELLTODS

In multizellulären Organismen ist der Zelltod ein kritischer und aktiver Prozess, der die Homöostase des Gewebes aufrechterhält und potentiell schädliche Zellen eliminiert. Bisherige Untersuchungen am olfaktorischen Epithel der Ratte im Zusammenhang mit einer BoDV-1-Infektion ergaben, dass bei Infektion keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation des Epithels bzw. in der Zahl der PCNA-positiven Zellen (*proliferating cell nuclear antigen*) zu finden waren (KUPKE, 2016; KUPKE *et al.*, 2019). Die erfolgreiche Virusverbreitung scheint nach einer intranasalen Infektion nicht auf eine lokale Zellproliferation angewiesen zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die BoDV-1-Infektion hingegen zu einer Änderung in der Zelltodrate des olfaktorischen Epithels führt. So sollten indirekt Hinweise darüber erlangt werden, ob es nach der Infektion zu einem vermehrten Zelltod und dadurch potentiell zu einer Viruselimination kommt. Insbesondere wird in vielen Wirtszellen nach einer Virusinfektion der programmierte Zelltod eingeleitet, was die Produktion und Freisetzung von weiteren Viruspartikeln verhindern kann (BI *et al.*, 1995; GEIGER *et al.*, 1997; SAMMIN *et al.*, 1999). Es ist daher nicht überraschend, dass Viren unterschiedliche Mechanismen zur Modulation der Wirtszellapoptose entwickelt haben (THOMSON, 2001). Da das olfaktorische Epithel als Besonderheit die Fähigkeit zur lebenslangen Regeneration, ausgehend von den Basalzellen, besitzt (GRAZIADEI,

GRAZIADEI, 1979; FARBMAN, MARGOLIS, 1980), scheint selbst eine virusinduzierte, vermehrte Apoptose ohne dauerhafte funktionelle Störung des Gewebes einhergehen zu können (SAKAMOTO *et al.*, 2007).

5.3.1 Einfluss der BoDV-1-Infektion auf den Zelluntergang im olfaktorischen Epithel

Die Daten der vorliegenden Studie haben keine signifikanten Unterschiede in dem Vorkommen von Caspase-abhängigen Apoptosen im olfaktorischen Epithel zwischen den beiden untersuchten Gruppen aufzeigen können. Beiden Gruppen gemein war jedoch ein statistisch signifikanter Haupteffekt in Bezug auf die Zeit. Da das Riechepithel das einzige Gewebe im Körper ist, das Neurone enthält, die in direktem Kontakt mit der äußeren Umgebung stehen, macht das olfaktorische Epithel im Erwachsenenalter einen kontinuierlichen Umsatz, ein sogenanntes „Turnover“ des Epithels, durch, das bei Mäusen etwa alle 14 bis 30 Tage unter normalen physiologischen Bedingungen auftritt (CHUAH *et al.*, 1985; HUANG *et al.*, 1995) und aufgrund der vorliegenden Ergebnisse auch für die Ratte angenommen werden kann.

Die quantitativen Untersuchungen konnten zeigen, dass im olfaktorischen Epithel beider Gruppen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte AIF nachgewiesen werden konnte. Der Caspase-unabhängige Zelltod Parthanatos scheint in der Nase der Ratte - unabhängig von einem Insult - keine Rolle zu spielen.

5.4 VERGLEICHENDE SCHLUSSBETRACHTUNG DER *IN-VITRO*- UND *IN-VIVO*-ERGEBNISSE

Die Daten dieser Studie belegen nochmals, dass das Borna disease virus 1 aszendierend aus der Nasenhöhle in das Gehirn gelangt, wobei das olfaktorische Epithel als Eintrittspforte verwendet wird. Nachdem im Jahr 2018 auch erste fatale Infektionen beim Menschen nachgewiesen wurden, steigt die Notwendigkeit für ein Therapeutikum oder einen Wirkstoff zur Pro- oder Metaphylaxe stetig an. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine zugelassene Therapie oder Prophylaxe gegen Bornavirus-Infektionen beim Menschen. Während experimentell eine Wirkung für Ribavirin in

infizierten Zellkulturen sowie in Tiermodellen nachgewiesen werden konnte und auch versuchsweise in der Vergangenheit bei einer humanen BoDV-1-Infektion nach Organtransplantation eingesetzt wurde (SCHLOTTAU *et al.*, 2018), sind Daten für den verwandten Wirkstoff Favipiravir lediglich für *in-vitro*-Untersuchungen vorhanden (MIZUTANI *et al.*, 1998; SOLBRIG *et al.*, 2002; TOKUNAGA *et al.*, 2017). Der Inhibitor MI-0701 stellt seines Zeichens ein sehr interessantes Instrument bei der Therapie viraler Infektionen des tierischen - und gegebenenfalls auch menschlichen - Organismus dar. Neben dem direkten inhibierenden Effekt auf die Infektionsrate kann sich auch eine Neuroprotektion positiv auf den Organismus auswirken. Dabei ist ein potentiell Einsatzgebiet in der Metaphylaxe von sich obligat oder fakultativ olfaktorisch ausbreitenden Viren denkbar. Auch eine kombinierte Anwendung mit einem oder mehreren der bereits bekannten Inhibitoren kann zu einem synergistischen Effekt und reduzierten unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen (GARTEN *et al.*, 1994; LU *et al.*, 2015). Eine intranasale Darreichungsform scheint eine mögliche Form der Applikation zu sein. Inwieweit die Ergebnisse auch auf Infektionen mit anderen Viren der Familie *Bornaviridae* übertragbar sind, ist bisweilen unklar. Ein weiterer wichtiger, potentieller Anwendungsbereich eines solchen Inhibitors könnte aber die Infektion mit dem ebenfalls zoonotisch-aktiven variegated squirrel bornavirus 1 (VSBV-1) sein, dies sollte unbedingt Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Vorerst kann jedoch eine Untersuchung mit erhöhten Inhibitor-Konzentrationen *in-vivo* Aufschluss darüber geben, ob eine effizientere Hemmung der Infektion möglich ist oder möglicherweise sogar Einfluss auf das Entstehen einer Meningoenzephalitis hat. Auf molekularbiologischer Ebene haben die Untersuchungen zeigen können, dass die Applikation von MI-0701 mit fortschreitender Zeit einen inhibitorischen Effekt auf die virale Replikation sowie Translation hat. Dies kann durch eine verminderte initiale Infektion der Zellen erklärt werden.

Genaue Kenntnisse in Bezug auf die frühe intranasale Phase der Infektion mit derartigen neurotrophen Viren und das Wissen um die verantwortlichen Zelltypen ist eine wesentliche Voraussetzung, um effiziente antivirale prophylaktische und therapeutische Maßnahmen für Viren mit intranasalem Infektionsweg entwickeln zu können. Eine intranasale Infektion mit aviären Bornaviren war in den experimentellen Studien nicht erfolgreich (HECKMANN *et al.*, 2017) und es ist immer noch nicht bekannt, wie sich Menschen mit dem BoDV-1 (SCHLOTTAU *et al.*, 2018) oder mit

VSBV-1 (HOFFMANN *et al.*, 2015) infizieren. Die vorliegende Studie liefert *in-vivo*- und *in-vitro*-Nachweise für die wichtige Rolle des olfaktorischen Epithels sowie speziell der olfaktorischen Hüllzellen für die initiale virale Replikation und Transkription. Eine anfängliche Infektion von nur wenigen Zellen ist dabei ausreichend, um eine erfolgreiche Ausbreitung in das zentrale Nervensystem zu ermöglichen. Dabei werden keine sichtbaren morphologischen Veränderungen induziert, sodass das BoDV-1 scheinbar eine effektive Strategie entwickelt hat, um den Wirt über das olfaktorische System zu infizieren, ohne vom Immunsystem erkannt zu werden. Weder eine Veränderung in der Proliferations- noch in der Zelltodrate scheinen zu den bevorzugten viralen Strategien in diesem Gewebe zu gehören. Viele offene Fragen bezüglich der Immunantwort dieses Systems sowie seine Rolle in Bezug auf die Spezifität müssen jedoch noch gelöst werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

6.1 Zusammenfassung

Charakteristik der intranasalen Infektion mit neurotrophen Bornaviren unter Berücksichtigung antiviraler Interventionsstrategien

Sabrina Munsch

1. Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Wirkung eines Furininhibitors (MI-0701) auf die intranasale Infektion mit dem Borna disease virus 1 der Ratte, einem seit langem etablierten Tiermodell zur Untersuchung neurotroper Virusinfektionen. Daten zur Inhibition der Spaltung des viralen Glykoproteins durch den Furininhibitor und die Auswirkung auf die Infektion des olfaktorischen Systems lagen bislang nicht vor. Der peptidomimetische Inhibitor MI-0701 gehört zu den wirksamsten, reversibel bindenden, niedermolekularen Furininhibitoren, dessen Wirksamkeit an diversen Beispielen viraler sowie bakterieller Infektionen gezeigt werden konnte. *In-vivo*-Untersuchungen mit dem Inhibitor an BoDV-1-infizierten Tieren wurden ebenfalls bislang nicht durchgeführt. Die eigenen Untersuchungen sollten zum Verständnis der initialen Phasen intranasaler Infektionen mit neurotrophen Viren und möglicher antiviraler Therapieansätze bislang unzulänglich behandelbarer neurotroper Virusinfektionen beitragen. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung der initialen Vermehrung des BoDV 1 im olfaktorischen System sowie der entsprechenden infizierten Zellen. Dabei sollte besonderes Augenmerk auf den die olfaktorischen Nervenfasern umhüllenden *olfactory ensheathing cells* (OEC) liegen, vorherige Untersuchungen ließen eine zentrale Bedeutung bei der Pathogenese der Bornaschen Krankheit vermuten. Die speziellen Mechanismen der intranasalen Virusverbreitung sind bislang nur unzulänglich verstanden. Virale Infektionen können weiterhin z. B. durch Regulation des Zelltods die Homöostase des olfaktorischen Epithels beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher auch untersucht werden, ob auch die intranasale BoDV-1-Infektion einen Einfluss auf den Zelltod des olfaktorischen Epithels hat.

2. Um den Einfluss des Furininhibitors auf die Infektionsrate *in-vitro* zu untersuchen, wurde eine Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels (OE) der Ratte mit BoDV-1 infiziert und mit dem Inhibitor behandelt. Nach 4, 7 und 10 dpi lag der Anteil infizierter Zellen bei den unbehandelten Kontrollkulturen stets höher als bei denen nach Inhibitorzugabe ($p < 0,0001$). Es konnte eine dosisabhängige Reduktion der Infektionsrate mit einer maximalen Reduktion um knapp 80 % nach Behandlung mit 10 μM des Furininhibitors nach 10 dpi festgestellt werden. Zudem sollte untersucht werden, ob die Inhibitorzugabe nach BoDV-1-Infektion einen Einfluss auf den Neuronenanteil in der Kultur hatte. Es konnte gezeigt werden, dass der Neuronenanteil abhängig von der Behandlung war ($p = 0,0001$). Während die BoDV-1-infizierten Kulturen stets den niedrigsten neuronalen Anteil aufwiesen (10 dpi: 4,4 %), zeigten die zusätzlich mit 10 μM MI-0701 behandelten Kulturen den höchsten Neuronenanteil auf (10 dpi: 9,9 %). Dies kann für einen potentiell protektiven Effekt des Inhibitors MI-0701 bei viraler Infektion auf die olfaktorischen Neurone sprechen. Bei molekularbiologischen Untersuchungen zum Nachweis viraler messenger RNA (mRNA) und genomischer RNA (gRNA) des infizierten OEs mittels quantitativer real time RT-PCR zeigte sich initial nach 4 dpi eine äquivalente virale Replikation und Transkription, während nach 7 dpi das Verhältnis zugunsten der Transkription verschoben war und somit die virale Proteinneubildung begünstigt wurde.

Olfaktorische Hüllzellen (OEC) zeigten in vorherigen Untersuchungen eine zentrale Bedeutung bei der intranasalen Infektion mit BoDV-1. Permanente OECs der Ratte wurden hier erstmalig erfolgreich mit BoDV-1 infiziert und es wurde eine stetige Virusausbreitung über die Zeit bis hin zu einer Infektionsrate von 16,8 % nach 6 dpi festgestellt ($p < 0,0001$). Nach Inhibitoranwendung konnte eine dosisabhängige Reduktion der Infektionsrate ($p = 0,0027$) mit einer maximalen Reduktion um mehr als 85 % nach Behandlung mit 10 μM des Inhibitors nach 6 dpi festgestellt werden. Bei molekularbiologischen Untersuchungen der infizierten OECs mittels quantitativer RT-PCR zum Nachweis viraler mRNA und gRNA zeigte sich initial nach 4 dpi eine verhältnismäßig höhere virale Replikationsrate im Vergleich zur Transkription, während sich die Werte nach 7 dpi denen für die Transkription angleichen. Dies unterstreicht die Rolle der olfaktorischen Hüllzellen während der BoDV-1-Infektion und die Hypothese, dass sie in der initialen Infektionsphase die virale Replikation fördern.

Insgesamt weisen die Ergebnisse der *in-vitro*-Untersuchungen auf eine signifikante Inhibition der Infektionsausbreitung im olfaktorischen System durch den Einsatz von MI-0701 hin. Insbesondere die olfaktorischen Hüllzellen scheinen für die Infektion besonders empfänglich zu sein und können so auch ein vielversprechendes Ziel bei der Reduktion der Infektionsrate sein.

3. Zum Studium des Inhibitoreinflusses *in-vivo* wurden Lewis-Ratten intranasal mit BoDV-1 infiziert und anschließend 0,5 mg MI-0701/kg Körpergewicht appliziert. Zu keinem Untersuchungszeitpunkt konnten Anzeichen einer Erkrankung bei den Tieren festgestellt werden. Nach 21 dpi zeigten die Tiere sowie auch diejenigen der Kontrollgruppe eine geringgradige nicht-eitrige Meningoenzephalitis. Abhängig von der anatomischen Lokalisation war mittels immunhistologischer Untersuchung eine Reduktion des Nachweises von BoDV-1-N um bis zu 68 % der infizierten Zellen im olfaktorischen Epithel festzustellen. Auf zellulärer Ebene konnte die deutlichste Reduktion der Infektion bei den olfaktorischen Hüllzellen (65 %) und den olfaktorischen Nervenfasern (67 %) detektiert werden, was wiederum die *in-vitro* Daten bestätigt. Nervalen Strukturen kommt also wie erwartet nicht nur bei der initialen Infektion und der Virusausbreitung, sondern auch bei deren Hemmung eine besondere Bedeutung zu. Mittels quantitativer real time RT-PCR zum Nachweis viraler mRNA und gRNA zeigte sich nach 21 dpi eine Reduktion der Replikation in der Nase um bis zu 45 %, die Transkription zeigte jedoch keine Reduktion. Abhängig von der zerebralen Struktur war mittels immunhistologischer Untersuchung zum Nachweis von BoDV-1-N auch im Gehirn eine Reduktion des Infektionsscores um bis zu 58 % festzustellen. Mittels quantitativer real time RT-PCR zum Nachweis viraler mRNA und gRNA zeigte sich nach 21 dpi eine Reduktion der viralen Replikation in untersuchten Gehirnregionen um bis zu 63 %, die virale Transkription zeigte im Gehirn fast keine Reduktion. Mittels quantitativer real time RT-PCR zeigte sich im Gehirn bei den infizierten Tieren ein zeitabhängiger Anstieg für die virale Replikation sowie für die Transkription, wobei stets ein Verhältnis zugunsten der Transkription nachweisbar war. Absolut waren in rostral gelegenen Arealen die höchsten Werte zu bestimmen, was dem bekannten Verlauf der BoDV-1-Infektion entspricht.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der *in-vivo*-Untersuchungen dafür, dass der intranasale Einsatz von MI-0701 zu einer Reduktion der Infektion in der Nase sowie im Gehirn führte. Inwieweit die Wirkung des Furininhibitors auf die virale Replikation eine Folge der reduzierten Virusweitergabe an nicht-infizierte Zellen aufgrund des Fehlen eines biologisch aktiven, viralen Glykoproteins ist oder der Inhibitor MI-701 auch direkt in die Phasen der viralen Replikation eingreifen kann, muss in weiteren Studien geklärt werden.

4. Um den Einfluss der BoDV-1-Infektion auf den Zelltod im olfaktorischen Epithel zu erforschen, wurde Gewebe intranasal infizierter Ratten immunhistologisch qualitativ und quantitativ auf das Vorkommen von Caspase3 (stellvertretend für lokale Apoptose) und AIF (stellvertretend für lokalen Parthanatos) untersucht. Dabei wurde zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied für die Caspase-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden, AIF war überhaupt nicht detektierbar.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass bei viraler Infektion eine Modifikation der Homöostase des olfaktorischen Epithels mittels Apoptose nicht stattfindet, Parthanatos scheint auch unabhängig von einer Infektion keine Rolle beim Zelltod dieses Epithels zu spielen.

5. In der vorliegenden Arbeit wurde zusammenfassend gezeigt, dass die Proproteinkonvertase Furin eine entscheidende Rolle bei der Virusinfektion spielt und die Anwendung des Furininhibitors MI-0701 sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* zu einer signifikanten Reduktion der zellulären Infektionsrate im Vergleich zu den Kontrollgruppen geführt hat. Ein zusätzlicher, noch weiter zu klassifizierender, neuroprotektiver Charakter oder mögliche direkte Interaktionen mit der viralen Replikation erscheinen nicht ausgeschlossen. Eine besondere Rolle in Bezug auf Effizienz kommt bei der Inhibition der viralen Infektion den olfaktorischen Hüllzellen zu. Der Inhibitor stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Reduktion der Viruslast als Therapeutikum oder zur Metaphylaxe bei Infektionen mit Bornaviren dar. Somit liefert diese Studie wichtige Erkenntnisse zur Übertragung neurotroper Virusinfektionen mit zoonotischem Potential.

6.2 Summary

Characteristics of intranasal infection with neurotropic Bornaviruses considering strategies of antiviral intervention

Sabrina Munsch

1. One aim of this thesis was to investigate the effect of a furin inhibitor (MI 0701) on the intranasal infection with Borna disease virus 1 in rats, a long-established animal model for the investigation of neurotropic virus infections.

So far, data on the inhibition of the cleavage of the viral glycoprotein by the furin inhibitor and the effect on the infection of the olfactory system were not available. The peptidomimetic inhibitor MI-0701 is one of the most effective, reversibly binding, low molecular weight furin inhibitors, the effectiveness of which has been demonstrated in various examples of viral and bacterial infections. In vivo studies with this inhibitor on BoDV-1 infected animals have also not yet been carried out. Our own investigations should contribute to the understanding of the initial phases of intranasal infections with neurotropic viruses and possible antiviral therapeutic approaches of previously inadequately treatable neurotropic virus infections. Another aim was to characterize the initial replication in BoDV-1 in the olfactory system and the corresponding infected cells. Special attention was paid to the olfactory ensheathing cells (OEC) that envelop the olfactory nerve fibers; previous investigations suggested a central role in the pathogenesis of Borna disease. The special mechanisms of intranasal virus spread are so far poorly understood. Viral infections can also influence the homeostasis of the olfactory epithelium, for example by regulating cell death. As part of this thesis, it was therefore investigated whether the intranasal BoDV-1 infection also had an influence on the cell death of the olfactory epithelium.

2. In order to examine the influence of the furin inhibitor on the rate of infection *in vitro*, a dissociation culture of the olfactory epithelium (OE) of the rat was infected with BoDV-1 and treated with the inhibitor. After 4, 7 and 10 dpi, the proportion of infected

cells was higher in the untreated cultures than in those receiving the inhibitor additionally ($p < 0.0001$). A dose-dependent reduction in the rate of infection with a maximum reduction of almost 80% after treatment with 10 μM of the furin inhibitor after 10 dpi was found. Furthermore, it was investigated whether the addition of inhibitor after BoDV-1 infection had an influence on the number of neurons in the culture. It was shown that the number of neurons was dependent on the treatment ($p = 0.0001$). While the BoDV-1-infected cultures always had the lowest neuronal proportion (10 dpi: 4.4%), the cultures additionally treated with 10 μM MI-0701 had the highest proportion of neurons (10 dpi: 9.9%). This can speak for a potentially protective effect of the inhibitor MI-0701 in the event of a viral infection on the olfactory neurons. The detection of viral messenger RNA (mRNA) and genomic RNA (gRNA) of the infected olfactory epithelium by quantitative real time RT-PCR showed initially equivalent viral replication and transcription after 4 dpi, while after 7 dpi the ratio shifted in favor of transcription, thus promoting the formation of new viral proteins.

In previous studies olfactory ensheathing cells (OEC) showed a central role in the intranasal entry of BoDV-1. Permanent OECs of the rat were successfully infected with BoDV-1 for the first time and a steady virus spread over time up to an infection rate of 16.8% after 6 dpi was found ($p = < 0.0001$). After the applications of the inhibitor, a dose-dependent reduction in the rate of infection ($p = 0.0027$) with a maximum reduction of more than 85% after treatment with 10 μM of the inhibitor after 6 dpi was found. Using quantitative RT-PCR for the detection of viral mRNA and gRNA in the infected OECs showed initially a relatively higher viral replication rate after 4 dpi compared to transcription, while the values after 7 dpi equalized those for transcription. This accentuates the role of olfactory ensheathing cells during BoDV-1 infection and the hypothesis that they promote viral replication in the initial infection phase.

Overall, the results of the *in vitro* studies indicate a significant inhibition of the spread of infection in the olfactory system through the use of MI-0701. The olfactory ensheathing cells in particular seem to be highly susceptible to infection and thus also a promising tool for reducing the rate of infection.

3. To study the effect of the inhibitor *in vivo*, Lewis rats were infected intranasally with BoDV-1 and then received 0.5 mg MI-0701/kg body weight. No signs of disease could

be found in the animals at any time of observation. After 21 dpi, these animals as well as those of the control group showed a mild non-purulent meningoencephalitis. Depending on the anatomical location, an immunohistological examination showed a reduction of the detection of BoDV-1-N by up to 68% of the infected cells in the olfactory epithelium. At the cellular level, the most significant reduction in infection was detected in the olfactory ensheathing cells (65%) and the olfactory nerve fibers (67%), confirming the *in-vitro* data. As expected, nerve structures are of particular importance not only in the initial infection and virus spread, but also in their inhibition. Quantitative real time RT-PCR for the detection of viral mRNA and gRNA showed a reduction in replication in the nose of up to 45% after 21 dpi, while transcription showed no reduction. Depending on the cerebral structure, an immunohistological examination for the detection of BoDV-1-N showed a reduction in the infection score of up to 58% in the brain. Quantitative real time RT-PCR for the detection of viral mRNA and gRNA showed a reduction in viral replication in brain regions of up to 63% after 21 dpi. Viral transcription, however, showed almost no reduction in the brain in any area investigated. Quantitative real time RT-PCR showed a time-dependent increase for viral replication and transcription in the brain of the infected animals, with a ratio in favor of transcription always being detectable. The absolute highest values were determined in rostral areas, which corresponds to the known way of the BoDV-1 infection.

In summary, the results of the *in-vivo* studies suggest that the intranasal use of MI-0701 led to a reduction of infection in the nose and in the brain. The extent to which the effect of the furin inhibitor on viral replication is a consequence of the reduced virus transmission to non-infected cells due to the lack of a biologically active, viral glycoprotein, or the extent to which the inhibitor MI-0701 can also intervene directly in the phases of viral replication must be clarified in further studies.

4. In order to investigate the influence of BoDV-1 infection on cell death in the olfactory epithelium, tissue from intranasally infected rats was immunohistologically examined qualitatively and quantitatively for the occurrence of caspase3 (representative of local apoptosis) and AIF (representative of local parthanatos). No significant difference was

found for the caspase-positive cells compared to the control group at any point in time of the investigation; AIF was not detectable at all.

Overall, the results suggest that a modification of the homeostasis of the olfactory epithelium by means of apoptosis does not take place in the event of a viral infection. Parthanatos does not seem to play a role in the cell death of this special epithelium regardless of an infection.

5. In summary, in the present thesis it was shown that the proprotein convertase furin plays a decisive role in virus infection. The application of the furin inhibitor MI-0701 has led to a significant reduction in the cellular rate of infection in comparison to the control groups, both in vitro and in vivo; an additional, further to be classified, neuroprotective character or possible direct interactions with the viral replication appear to be possible. The olfactory ensheathing cells play a special role in terms of efficiency in the inhibition of viral infection. The inhibitor represents a promising approach to reducing the viral load as a therapeutic agent or for metaphylaxis in infections with Borna viruses. This study thus provides important information on the transmission of neurotropic viral infections with zoonotic potential.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ABRAMI, L.; FIVAZ, M.; DECROLY, E.; SEIDAH, N. G.; JEAN, F.; THOMAS, G.; LEPLA, S. H.; BUCKLEY, J. T.; VAN DER GOOT, F. G. (1998). The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* 273(49): 32656-32661.

AESCHT, E.; BÜCHL-ZIMMERMANN, S.; BURMESTER, A.; DÄNHARDT-PFEIFFER, S.; DESEL, C.; HAMERS, C.; JACH, G.; KÄSSENS, M.; MAKOVITZKY, J.; MULISCH, M.; NIXDORF-BERGWEILER, B.; PÜTZ, D.; RIEDELSHEIMER, B.; VAN DEN BOOM, F.; WEGERHOFF, R.; WELSCH, U. (2010). *Romeis - Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag.

AHLEMEYER, B.; BAUMGART-VOGT, E. (2005). Optimized protocols for the simultaneous preparation of primary neuronal cultures of the neocortex, hippocampus and cerebellum from individual newborn (P0.5) C57Bl/6J mice. *J Neurosci Methods* 149(2): 110-120.

AHLEMEYER, B.; KEHR, K.; RICHTER, E.; HIRZ, M.; BAUMGART-VOGT, E.; HERDEN, C. (2013). Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions. *J Neurosci Methods* 212(1): 156-164.

ALLISON, A. C. (1953). The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biological Reviews* 28(2): 195-244.

ALTMANN, U.; KRONBERGER, H.; SCHUEPPEL, K. F.; LIPPMANN, R.; ALTMANN, I. (1976). Bornasche Krankheit bei Neuwelttylopoden und Equiden. Internationaler Kongress über die Erkrankung von Zootieren, Innsbruck.

AMARASINGHE, G. K.; ARECHIGA CEBALLOS, N. G.; BANYARD, A. C.; BASLER, C. F.; BAVARI, S.; BENNETT, A. J.; BLASDELL, K. R.; BRIESE, T.; BUKREYEV, A.; CAI, Y.; CALISHER, C. H.; CAMPOS LAWSON, C.; CHANDRAN, K.; CHAPMAN, C. A.; CHIU, C. Y.; CHOI, K. S.; COLLINS, P. L.; DIETZGEN, R. G.; DOLJA, V. V.; DOLNIK, O.; DOMIER, L. L.; DURRWALD, R.; DYE, J. M.; EASTON, A. J.; EBIHARA, H.; ECHEVARRIA, J. E.; FOOKS, A. R.; FORMENTY, P. B. H.; FOUCHIER, R. A. M.; FREULING, C. M.; GHEDIN, E.; GOLDBERG, T. L.; HEWSON, R.; HORIE, M.; HYNDMAN, T. H.; JIANG, D.; KITYO, R.; KOBINGER, G. P.; KONDO, H.; KOONIN, E. V.; KRUPOVIC, M.; KURATH, G.; LAMB, R. A.; LEE, B.; LEROY, E. M.; MAES, P.; MAISNER, A.; MARSTON, D. A.; MOR, S. K.; MULLER, T.; MUHLBERGER, E.; RAMIREZ, V. M. N.; NETESOV, S. V.; NG, T. F. F.; NOWOTNY, N.; PALACIOS, G.; PATTERSON, J. L.; PAWESKA, J. T.; PAYNE, S. L.; PRIETO, K.; RIMA, B. K.; ROTA, P.; RUBBENSTROTH, D.; SCHWEMMLE, M.; SIDDELL, S.; SMITHER, S. J.; SONG, Q.; SONG, T.; STENGLEIN, M. D.; STONE, D. M.; TAKADA, A.; TESH, R. B.; THOMAZELLI, L. M.; TOMONAGA, K.; TORDO, N.; TOWNER, J. S.; VASILAKIS, N.; VAZQUEZ-MORON, S.; VERDUGO, C.; VOLCHKOV, V. E.; WAHL, V.; WALKER, P. J.; WANG, D.; WANG, L. F.; WELLEHAN, J. F. X.; WILEY, M. R.; WHITFIELD, A. E.; WOLF, Y. I.; YE, G.; ZHANG, Y. Z.; KUHN, J. H. (2018). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. *Archives of Virology* (163): 2283-2294.

AMSTERDAM, J. D.; WINOKUR, A.; DYSON, W.; HERZOG, S.; GONZALEZ, F.; ROTT, R.; KOPROWSKI, H. (1985). Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Arch Gen Psychiatry* 42(11): 1093-1096.

ANDERSON, E. D.; VANSLYKE, J. K.; THULIN, C. D.; JEAN, F.; THOMAS, G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 16(7): 1508-1518.

ANGLIKER, H. (1995). Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J Med Chem* 38(20): 4014-4018.

APPEL, M. J.; YATES, R. A.; FOLEY, G. L.; BERNSTEIN, J. J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L. H.; MILLER, L. D.; ARP, L. H.; ANDERSON, M.; BARR, M.; ET AL. (1994). Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest* 6(3): 277-288.

ARONSSON, F.; ROBERTSON, B.; LJUNGGREN, H. G.; KRISTENSSON, K. (2003). Invasion and persistence of the neuroadapted influenza virus A/WSN/33 in the mouse olfactory system. *Viral Immunol* 16(3): 415-423.

ARTENSTEIN, A. W.; OPAL, S. M. (2012). Novel approaches to the treatment of systemic anthrax. *Clin Infect Dis* 54(8): 1148-1161.

AU, W. W.; TRELOAR, H. B.; GREER, C. A. (2002). Sublaminar organization of the mouse olfactory bulb nerve layer. *J Comp Neurol* 446(1): 68-80.

AUTENRIETH, C. F. (1823). Über die hitzige Kopfkrankheit der Pferde. Auf Verlangen des Müsinger-Vereins zur Beförderung der Pferdezucht auf der Alp und zunächst für diese Gegend. bey Heinrich, Tübingen: Laupp.

BAGGA, S.; BOUCHARD, M. J. (2014). Cell cycle regulation during viral infection. *Methods Mol Biol* 1170: 165-227.

BAJRAMOVIC, J. J.; MUNTER, S.; SYAN, S.; NEHRBASS, U.; BRAHIC, M.; GONZALEZ-DUNIA, D. (2003). Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons. *J Virol* 77(22): 12222-12231.

BAJRAMOVIC, J. J.; SYAN, S.; BRAHIC, M.; DE LA TORRE, J. C.; GONZALEZ-DUNIA, D. (2002). 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine inhibits borna disease virus replication and spread. *J Virol* 76(12): 6268-6276.

BAJRAMOVIC, J. J.; VOLMER, R.; SYAN, S.; POCHET, S.; GONZALEZ-DUNIA, D. (2004). 2'-fluoro-2'-deoxycytidine inhibits Borna disease virus replication and spread. *Antimicrob Agents Chemother* 48(4): 1422-1425.

BASAK, A. (2005). Inhibitors of proprotein convertases. *J Mol Med (Berl)* 83(11): 844-855.

BASAK, A.; CHEN, A.; SCAMUFFA, N.; MOHOTTALAGE, D.; BASAK, S.; KHATIB, A. M. (2010). Blockade of furin activity and furin-induced tumor cells malignant phenotypes by the chemically synthesized human furin prodomain. *Curr Med Chem* 17(21): 2214-2221.

BASAK, A.; KHATIB, A. M.; MOHOTTALAGE, D.; BASAK, S.; KOLAJOVA, M.; BAG, S. S.; BASAK, A. (2009). A novel enediynyl peptide inhibitor of furin that blocks processing of proPDGF-A, B and proVEGF-C. *PLoS One* 4(11): e7700.

BAUTISTA, J. R.; RUBIN, S. A.; MORAN, T. H.; SCHWARTZ, G. J.; CARBONE, K. M. (1995). Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res* 90(1-2): 45-53.

BAUTISTA, J. R.; SCHWARTZ, G. J.; DE LA TORRE, J. C.; MORAN, T. H.; CARBONE, K. M. (1994). Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull* 34(1): 31-40.

BAYER, K. (2010). Bedeutung der Glykoproteinspaltung in der Zell-zu-Zell Ausbreitung des Virus der Bornaschen Krankheit. Philipps-Universität Marburg. Diplomarbeit.

BECK, A.; FROHBÖSE, H. (1926). Die enzootische Encephalitis des Schafes. *Arch Wiss Prakt Tierheilkd* 54: 84–110.

BECKER, G. L. (2011). Entwicklung, Synthese und Charakterisierung neuartiger Furininhibitoren. Philipps-Universität Marburg. Fachbereich Pharmazie, Dissertation.

BECKER, G. L.; HARDES, K.; STEINMETZER, T. (2011). New substrate analogue furin inhibitors derived from 4-amidinobenzylamide. *Bioorg Med Chem Lett* 21(16): 4695-4697.

BECKER, G. L.; LU, Y.; HARDES, K.; STREHLOW, B.; LEVESQUE, C.; LINDBERG, I.; SANDVIG, K.; BAKOWSKY, U.; DAY, R.; GARTEN, W.; STEINMETZER, T. (2012). Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J Biol Chem* 287(26): 21992-22003.

BECKER, G. L.; SIELAFF, F.; THAN, M. E.; LINDBERG, I.; ROUTHIER, S.; DAY, R.; LU, Y.; GARTEN, W.; STEINMETZER, T. (2010). Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein

convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem* 53(3): 1067-1075.

BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGARTNER, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 127(1-2): 1-18.

BELI, V. A.; LEVINE, A. J.; SKALKA, A. M. (2010). Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog* 6(7): e1001030.

BENNETT, B. D.; DENIS, P.; HANIU, M.; TELOW, D. B.; KAHN, S.; LOUIS, J. C.; CITRON, M.; VASSAR, R. (2000). A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem* 275(48): 37712-37717.

BENNETT, R. S.; CRESS, C. M.; WARD, J. M.; FIRESTONE, C. Y.; MURPHY, B. R.; WHITEHEAD, S. S. (2008). La Crosse virus infectivity, pathogenesis, and immunogenicity in mice and monkeys. *Virol J* 5: 25.

BERG, A. L. (1999). Borna disease in cats. *Vet Rec* 145(3): 87.

BERGERON, E.; BASAK, A.; DECROLY, E.; SEIDAH, N. G. (2003). Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem J* 373(Pt 2): 475-484.

BI, Z.; QUANDT, P.; KOMATSU, T.; BARNA, M.; REISS, C. S. (1995). IL-12 promotes enhanced recovery from vesicular stomatitis virus infection of the central nervous system. *J Immunol* 155(12): 5684-5689.

BIESAGA, B.; SZOSTEK, S.; KLIMEK, M.; JAKUBOWICZ, J.; WYSOCKA, J. (2012). Comparison of the sensitivity and specificity of real-time PCR and in situ hybridization in HPV16 and 18 detection in archival cervical cancer specimens. *Folia Histochem Cytobiol* 50(2): 239-247.

BILZER, T.; GRABNER, A.; STITZ, L. (1996). [Immunopathology of Borna disease in the horse: clinical, virological and neuropathologic findings]. *Tierarztl Prax* 24(6): 567-576.

BILZER, T.; PLANZ, O.; LIPKIN, W. I.; STITZ, L. (1995). Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol* 5(3): 223-230.

BILZER, T.; STITZ, L. (1993). Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells. *Arch Virol Suppl* 7: 153-158.

BINZ, T.; LEBELT, J.; NIEMANN, H.; HAGENAU, K. (1994). Sequence analyses of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. *Virus Res* 34(3): 281-289.

BJORNSDOTTIR, S.; AGUSTSDOTTIR, E.; BLOMSTROM, A. L.; OSTROM, I. L.; BERNDTSSON, L. T.; SVANSSON, V.; WENSMAN, J. J. (2013). Serological markers of Bornavirus infection found in horses in Iceland. *Acta Vet Scand* 55: 77.

BODE, L.; DIETRICH, D. E.; STOYLOFF, R.; EMRICH, H. M.; LUDWIG, H. (1997). Amantadine and human Borna disease virus in vitro and in vivo in an infected patient with bipolar depression. *Lancet* 349(9046): 178-179.

BODE, L.; DURRWALD, R.; LUDWIG, H. (1994a). Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet Rec* 135(12): 283-284.

BODE, L.; STEINBACH, F.; LUDWIG, H. (1994b). A novel marker for Borna disease virus infection. *Lancet* 343(8892): 297-298.

BODE, L.; ZIMMERMANN, W.; FERSZT, R.; STEINBACH, F.; LUDWIG, H. (1995). Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nat Med* 1(3): 232-236.

BONNAUD, E. M.; SZELECHOWSKI, M.; BÉTOURNÉ, A.; FORET, C.; THOUARD, A.; GONZALEZ-DUNIA, D.; MALNOU, C. E. (2015). Borna disease virus phosphoprotein modulates epigenetic signaling in neurons to control viral replication. *J Virol* 89(11): 5996-6008.

BONTEMPS, Y.; SCAMUFFA, N.; CALVO, F.; KHATIB, A. M. (2007). Potential opportunity in the development of new therapeutic agents based on endogenous and exogenous inhibitors of the proprotein convertases. *Med Res Rev* 27(5): 631-648.

BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER, E.; GARTEN, W.; KLENK, H. D. (2018). *Activation of Viruses by Host Proteases*. Springer.

BOURG, M.; HERZOG, S.; ENCARNACAO, J. A.; NOBACH, D.; LANGE-HERBST, H.; EICKMANN, M.; HERDEN, C. (2013). Bicolored white-toothed shrews as reservoir for borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis* 19(12): 2064-2066.

BOURTEELE, S.; OESTERLE, K.; PLESCHKA, S.; UNTERSTAB, G.; EHRHARDT, C.; WOLFF, T.; LUDWIG, S.; PLANZ, O. (2005). Constitutive activation of the transcription factor NF-kappaB results in impaired borna disease virus replication. *J Virol* 79(10): 6043-6051.

BOYD, J. G.; SKIHAR, V.; KAWAJA, M.; DOUCETTE, R. (2003). Olfactory ensheathing cells: historical perspective and therapeutic potential. *Anat Rec B New Anat* 271(1): 49-60.

BRAUCHI, S.; CEA, C.; FARIAS, J. G.; BACIGALUPO, J.; REYES, J. G. (2006). Apoptosis induced by prolonged exposure to odorants in cultured cells from rat olfactory epithelium. *Brain Res* 1103(1): 114-122.

BRAUN, E.; SAUTER, D. (2019). Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin Transl Immunology* 8(8): e1073.

BRIESE, T.; DE LA TORRE, J. C.; LEWIS, A.; LUDWIG, H.; LIPKIN, W. I. (1992). Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23): 11486-11489.

BRIESE, T.; LIPKIN, W. I.; DE LA TORRE, J. C. (1995). Molecular biology of Borna disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 1-16.

BRIESE, T.; SCHNEEMANN, A.; LEWIS, A. J.; PARK, Y. S.; KIM, S.; LUDWIG, H.; LIPKIN, W. I. (1994). Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(10): 4362-4366.

BUCK, L.; AXEL, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65(1): 175-187.

BUTLER, A. B.; HODOS, W. (2005). *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. Wiley-Liss.

CALOF, A. L.; HAGIWARA, N.; HOLCOMB, J. D.; MUMM, J. S.; SHOU, J. (1996). Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. *J Neurobiol* 30(1): 67-81.

CAPLAZI, P.; EHRENSPERGER, F. (1998). Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 61(2-4): 203-220.

CAPLAZI, P.; WALDVOGEL, A.; STITZ, L.; BRAUN, U.; EHRENSPERGER, F. (1994). Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol* 111(1): 65-72.

CARBONE, K. M.; DUCHALA, C. S.; GRIFFIN, J. W.; KINCAID, A. L.; NARAYAN, O. (1987). Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol* 61(11): 3431-3440.

CARBONE, K. M.; PARK, S. W.; RUBIN, S. A.; WALTRIP, R. W., 2ND; VOGELANG, G. B. (1991). Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol* 65(11): 6154-6164.

- CARBONE, K. M.; RUBIN, S. A.; SIERRA-HONIGMANN, A. M.; LEDERMAN, H. M. (1993). Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol* 67(3): 1453-1460.
- CHAMBERS, T. J.; HAHN, C. S.; GALLER, R.; RICE, C. M. (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688.
- CHARLIER, C. M.; WU, Y. J.; ALLART, S.; MALNOU, C. E.; SCHWEMMLE, M.; GONZALEZ-DUNIA, D. (2013). Analysis of borna disease virus trafficking in live infected cells by using a virus encoding a tetracysteine-tagged p protein. *J Virol* 87(22): 12339-12348.
- CHASE, G.; MAYER, D.; HILDEBRAND, A.; FRANK, R.; HAYASHI, Y.; TOMONAGA, K.; SCHWEMMLE, M. (2007). Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol* 81(2): 743-749.
- CHAURUSHIYA, MIRA S; WEITZMAN, MATTHEW D (2009). Viral manipulation of DNA repair and cell cycle checkpoints. *DNA repair* 8(9): 1166-1176.
- CHEAL, M. L.; SPROTT, R. L. (1971). Social olfaction: a review of the role of olfaction in a variety of animal behaviors. *Psychol Rep* 29(1): 195-243.
- CHOI, R.; GOLDSTEIN, B. J. (2018). Olfactory epithelium: Cells, clinical disorders, and insights from an adult stem cell niche. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 3(1): 35-42.
- CHOU, R. H.; LU, C. Y.; FAN, J. R.; YU, Y. L.; SHYU, W. C. (2014). The potential therapeutic applications of olfactory ensheathing cells in regenerative medicine. *Cell Transplant* 23(4-5): 567-571.
- CHUAH, M. I.; FARBMAN, A. I.; MENCO, B. P. (1985). Influence of olfactory bulb on dendritic knob density of rat olfactory receptor neurons in vitro. *Brain Res* 338(2): 259-266.
- CLEMENTE, R.; DE LA TORRE, J. C. (2007). Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein. *J Virol* 81(11): 5968-5977.
- CLEMENTE, R.; DE LA TORRE, J. C. (2009). Cell entry of Borna disease virus follows a clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules. *J Virol* 83(20): 10406-10416.

- CONOMY, J. P.; LEIBOVITZ, A.; MCCOMBS, W.; STINSON, J. (1977). Airborne rabies encephalitis: demonstration of rabies virus in the human central nervous system. *Neurology* 27(1): 67-69.
- CONSTAM, D. B.; ROBERTSON, E. J. (2000). Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development* 127(2): 245-254.
- CORAS, R.; KORN, K.; KUERTEN, S.; HUTTNER, H. B.; ENSSER, A. (2019). Severe bornavirus-encephalitis presenting as Guillain-Barre-syndrome. *Acta Neuropathol* 137(6): 1017-1019.
- CORNWALL, J.; PHILLIPSON, O. T. (1988). Afferent projections to the dorsal thalamus of the rat as shown by retrograde lectin transport--I. The mediodorsal nucleus. *Neuroscience* 24(3): 1035-1049.
- COUTURE, F.; D'ANJOU, F.; DAY, R. (2011). On the cutting edge of proprotein convertase pharmacology: from molecular concepts to clinical applications. *Biomol Concepts* 2(5): 421-438.
- COUTURE, F.; KWIATKOWSKA, A.; DORY, Y. L.; DAY, R. (2015). Therapeutic uses of furin and its inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 25(4): 379-396.
- COZZARELLI, N. R. (1977). The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 46: 641-668.
- CRESPO, C.; LIBERIA, T.; BLASCO-IBANEZ, J. M.; NACHER, J.; VAREA, E. (2019). Cranial Pair I: The Olfactory Nerve. *Anat Rec (Hoboken)* 302(3): 405-427.
- CUBITT, B.; DE LA TORRE, J. C. (1994). Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* 68(3): 1371-1381.
- CUBITT, B.; DE LA TORRE, J. C. (1997). Amantadine does not have antiviral activity against Borna disease virus. *Arch Virol* 142(10): 2035-2042.
- CUBITT, B.; LY, C.; DE LA TORRE, J. C. (2001). Identification and characterization of a new intron in Borna disease virus. *J Gen Virol* 82(Pt 3): 641-646.
- CUBITT, B.; OLDSTONE, C.; DE LA TORRE, J. C. (1994a). Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol* 68(3): 1382-1396.

CUBITT, B.; OLDSTONE, C.; VALCARCEL, J.; CARLOS DE LA TORRE, J. (1994b). RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res* 34(1): 69-79.

CUI, J.; ZHAO, W.; HUANG, Z.; JARVIS, E. D.; GILBERT, M. T.; WALKER, P. J.; HOLMES, E. C.; ZHANG, G. (2014). Low frequency of paleoviral infiltration across the avian phylogeny. *Genome Biol* 15(12): 539.

CUI, Y.; JEAN, F.; THOMAS, G.; CHRISTIAN, J. L. (1998). BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *EMBO J* 17(16): 4735-4743.

DAHMS, S. O.; HARDES, K.; BECKER, G. L.; STEINMETZER, T.; BRANDSTETTER, H.; THAN, M. E. (2014). X-ray structures of human furin in complex with competitive inhibitors. *ACS Chem Biol* 9(5): 1113-1118.

DANNER, KURT (1982). Borna-Virus und Borna-Infektionen. Enke Verlag.

DAVY, C.; DOORBAR, J. (2007). G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology* 368(2): 219-226.

DE BEECK, ANNE OP; CAILLET-FAUQUET, PERRINE (1997). *Viruses and the cell cycle Progress in cell cycle research*: Springer; 1-19.

DE CHIARA, G.; MARCOCCI, M. E.; SGARBANTI, R.; CIVITELLI, L.; RIPOLI, C.; PIACENTINI, R.; GARACI, E.; GRASSI, C.; PALAMARA, A. T. (2012). Infectious agents and neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 46(3): 614-638.

DE LA ROSA-PRIETO, C.; DE MOYA-PINILLA, M.; SAIZ-SANCHEZ, D.; UBEDA-BANON, I.; ARZATE, D. M.; FLORES-CUADRADO, A.; LIBERIA, T.; CRESPO, C.; MARTINEZ-MARCOS, A. (2015). Olfactory and cortical projections to bulbar and hippocampal adult-born neurons. *Front Neuroanat* 9: 4.

DE LA TORRE, J. C. (1994). Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol* 68(12): 7669-7675.

DE LA TORRE, J. C. (2002a). Bornavirus and the brain. *J Infect Dis* 186 Suppl 2: S241-247.

DE LA TORRE, J. C. (2002b). Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Front Biosci* 7: d569-579.

DE LA TORRE, J. C. (2006). Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease virus. *Nat Rev Microbiol* 4(10): 777-783.

DE LORENZO, A. J. (1957). Electron microscopic observations of the olfactory mucosa and olfactory nerve. *J Biophys Biochem Cytol* 3(6): 839-850.

DEGIORGIS, M. P.; BERG, A. L.; HARD AF SEGERSTAD, C.; MORNER, T.; JOHANSSON, M.; BERG, M. (2000). Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *J Clin Microbiol* 38(8): 3087-3091.

DEGTEREV, A.; YUAN, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5): 378-390.

DELNATTE, P.; BERKVEN, C.; KUMMROW, M.; SMITH, D. A.; CAMPBELL, D.; CRAWSHAW, G.; OJKIC, D.; DELAY, J. (2011). New genotype of avian bornavirus in wild geese and trumpeter swans in Canada. *Vet Rec* 169(4): 108.

DESCHL, U.; STITZ, L.; HERZOG, S.; FRESE, K.; ROTT, R. (1990). Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta Neuropathol* 81(1): 41-50.

DETJE, C. N.; LIENENKLAUS, S.; CHHATBAR, C.; SPANIER, J.; PRAJEETH, C. K.; SOLDNER, C.; TOVEY, M. G.; SCHLUTER, D.; WEISS, S.; STANGEL, M.; KALINKE, U. (2015). Upon intranasal vesicular stomatitis virus infection, astrocytes in the olfactory bulb are important interferon Beta producers that protect from lethal encephalitis. *J Virol* 89(5): 2731-2738.

DEVON, R.; DOUCETTE, R. (1992). Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res* 589(1): 175-179.

DEVON, R.; DOUCETTE, R. (1995). Olfactory ensheathing cells do not require L-ascorbic acid in vitro to assemble a basal lamina or to myelinate dorsal root ganglion neurites. *Brain Res* 688(1-2): 223-229.

DITTRICH, W.; BODE, L.; LUDWIG, H.; KAO, M.; SCHNEIDER, K. (1989). Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biol Psychiatry* 26(8): 818-828.

DIXON, W.J. (1993). *BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2*. University of California Press.

DOS SANTOS, M. F.; DEVALLE, S.; ARAN, V.; CAPRA, D.; ROQUE, N. R.; COELHO-AGUIAR, J. M.; SPOHR, T.; CLSE; SUBILHAGA, J. G.; PEREIRA, C. M.; D'ANDREA MEIRA, I.; NIEMEYER

SOARES FILHO, P.; MOURA-NETO, V. (2020). Neuromechanisms of SARS-CoV-2: A Review. *Front Neuroanat* 14: 37.

DOTY, R. L. (2008). The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? *Ann Neurol* 63(1): 7-15.

DOUCETTE, J. R.; KIERNAN, J. A.; FLUMERFELT, B. A. (1983). Two different patterns of retrograde degeneration in the olfactory epithelium following transection of primary olfactory axons. *J Anat* 136(Pt 4): 673-689.

DOUCETTE, R. (1991). PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve. *J Comp Neurol* 312(3): 451-466.

DOUCETTE, R. (1993). Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech* 24(2): 113-130.

DUBOIS, C. M.; LAPRISE, M. H.; BLANCHETTE, F.; GENTRY, L. E.; LEDUC, R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270(18): 10618-10624.

DUPS, J.; MIDDLETON, D.; YAMADA, M.; MONAGHAN, P.; LONG, F.; ROBINSON, R.; MARSH, G. A.; WANG, L. F. (2012). A new model for Hendra virus encephalitis in the mouse. *PLoS One* 7(7): e40308.

DURRANT, D. M.; GHOSH, S.; KLEIN, R. S. (2016). The Olfactory Bulb: An Immunosensory Effector Organ during Neurotropic Viral Infections. *ACS Chem Neurosci* 7(4): 464-469.

DÜRRWALD, R. (1993). Die natürliche Borna Virus Infektion der Einhufer und Schafe, Dissertation. Freie Universität Berlin,

DÜRRWALD, R.; KOLODZIEJEK, J.; HERZOG, S.; NOWOTNY, N. (2007). Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Rev Med Virol* 17(3): 181-203.

DÜRRWALD, R.; KOLODZIEJEK, J.; MULUNEH, A.; HERZOG, S.; NOWOTNY, N. (2006). Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes Infect* 8(3): 917-929.

DÜRRWALD, R.; LUDWIG, H. (1997). Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralbl Veterinarmed B* 44(3): 147-184.

EICKMANN, M.; KIERMAYER, S.; KRAUS, I.; GOSSL, M.; RICHT, J. A.; GARTEN, W. (2005). Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Lett* 579(21): 4751-4756.

EL-HABASHI, N.; EL-NAHASS EL, S.; FUKUSHI, H.; HIBI, D.; SAKAI, H.; SASSEVILLE, V.; YANAI, T. (2010). Experimental intranasal infection of equine herpesvirus 9 (EHV-9) in suckling hamsters: kinetics of viral transmission and inflammation in the nasal cavity and brain. *J Neurovirol* 16(3): 242-248.

ELICES, M. J.; OSBORN, L.; TAKADA, Y.; CROUSE, C.; LUHOWSKYJ, S.; HEMLER, M. E.; LOBB, R. R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 60(4): 577-584.

EMMETT, S. R.; DOVE, B.; MAHONEY, L.; WURM, T.; HISCOX, J. A. (2005). The cell cycle and virus infection. *Methods Mol Biol* 296: 197-218.

ERNST, W.; HAHN, H. (1927). Weitere Beiträge zur Bornaschen Krankheit der Pferde und zur Frage der Ätiologie des bösartigen Katarrhalfiebers der Rinder. *Münch Tierärztl Wschr* 78: 85-89.

ESCADA, P. A.; LIMA, C.; DA SILVA, J. M. (2009). The human olfactory mucosa. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266(11): 1675-1680.

FARBMAN, A. I. (1990). Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 13(9): 362-365.

FARBMAN, A. I.; MARGOLIS, F. L. (1980). Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 74(1): 205-215.

FAVATA, M. F.; HORIUCHI, K. Y.; MANOS, E. J.; DAULERIO, A. J.; STRADLEY, D. A.; FEESER, W. S.; VAN DYK, D. E.; PITTS, W. J.; EARL, R. A.; HOBBS, F.; COPELAND, R. A.; MAGOLDA, R. L.; SCHERLE, P. A.; TRZASKOS, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273(29): 18623-18632.

FERNANDEZ-LARSSON, R.; O'CONNELL, K.; KOUMANS, E.; PATTERSON, J. L. (1989). Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 33(10): 1668-1673.

FERNANDEZ-LARSSON, R.; PATTERSON, J. L. (1990). Ribavirin is an inhibitor of human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Mol Pharmacol* 38(6): 766-770.

FLI, FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT (2018). Humane Infektionen mit dem Borna Disease Virus (BoDV-1). *pid Bull* 2018 10(105).

FLINT, S. J.; ENQUIST, L. W.; RACANIELLO, V. R.; SKALKA, A. M. (2009). Principles of Virology. John Wiley & Sons.

FOLTZ, CHARMAINE; ULLMAN-CULLERE, MOLLIE (1998). Guidelines for Assessing the Health and Condition of Mice. Lab Animal 28.

FRANCESCHINI, I. A.; BARNETT, S. C. (1996). Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. Dev Biol 173(1): 327-343.

FRANKLIN, R. J.; GILSON, J. M.; FRANCESCHINI, I. A.; BARNETT, S. C. (1996). Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory bulb-ensheathing cell line into areas of demyelination in the adult CNS. Glia 17(3): 217-224.

FRIEDL, G.; HOFER, M.; AUBER, B.; SAUDER, C.; HAUSMANN, J.; STAEHEL, P.; PAGENSTECHER, A. (2004). Borna disease virus multiplication in mouse organotypic slice cultures is site-specifically inhibited by gamma interferon but not by interleukin-12. J Virol 78(3): 1212-1218.

FUJINO, K.; HORIE, M.; HONDA, T.; MERRIMAN, D. K.; TOMONAGA, K. (2014). Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. Proc Natl Acad Sci U S A 111(36): 13175-13180.

FUJITA, T. (1977). Concept of paraneurons. Arch Histol Jpn 40 Suppl: 1-12.

FUJITA, TSUNEO; KOBAYASHI, SHIGERU (1979). Current views on the paraneurone concept. Trends Neurosci 2(2): 27-30.

FULLER, R. S.; BRAKE, A. J.; THORNER, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. Science 246(4929): 482-486.

FURRER, E.; BILZER, T.; STITZ, L.; PLANZ, O. (2001). Neutralizing antibodies in persistent borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. J Virol 75(2): 943-951.

FURRER, E.; PLANZ, O.; STITZ, L. (2004). Inhibition of Borna disease virus-mediated cell fusion by monoclonal antibodies directed against the viral glycoprotein. Intervirology 47(2): 108-113.

FURTH, J. J.; COHEN, S. S. (1968). Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-d-arabinofuranoxyladenine. Cancer Res 28(10): 2061-2067.

FURUTA, Y.; GOWEN, B. B.; TAKAHASHI, K.; SHIRAKI, K.; SMEE, D. F.; BARNARD, D. L. (2013). Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res* 100(2): 446-454.

GAGNON, H.; BEAUCHEMIN, S.; KWIATKOWSKA, A.; COUTURE, F.; D'ANJOU, F.; LEVESQUE, C.; DUFOUR, F.; DESBIENS, A. R.; VAILLANCOURT, R.; BERNARD, S.; DESJARDINS, R.; MALOUIN, F.; DORY, Y. L.; DAY, R. (2014). Optimization of furin inhibitors to protect against the activation of influenza hemagglutinin H5 and Shiga toxin. *J Med Chem* 57(1): 29-41.

GALABRU, J.; SARON, M. F.; BERG, M.; BERG, A. L.; HERZOG, S.; LABIE, J.; ZIENTARA, S. (2000). Borna disease virus antibodies in French horses. *Vet Rec* 147(25): 721-722.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19(1): 107-120.

GARTEN, W.; HALLENBERGER, S.; ORTMANN, D.; SCHAFER, W.; VEY, M.; ANGLIKER, H.; SHAW, E.; KLENK, H. D. (1994). Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* 76(3-4): 217-225.

GARTEN, WOLFGANG; KLENK, HANS-DIETER (2008). Cleavage Activation of the Influenza Virus Hemagglutinin and Its Role in Pathogenesis. *Avian Influenza* 27: 156-167.

GASSER, H. S. (1956). Olfactory nerve fibers. *J Gen Physiol* 39(4): 473-496.

GEIGER, K. D.; NASH, T. C.; SAWYER, S.; KRAHL, T.; PATSTONE, G.; REED, J. C.; KRAJEWSKI, S.; DALTON, D.; BUCHMEIER, M. J.; SARVETNICK, N. (1997). Interferon-gamma protects against herpes simplex virus type 1-mediated neuronal death. *Virology* 238(2): 189-197.

GEISS, V.; FRESE, K.; MORALES, J. A.; OJOK, L.; HERZOG, S. (1990). Borna disease virus-induced retinitis in Lewis rats--an immune-mediated retinopathy. *Lens Eye Toxic Res* 7(3-4): 741-751.

GERDES, H. H.; CARVALHO, R. N. (2008). Intercellular transfer mediated by tunneling nanotubes. *Curr Opin Cell Biol* 20(4): 470-475.

GFV, GESELLSCHAFT FÜR VIROLOGIE (2018). Ist das Borna Disease Virus (BDV) ein humanpathogenes Agens? Stellungnahme der Gesellschaft für Virologie.

GILBERT, C.; MEIK, J. M.; DASHEVSKY, D.; CARD, D. C.; CASTOE, T. A.; SCHAAACK, S. (2014). Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proc Biol Sci* 281(1791): 20141122.

GOLDSTEIN, B. J.; SCHWOB, J. E. (1996). Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. *J Neurosci* 16(12): 4005-4016.

GONG, Q.; BAILEY, M. S.; PIXLEY, S. K.; ENNIS, M.; LIU, W.; SHIPLEY, M. T. (1994). Localization and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration. *J Comp Neurol* 344(3): 336-348.

GONG, QIZHI; LIU, WEI-LIN; SRODON, MONICA; FOSTER, TANYA D.; SHIPLEY, MICHAEL T. (1996). Olfactory epithelial organotypic slice cultures: A useful tool for investigating olfactory neural development. *International Journal of Developmental Neuroscience* 14(7-8): 841-852.

GONZALEZ-DUNIA, D.; CUBITT, B.; DE LA TORRE, J. C. (1998). Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol* 72(1): 783-788.

GONZALEZ-DUNIA, D.; CUBITT, B.; GRASSER, F. A.; DE LA TORRE, J. C. (1997a). Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J Virol* 71(4): 3208-3218.

GONZALEZ-DUNIA, D.; SAUDER, C.; DE LA TORRE, J. C. (1997b). Borna disease virus and the brain. *Brain Res Bull* 44(6): 647-664.

GONZALEZ-DUNIA, D.; WATANABE, M.; SYAN, S.; MALLORY, M.; MASLIAH, E.; DE LA TORRE, J. C. (2000). Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J Virol* 74(8): 3441-3448.

GORDON, V. M.; BENZ, R.; FUJII, K.; LEPLA, S. H.; TWETEN, R. K. (1997). Clostridium septicum alpha-toxin is proteolytically activated by furin. *Infect Immun* 65(10): 4130-4134.

GOSZTONYI, G.; BORCHERS, K.; LUDWIG, H. (2009). Pathogenesis of equine herpesvirus-1 infection in the mouse model. *APMIS* 117(1): 10-21.

GOSZTONYI, G.; LUDWIG, H. (1995). Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 39-73.

GRABNER, A.; FISCHER, A. (1991). Symptomatologie und Diagnostik der Borna-Enzephalitis des Pferdes. Eine Fallstudie der letzten 13 Jahre. *Tierärztliche Praxis* 19: 68-73.

GRABNER, A.; HERZOG, S.; HAFNER, A.; SCHMIDT, P. (1998). BDV infections and BD in horses in Germany. Abstracts of the International Bornavirus Meeting, Freiburg.

GRABNER, A.; HERZOG, S.; LANGE-HERBST, H.; FRESE, K. (2002). Die Intra-vitam-Diagnose der Bornaschen Krankheit (BD) bei Equiden. *Pferdeheilkunde* 18: 579-586.

GRAY, P.; HOPPE, S.; SUCHODOLSKI, P.; MIRHOSSEINI, N.; PAYNE, S.; VILLANUEVA, I.; SHIVAPRASAD, H. L.; HONKAVUORI, K. S.; LIPKIN, W. I.; BRIESE, T.; REDDY, S. M.; TIZARD, I. (2010). Use of avian bornavirus isolates to induce proventricular dilatation disease in conures. *Emerg Infect Dis* 16(3): 473-479.

GRAZIADEI, G. A.; GRAZIADEI, P. P. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J Neurocytol* 8(2): 197-213.

GROELZ, D.; VIERTLER, C.; PABST, D.; DETTMANN, N.; ZATLOUKAL, K. (2018). Impact of storage conditions on the quality of nucleic acids in paraffin embedded tissues. *PLoS One* 13(9): e0203608.

GULBRANSEN, B.; SILVER, W.; FINGER, T. E. (2008). Solitary chemoreceptor cell survival is independent of intact trigeminal innervation. *J Comp Neurol* 508(1): 62-71.

GUO, J.; TIZARD, I.; BAROCH, J.; SHIVAPRASAD, H. L.; PAYNE, S. L. (2015). Avian Bornaviruses in North American Gulls. *J Wildl Dis* 51(3): 754-758.

GUSTAFSSON, D.; ELG, M.; LENFORS, S.; BORJESSON, I.; TEGER-NILSSON, A. C. (1996). Effects of inogatran, a new low-molecular-weight thrombin inhibitor, in rat models of venous and arterial thrombosis, thrombolysis and bleeding time. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7(1): 69-79.

HALLENBERGER, S.; BOSCH, V.; ANGLIKER, H.; SHAW, E.; KLENK, H. D.; GARTEN, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360(6402): 358-361.

HALLENSLEBEN, W.; STAEHELI, P. (1999). Inhibition of Borna disease virus multiplication by interferon: cell line differences in susceptibility. *Arch Virol* 144(6): 1209-1216.

HALLENSLEBEN, W.; ZOCHER, M.; STAEHELI, P. (1997). Borna disease virus is not sensitive to amantadine. *Arch Virol* 142(10): 2043-2048.

HAMEED, S. S.; GUO, J.; TIZARD, I.; SHIVAPRASAD, H. L.; PAYNE, S. (2018). Studies on immunity and immunopathogenesis of parrot bornaviral disease in cockatiels. *Virology* 515: 81-91.

HARBERTS, E.; YAO, K.; WOHLER, J. E.; MARIC, D.; OHAYON, J.; HENKIN, R.; JACOBSON, S. (2011). Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(33): 13734-13739.

HARDER, T. C.; OSTERHAUS, A. D. (1997). Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol* 5(3): 120-124.

HARDES, K. (2014). Synthese, Charakterisierung und Anwendung neuer Inhibitoren der Proproteinkonvertase Furin. Philipps-Universität Marburg. Dissertation Fachbereich Pharmazie,

HARDES, K.; BECKER, G. L.; LU, Y.; DAHMS, S. O.; KOHLER, S.; BEYER, W.; SANDVIG, K.; YAMAMOTO, H.; LINDBERG, I.; WALZ, L.; VON MESSLING, V.; THAN, M. E.; GARTEN, W.; STEINMETZER, T. (2015). Novel Furin Inhibitors with Potent Anti-infectious Activity. *ChemMedChem* 10(7): 1218-1231.

HARDES, K.; IVANOVA, T.; THAA, B.; MCINERNEY, G. M.; KLOKK, T. I.; SANDVIG, K.; KUNZEL, S.; LINDBERG, I.; STEINMETZER, T. (2017). Elongated and Shortened Peptidomimetic Inhibitors of the Proprotein Convertase Furin. *ChemMedChem* 12(8): 613-620.

HARRIS, J. A.; WEST, A. K.; CHUAH, M. I. (2009). Olfactory ensheathing cells: nitric oxide production and innate immunity. *Glia* 57(16): 1848-1857.

HATALSKI, C. G.; HICKEY, W. F.; LIPKIN, W. I. (1998). Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol* 90(2): 137-142.

HATALSKI, C. G.; Kliche, S.; STITZ, L.; LIPKIN, W. I. (1995). Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J Virol* 69(2): 741-747.

HATALSKI, C. G.; LEWIS, A. J.; LIPKIN, W. I. (1997). Borna disease. *Emerg Infect Dis* 3(2): 129-135.

HAUSMANN, J.; PAGENSTECHER, A.; BAUR, K.; RICHTER, K.; RZIHA, H. J.; STAEHELI, P. (2005). CD8 T cells require gamma interferon to clear borna disease virus from the

brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. J Virol 79(21): 13509-13518.

HECKMANN, J.; ENDERLEIN, D.; PIEPENBRING, A. K.; HERZOG, S.; HEFFELS-REDMANN, U.; MALBERG, S.; HERDEN, C.; LIERZ, M. (2017). Investigation of Different Infection Routes of Parrot Bornavirus in Cockatiels. Avian Dis 61(1): 90-95.

HEIMRICH, B.; HESSE, D. A.; WU, Y. J.; SCHMID, S.; SCHWEMMLE, M. (2009). Borna disease virus infection alters synaptic input of neurons in rat dentate gyrus. Cell Tissue Res 338(2): 179-190.

HEINIG, A (1955). Die pH-Resistenz des Virus der Bornaschen Krankheit der Pferde. Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin 9: 517-521.

HEINIG, A. (1969). Handbuch der Virusinfektionen der Tiere. Gustav Fischer Verlag.Jena.

HEMACHUDHA, T.; UGOLINI, G.; WACHARAPLUESADEE, S.; SUNGKARAT, W.; SHUANGSHOTI, S.; LAOTHAMATAS, J. (2013). Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis, and management. Lancet Neurol 12(5): 498-513.

HERDEN, C. (2009). Untersuchungen zu Pathogenese, Neurotropismus und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Pathologie. Habilitationsschrift.

HERDEN, C.; BRIESE, T.; LIPKIN, W.; RICHT, J. A. (2013). Bornaviridae Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilki; 1124-1150.

HERDEN, C.; HERZOG, S.; RICHT, J. A.; NESSELER, A.; CHRIST, M.; FAILING, K.; FRESE, K. (2000). Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. Brain Pathol 10(1): 39-48.

HERDEN, C.; SCHLUESENER, H. J.; RICHT, J. A. (2005). Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. Neuropathol Appl Neurobiol 31(5): 512-521.

HERDEN, CHRISTIANE; HERZOG, S.; WEHNER, T.; ZINK, C.; RICHT, JUERGEN; FRESE, K. (1999). Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. Equine Infectious Diseases 8: 286-290.

HERZOG, S.; FRESE, K.; RICHT, J.; ROTT, R. (1994). Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 81: 374-379.

HERZOG, S.; FRESE, K.; ROTT, R. (1991). Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J Gen Virol* 72 (Pt 3): 535-540.

HERZOG, S.; KOMPTER, C.; FRESE, K.; ROTT, R. (1984). Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol* 173(4): 171-177.

HERZOG, S.; PFEUFFER, I.; HABERZETTL, K.; FELDMANN, H.; FRESE, K.; BECHTER, K.; RICHT, J. A. (1997). Molecular characterization of Borna disease virus from naturally infected animals and possible links to human disorders. *Arch Virol Suppl* 13: 183-190.

HERZOG, S.; ROTT, R. (1980). Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol* 168(3): 153-158.

HILBE, M.; HERRSCHE, R.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. (2006). Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg Infect Dis* 12(4): 675-677.

HILDING, A. C. (1967). The role of the respiratory mucosa in health and disease. *Minn Med* 50(6): 915-919.

HIRANO, N.; KAO, M.; LUDWIG, H. (1983). Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol* 64 (Pt 7): 1521-1530.

HOFFMANN, B.; TAPPE, D.; HOPER, D.; HERDEN, C.; BOLDT, A.; MAWRIN, C.; NIEDERSTRASSER, O.; MULLER, T.; JENCKEL, M.; VAN DER GRINTEN, E.; LUTTER, C.; ABENDROTH, B.; TEIFKE, J. P.; CADAR, D.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; ULRICH, R. G.; BEER, M. (2015). A Variegated Squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N Engl J Med* 373(2): 154-162.

HONDA, T.; TOMONAGA, K. (2013). Nucleocytoplasmic shuttling of viral proteins in borna disease virus infection. *Viruses* 5(8): 1978-1990.

HONKAVUORI, K. S.; SHIVAPRASAD, H. L.; WILLIAMS, B. L.; QUAN, P. L.; HORNIG, M.; STREET, C.; PALACIOS, G.; HUTCHISON, S. K.; FRANCA, M.; EGHOLM, M.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I. (2008). Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 14(12): 1883-1886.

HOPPES, S. M.; SHIVAPRASAD, H. L. (2020). Update on Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease: Diagnostics, Pathology, Prevalence, and Control. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 23(2): 337-351.

HORIE, M. (2017). The biological significance of bornavirus-derived genes in mammals. *Curr Opin Virol* 25: 1-6.

HORIE, M.; HONDA, T.; SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, Y.; DAITO, T.; OSHIDA, T.; IKUTA, K.; JERN, P.; GOJOBORI, T.; COFFIN, J. M.; TOMONAGA, K. (2010). Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463(7277): 84-87.

HORIE, M.; TOMONAGA, K. (2019). Paleovirology of bornaviruses: What can be learned from molecular fossils of bornaviruses. *Virus Res* 262: 2-9.

HORNIG, M.; BRIESE, T.; LICINIO, J.; KHABBAZ, R. F.; ALTSHULER, L. L.; POTKIN, S. G.; SCHWEMMLE, M.; SIEMETZKI, U.; MINTZ, J.; HONKAVUORI, K.; KRAEMER, H. C.; EGAN, M. F.; WHYBROW, P. C.; BUNNEY, W. E.; LIPKIN, W. I. (2012). Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry* 17(5): 486-493.

HORNIG, M.; BRIESE, T.; LIPKIN, W. I. (2001). Bornavirus tropism and targeted pathogenesis: virus-host interactions in a neurodevelopmental model. *Adv Virus Res* 56: 557-582.

HORNIG, M.; WEISSENBOCK, H.; HORSCROFT, N.; LIPKIN, W. I. (1999). An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 12102-12107.

HOROWITZ, L. F.; SARAIVA, L. R.; KUANG, D.; YOON, K. H.; BUCK, L. B. (2014). Olfactory receptor patterning in a higher primate. *J Neurosci* 34(37): 12241-12252.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29(4): 577-580.

HUAI, Q.; KIM, H. Y.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; MONDRAGON, A.; LIU, J. O.; KE, H. (2002). Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19): 12037-12042.

HUANG, C. C.; CHEN, K.; HUANG, T. Y. (1995). Immunohistochemical studies of sensory neurons in rat olfactory epithelium. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 252(2): 86-91.

HUME, D. A.; UNDERHILL, D. M.; SWEET, M. J.; OZINSKY, A. O.; LIEW, F. Y.; ADEREM, A. (2001). Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. *BMC Immunol* 2: 11.

HUSSAIN, M.; GALVIN, H. D.; HAW, T. Y.; NUTSFORD, A. N.; HUSAIN, M. (2017). Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist* 10: 121-134.

HYNDMAN, T. H.; SHILTON, C. M.; STENGLEIN, M. D.; WELLEHAN, J. F. X., JR. (2018). Divergent bornaviruses from Australian carpet pythons with neurological disease date the origin of extant Bornaviridae prior to the end-Cretaceous extinction. *PLoS Pathog* 14(2): e1006881.

IHLENBURG, H. (1962). Experimentelle Prüfung der Empfänglichkeit der Ziege für das Virus der Bornaschen Krankheit. *Mh Vet Med* 8: 337-341.

IMAIZUMI, T.; LANKFORD, K. L.; BURTON, W. V.; FODOR, W. L.; KOCSIS, J. D. (2000). Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord. *Nat Biotechnol* 18(9): 949-953.

IMHOFF, H.; VON MESSLING, V.; HERRLER, G.; HAAS, L. (2007). Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *J Virol* 81(8): 4158-4165.

IVANOVA, T. (2017). Beiträge zur Inhibierung der Proproteinkonvertase Furin. Philipps-Universität Marburg Fachbereich Pharmazie Dissertation.

IVANOVA, T.; HARDES, K.; KALLIS, S.; DAHMS, S. O.; THAN, M. E.; KUNZEL, S.; BOTTCHE-FRIEBERTSHAUSER, E.; LINDBERG, I.; JIAO, G. S.; BARTENSCHLAGER, R.; STEINMETZER, T. (2017). Optimization of Substrate-Analogue Furin Inhibitors. *ChemMedChem* 12(23): 1953-1968.

IWASAKI, T.; ITAMURA, S.; NISHIMURA, H.; SATO, Y.; TASHIRO, M.; HASHIKAWA, T.; KURATA, T. (2004). Productive infection in the murine central nervous system with avian influenza virus A (H5N1) after intranasal inoculation. *Acta Neuropathol* 108(6): 485-492.

IWASAKI, Y.; LIU, D. S.; YAMAMOTO, T.; KONNO, H. (1985). On the replication and spread of rabies virus in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 44(2): 185-195.

JACOBSEN, B.; ALGERMISSEN, D.; SCHAUDIEN, D.; VENNER, M.; HERZOG, S.; WENTZ, E.; HEWICKER-TRAUTWEIN, M.; BAUMGARTNER, W.; HERDEN, C. (2010). Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *J Comp Pathol* 143(2-3): 203-208.

JAGOE, R.; STEEL, J. H.; VUCICEVIC, V.; ALEXANDER, N.; VAN NOORDEN, S.; WOOTTON, R.; POLAK, J. M. (1991). Observer variation in quantification of immunocytochemistry by image analysis. *Histochem J* 23(11-12): 541-547.

JEAN, F.; STELLA, K.; THOMAS, L.; LIU, G.; XIANG, Y.; REASON, A. J.; THOMAS, G. (1998). alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7293-7298.

JENKINS, E. K.; DECHANT, M. T.; PERRY, E. B. (2018). When the Nose Doesn't Know: Canine Olfactory Function Associated With Health, Management, and Potential Links to Microbiota. *Front Vet Sci* 5: 56.

JEZIERSKI, TADEUSZ; ENSMINGER, JOHN; PAPET, LE (2016). Canine olfaction science and law: advances in forensic science, medicine, conservation, and environmental remediation. CRC Press.

JIAO, G. S.; CREGAR, L.; WANG, J.; MILLIS, S. Z.; TANG, C.; O'MALLEY, S.; JOHNSON, A. T.; SARETH, S.; LARSON, J.; THOMAS, G. (2006). Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52): 19707-19712.

JOEST, E. K.; DEGEN, K. (1911). Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirnrückenmarksentzündung (BK) des Pferdes. *Zeitschr Inf Krkh Haustiere* 9: 1-98.

JOEST, E.K.; DEGEN, K. (1909). Über eigentümliche intranukleäre Einschlüsse bei der enzootischen Gehirn- und Rückenmarksentzündung. *Zeitschr Inf Krkh Haustiere* 6: 348-356.

JORDAN, I.; BRIESE, T.; AVERETT, D. R.; LIPKIN, W. I. (1999). Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin. *J Virol* 73(9): 7903-7906.

KACZA, J.; VAHLENKAMP, T. W.; ENBERGS, H.; RICHT, J. A.; GERMER, A.; KUHRT, H.; REICHENBACH, A.; MULLER, H.; HERDEN, C.; STAHL, T.; SEEGER, J. (2000). Neuron-glia interactions in the rat retina infected by Borna disease virus. *Arch Virol* 145(1): 127-147.

KALINKE, U.; BECHMANN, I.; DETJE, C. N. (2011). Host strategies against virus entry via the olfactory system. *Virulence* 2(4): 367-370.

KAMHIEH, S.; FLOWER, R. L. (2006). Borna disease virus (BDV) infection in cats. A concise review based on current knowledge. *Vet Q* 28(2): 66-73.

KANAKI, K.; SATO, K.; KASHIWAYANAGI, M. (2000). Functional synapse formation between rat olfactory receptor neurons and olfactory bulb neurons in vitro. *Neurosci Lett* 285(1): 76-78.

KAO, M.; HAMIR, A. N.; RUPPRECHT, C. E.; FU, Z. F.; SHANKAR, V.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. (1993). Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *Vet Rec* 132(10): 241-244.

KARLSON, P.; LUSCHER, M. (1959). Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183(4653): 55-56.

KATAYAMA, S.; HIROSE, H.; TAKAYAMA, K.; NAKASE, I.; FUTAKI, S. (2011). Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J Control Release* 149(1): 29-35.

KATZ, J. B.; ALSTAD, D.; JENNY, A. L.; CARBONE, K. M.; RUBIN, S. A.; WALTRIP, R. W., 2ND (1998). Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest* 10(4): 338-343.

KATZOURAKIS, A.; GIFFORD, R. J. (2010). Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet* 6(11): e1001191.

KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. (1988). Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(2): 324-328.

KEHR, K. (2016). Ausbreitungs- und Persistenzstrategien des Virus der Bornaschen Krankheit in primären corticalen Astrozytenkulturen von Lewis-Ratten. Justus-Liebig-Universität Gießen. Dissertation.

KERN, R. C.; QUINN, B.; ROSSEAU, G.; FARBMAN, A. I. (2000). Post-traumatic olfactory dysfunction. *Laryngoscope* 110(12): 2106-2109.

KIERMAYER, S.; KRAUS, I.; RICHT, J. A.; GARTEN, W.; EICKMANN, M. (2002). Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 531(2): 255-258.

KIM, K. S.; YAMAMOTO, Y.; NAKAOKA, S.; TOMONAGA, K.; IWAMI, S.; HONDA, T. (2020). Modeling Borna Disease Virus In Vitro Spread Reveals the Mode of Antiviral Effect Conferred by an Endogenous Bornavirus-Like Element. *J Virol* 94(21).

KINNUNEN, P. M.; BILICH, C.; EK-KOMMONEN, C.; HENTTONEN, H.; KALLIO, R. K.; NIEMIMAA, J.; PALVA, A.; STAEHELI, P.; VAHERI, A.; VAPALAHTI, O. (2007). Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *J Clin Virol* 38(1): 64-69.

KISTLER, A. L.; GANCZ, A.; CLUBB, S.; SKEWES-COX, P.; FISCHER, K.; SORBER, K.; CHIU, C. Y.; LUBLIN, A.; MECHANI, S.; FARNOUSHI, Y.; GRENINGER, A.; WEN, C. C.; KARLENE, S. B.; GANEM, D.; DERISI, J. L. (2008). Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virol J* 5: 88.

KLENK, H. D.; GARTEN, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol* 2(2): 39-43.

KLENK, H. D.; ROTT, R. (1988). The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv Virus Res* 34: 247-281.

KLIMPEL, K. R.; MOLLOY, S. S.; THOMAS, G.; LEPLA, S. H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10277-10281.

KNOWLES, M. R.; BOUCHER, R. C. (2002). Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest* 109(5): 571-577.

KOBAYASHI, T.; KAMITANI, W.; ZHANG, G.; WATANABE, M.; TOMONAGA, K.; IKUTA, K. (2001). Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J Virol* 75(7): 3404-3412.

KOBAYASHI, T.; SHOYA, Y.; KODA, T.; TAKASHIMA, I.; LAI, P. K.; IKUTA, K.; KAKINUMA, M.; KISHI, M. (1998). Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 243(1): 188-197.

KOBAYASHI, T.; ZHANG, G.; LEE, B. J.; BABA, S.; YAMASHITA, M.; KAMITANI, W.; YANAI, H.; TOMONAGA, K.; IKUTA, K. (2003). Modulation of Borna disease virus phosphoprotein nuclear localization by the viral protein X encoded in the overlapping open reading frame. *J Virol* 77(14): 8099-8107.

KOHNO, T.; GOTO, T.; TAKASAKI, T.; MORITA, C.; NAKAYA, T.; IKUTA, K.; KURANE, I.; SANO, K.; NAKAI, M. (1999). Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 73(1): 760-766.

KOJIMA, S.; SATO, R.; YANAI, M.; KOMATSU, Y.; HORIE, M.; IGARASHI, M.; TOMONAGA, K. (2019). Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms. *J Virol* 93(5).

KOLODZIEJEK, J.; DURRWALD, R.; HERZOG, S.; EHRENSPERGER, F.; LUSSY, H.; NOWOTNY, N. (2005). Genetic clustering of Borna disease virus natural animal isolates, laboratory and vaccine strains strongly reflects their regional geographical origin. *J Gen Virol* 86(Pt 2): 385-398.

KORN, K.; CORAS, R.; BOBINGER, T.; HERZOG, S. M.; LUCKING, H.; STOHR, R.; HUTTNER, H. B.; HARTMANN, A.; ENSSER, A. (2018). Fatal encephalitis associated with Borna disease virus 1. *N Engl J Med* 379(14): 1375-1377.

KOURETOVA, J.; HAMMAMY, M. Z.; EPP, A.; HARDES, K.; KALLIS, S.; ZHANG, L.; HILGENFELD, R.; BARTENSCHLAGER, R.; STEINMETZER, T. (2017). Effects of NS2B-NS3 protease and furin inhibition on West Nile and Dengue virus replication. *J Enzyme Inhib Med Chem* 32(1): 712-721.

KRAUS, I.; BOGNER, E.; LILIE, H.; EICKMANN, M.; GARTEN, W. (2005). Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 579(12): 2686-2692.

KRAUS, I.; EICKMANN, M.; KIERMAYER, S.; SCHEFFCZIK, H.; FLUESS, M.; RICHT, J. A.; GARTEN, W. (2001). Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol* 75(24): 12098-12104.

KROEMER, G.; LEVINE, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(12): 1004-1010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. (2014). Cellular responses to stress and toxic insults: adaptation, injury, and death, In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier; 31-68.

KUPKE, A. (2016). Die Rolle des olfaktorischen Epithels in der initialen Phase der Infektion mit dem neurotrophen Borna disease virus. Justus-Liebig-Universität Gießen. Dissertation.

KUPKE, A.; BECKER, S.; WEWETZER, K.; AHLEMEYER, B.; EICKMANN, M.; HERDEN, C. (2019). Intranasal Borna Disease Virus (BoDV-1) Infection: Insights into Initial Steps and Potential Contagiosity. *Int J Mol Sci* 20(6).

KWIATKOWSKA, A.; COUTURE, F.; LEVESQUE, C.; LY, K.; BEAUCHEMIN, S.; DESJARDINS, R.; NEUGEBAUER, W.; DORY, Y. L.; DAY, R. (2016). Novel insights into structure-activity relationships of N-terminally modified PACE4 inhibitors. *ChemMedChem* 11(3): 289-301.

LABITZKE, T. (2011). Ausbreitung und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit in primären Zellkulturen des Zentralen Nervensystems. Philipps-Universität Marburg. Masterarbeit.

LAFAY, F.; COULON, P.; ASTIC, L.; SAUCIER, D.; RICHE, D.; HOLLEY, A.; FLAMAND, A. (1991). Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology* 183(1): 320-330.

LATNEY, L. V.; WELLEHAN, J. F. X. (2020). Selected emerging infectious diseases of squamata: an update. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 23(2): 353-371.

LEBELT, J.; HAGENAU, K. (1996). [Distribution of Borna disease virus in naturally infected animals with clinical disease]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 109(5): 178-183.

LEDUC, R.; MOLLOY, S. S.; THORNE, B. A.; THOMAS, G. (1992). Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J Biol Chem* 267(20): 14304-14308.

LEE, B. J.; MATSUNAGA, H.; IKUTA, K.; TOMONAGA, K. (2008). Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. *Antiviral Res* 80(3): 380-384.

LENNARTZ, F.; BAYER, K.; CZERWONKA, N.; LU, Y.; KEHR, K.; HIRZ, M.; STEINMETZER, T.; GARTEN, W.; HERDEN, C. (2016). Surface glycoprotein of Borna disease virus mediates virus spread from cell to cell. *Cell Microbiol* 18(3): 340-354.

LEUNG, CHEUK T.; COULOMBE, PIERRE A.; REED, RANDALL R. (2007). Contribution of olfactory neural stem cells to tissue maintenance and regeneration. *Nature Neuroscience* 10: 720.

LI, D.; LEI, Y.; DENG, J.; ZHOU, C.; ZHANG, Y.; LI, W.; HUANG, H.; CHENG, S.; ZHANG, H.; ZHANG, L.; HUANG, R.; LIU, X.; MA, L.; WANG, X.; LI, J.; XIE, P. (2013). Human but Not Laboratory Borna Disease Virus Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Oligodendrocytes In Vitro. *PLoS One* 8(6): e66623.

LI, L.; ADNAN, H.; XU, B.; WANG, J.; WANG, C.; LI, F.; TANG, K. (2015). Effects of transplantation of olfactory ensheathing cells in chronic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. *Eur Spine J* 24(5): 919-930.

LI, Y.; FIELD, P. M.; RAISMAN, G. (1997). Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science* 277(5334): 2000-2002.

LI, Y.; FIELD, P. M.; RAISMAN, G. (2005a). Olfactory ensheathing cells and olfactory nerve fibroblasts maintain continuous open channels for regrowth of olfactory nerve fibres. *Glia* 52(3): 245-251.

LI, Y.; LI, D.; RAISMAN, G. (2005b). Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *J Neurocytol* 34(3-5): 343-351.

LIEB, K.; HALLENSLEBEN, W.; CZYGAN, M.; STITZ, L.; STAEHELI, P. (1997). No Borna disease virus-specific RNA detected in blood from psychiatric patients in different regions of Germany. The Bornavirus Study Group. *Lancet* 350(9083): 1002.

LIEB, K.; STAEHEL, P. (2001). Borna disease virus--does it infect humans and cause psychiatric disorders? *J Clin Virol* 21(2): 119-127.

LIESCHE, F.; RUF, V.; ZOUBAA, S.; KALETKA, G.; ROSATI, M.; RUBBENSTROTH, D.; HERDEN, C.; GOEHRING, L.; WUNDERLICH, S.; WACHTER, M. F.; RIEDER, G.; LICHTMANNEGGER, I.; PERMANETTER, W.; HECKMANN, J. G.; ANGSTWURM, K.; NEUMANN, B.; MARKL, B.; HASCHKA, S.; NILLER, H. H.; SCHMIDT, B.; JANTSCH, J.; BROCHHAUSEN, C.; SCHLOTTAU, K.; EBINGER, A.; HEMMER, B.; RIEMENSCHNEIDER, M. J.; HERMS, J.; BEER, M.; MATIASSEK, K.; SCHLEGEL, J. (2019). The neuropathology of fatal encephalomyelitis in human Borna virus infection. *Acta Neuropathol* 138(4): 653-665.

LIMA, C.; ESCADA, P.; PRATAS-VITAL, J.; BRANCO, C.; ARCANGELI, C. A.; LAZZERI, G.; MAIA, C. A.; CAPUCHO, C.; HASSE-FERREIRA, A.; PEDUZZI, J. D. (2010). Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 24(1): 10-22.

LIMA, M.; SIOKAS, V.; ALOIZOU, A. M.; LIAMPAS, I.; MENTIS, A. A.; TSOURIS, Z.; PAPADIMITRIOU, A.; MITSIAS, P. D.; TSATSAKIS, A.; BOGDANOS, D. P.; BALOYANNIS, S. J.; DARDIOTIS, E. (2020). Unraveling the Possible Routes of SARS-COV-2 Invasion into the Central Nervous System. *Curr Treat Options Neurol* 22(11): 37.

LIPKIN, W. I.; BRIESE, T.; HORNIG, M. (2011). Borna disease virus - fact and fantasy. *Virus Res* 162(1-2): 162-172.

LISCHKA, F. W.; EFTHYMIU, A.; ZHOU, Q.; NIEVES, M. D.; MCCORMACK, N. M.; WILKERSON, M. D.; SUKUMAR, G.; DALGARD, C. L.; DOUGHTY, M. L. (2018). Neonatal mouse cortical but not isogenic human astrocyte feeder layers enhance the functional maturation of induced pluripotent stem cell-derived neurons in culture. *Glia* 66(4): 725-748.

LIU, N.; SHIELDS, C. B.; ROISEN, F. J. (1998). Primary culture of adult mouse olfactory receptor neurons. *Exp Neurol* 151(2): 173-183.

LIU, S.; MOAYERI, M.; LEPLA, S. H. (2014a). Anthrax lethal and edema toxins in anthrax pathogenesis. *Trends Microbiol* 22(6): 317-325.

LIU, X.; ZHAO, L.; YANG, Y.; BODE, L.; HUANG, H.; LIU, C.; HUANG, R.; ZHANG, L.; WANG, X.; ZHANG, L.; LIU, S.; ZHOU, J.; LI, X.; HE, T.; CHENG, Z.; XIE, P. (2014b). Human borna disease virus infection impacts host proteome and histone lysine acetylation in human oligodendroglia cells. *Virology* 464-465: 196-205.

LOMBARDI, J. R.; VANDENBERGH, J. G. (1977). Pheromonally induced sexual maturation in females: regulation by the social environment of the male. *Science* 196(4289): 545-546.

LU, Y.; HARDES, K.; DAHMS, S. O.; BOTTCHE-FRIEBERTSHAUSER, E.; STEINMETZER, T.; THAN, M. E.; KLENK, H. D.; GARTEN, W. (2015). Peptidomimetic furin inhibitor MI-701 in combination with oseltamivir and ribavirin efficiently blocks propagation of highly pathogenic avian influenza viruses and delays high level oseltamivir resistance in MDCK cells. *Antiviral Res* 120: 89-100.

LUDWIG, H. (2008). Essentials in bornavirus virology--an epilogue. *APMIS Suppl* (124): 94-97.

LUDWIG, H.; BODE, L. (2000). Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev Sci Tech* 19(1): 259-288.

LUDWIG, H.; KRAFT, W.; KAO, M.; GOSZTONYI, G.; DAHME, E.; KREY, H. (1985). [Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice]. *Tierarztl Prax* 13(4): 421-453.

LUDWIG, T. H.; BECHT, H.; GROH, L. (1973). Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Med Microbiol Immunol* 158(4): 275-289.

LUNDGREN, A. L.; CZECH, G.; BODE, L.; LUDWIG, H. (1993). Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *Zentralbl Veterinarmed B* 40(4): 298-303.

LUNDGREN, A. L.; LUDWIG, H. (1993). Clinically diseased cats with non-suppurative meningoencephalomyelitis have Borna disease virus-specific antibodies. *Acta Vet Scand* 34(1): 101-103.

LUNDGREN, A. L.; ZIMMERMANN, W.; BODE, L.; CZECH, G.; GOSZTONYI, G.; LINDBERG, R.; LUDWIG, H. (1995). Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. *J Gen Virol* 76 (Pt 9): 2215-2222.

MACKAY-SIM, A.; FERON, F.; COCHRANE, J.; BASSINGTHWAIGHTE, L.; BAYLISS, C.; DAVIES, W.; FRONEK, P.; GRAY, C.; KERR, G.; LICINA, P.; NOWITZKE, A.; PERRY, C.; SILBURN, P. A.; URQUHART, S.; GERAGHTY, T. (2008). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain* 131(Pt 9): 2376-2386.

MAGRASSI, L.; GRAZIADEI, P. P. (1995). Cell death in the olfactory epithelium. *Anat Embryol (Berl)* 192(1): 77-87.

MALBON, A. J.; DÜRRWALD, R.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; KOBERA, R.; PÖHLE, D.; MULUNEH, A.; DERVAS, E.; CEBRA, C.; STEFFEN, F.; PATERNOSTER, G.; GERSPACH, C.; HILBE, M. (2021). New World camelids are sentinels for the presence of Borna disease virus. *Transbound Emerg Dis*.

MARKOPOULOS, F.; NEUBAUER, F. B.; BERGER, T.; SCOTTI, A. L. (2008). Reassembling a system from the sensor to cerebral representation: the olfactory system in vitro. *Neuroscience* 156(4): 1048-1063.

MASON, W. A. (1959). Development of communication between young rhesus monkeys. *Science* 130(3377): 712-713.

MATSUMOTO, Y.; HAYASHI, Y.; OMORI, H.; HONDA, T.; DAITO, T.; HORIE, M.; IKUTA, K.; FUJINO, K.; NAKAMURA, S.; SCHNEIDER, U.; CHASE, G.; YOSHIMORI, T.; SCHWEMMLE, M.; TOMONAGA, K. (2012). Bornavirus closely associates and segregates with host chromosomes to ensure persistent intranuclear infection. *Cell Host Microbe* 11(5): 492-503.

MAYER, D.; BAGINSKY, S.; SCHWEMMLE, M. (2005). Isolation of viral ribonucleoprotein complexes from infected cells by tandem affinity purification. *Proteomics* 5(17): 4483-4487.

MAYR, A.; DANNER, K. (1974). Persistent infections caused by Borna virus. *Infection* 2(2): 64-69.

MAZUMDAR, S. (2009). Raxibacumab. *MAbs* 1(6): 531-538.

MBIKAY, M.; SIROIS, F.; YAO, J.; SEIDAH, N. G.; CHRETIEN, M. (1997). Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer* 75(10): 1509-1514.

MCCONKEY, D. J. (1998). Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 99(3): 157-168.

MEI, J.; KONG, H.; ZHAO, Z.; CHEN, Z.; WANG, Y.; YANG, J. (2020). Shufengjiedu capsules protect against neuronal loss in olfactory epithelium and lung injury by enhancing autophagy in rats with allergic rhinitis. *Biosci Trends* 13(6): 530-538.

MENDONCA, J. C.; DOLCI, J. E. (2005). Neuropeptide immunofluorescence in human nasal mucosa: assessment of the technique for vasoactive intestinal peptide (VIP). *Braz J Otorhinolaryngol* 71(2): 123-131.

METZLER, A.; FREI, U.; DANNER, K. (1976). [Virologically confirmed outbreak of Borna's disease in a Swiss herd of sheep]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 118(11): 483-492.

MILLER, A. M.; TRELOAR, H. B.; GREER, C. A. (2010). Composition of the migratory mass during development of the olfactory nerve. *J Comp Neurol* 518(24): 4825-4841.

MIZUTANI, T.; INAGAKI, H.; ARAKI, K.; KARIWA, H.; ARIKAWA, J.; TAKASHIMA, I. (1998). Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin in persistently infected cells. *Arch Virol* 143(10): 2039-2044.

MODROW, S.; FALKE, D.; TRUYEN, U.; SCHÄTZL, H. (2010). *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.

MONATH, T. P.; CROPP, C. B.; HARRISON, A. K. (1983). Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab Invest* 48(4): 399-410.

MORALES, J. A.; HERZOG, S.; KOMPTER, C.; FRESE, K.; ROTT, R. (1988). Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol* 177(2): 51-68.

MORI, I. (2015). Transolfactory neuroinvasion by viruses threatens the human brain. *Acta Virol* 59(4): 338-349.

MORI, I.; GOSHIMA, F.; IMAI, Y.; KOHSAKA, S.; SUGIYAMA, T.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T.; NISHIYAMA, Y.; KIMURA, Y. (2002). Olfactory receptor neurons prevent dissemination of neurovirulent influenza A virus into the brain by undergoing virus-induced apoptosis. *J Gen Virol* 83(Pt 9): 2109-2116.

MORI, I.; NISHIYAMA, Y.; YOKOCHI, T.; KIMURA, Y. (2005). Olfactory transmission of neurotropic viruses. *J Neurovirol* 11(2): 129-137.

MORRIS, N. M.; UDRY, J. R. (1978). Pheromonal influences on human sexual behavior: an experimental search. *J Biosoc Sci* 10(2): 147-157.

MORRISON, E. E.; COSTANZO, R. M. (1989). Scanning electron microscopic study of degeneration and regeneration in the olfactory epithelium after axotomy. *J Neurocytol* 18(3): 393-405.

MORRISON, E. E.; COSTANZO, R. M. (1992). Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microsc Res Tech* 23(1): 49-61.

MOSIMANN, B. L.; WHITE, M. V.; HOHMAN, R. J.; GOLDRICH, M. S.; KAULBACH, H. C.; KALINER, M. A. (1993). Substance P, calcitonin gene-related peptide, and vasoactive intestinal peptide increase in nasal secretions after allergen challenge in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 92(1 Pt 1): 95-104.

MOULTON, D. G.; BEIDLER, L. M. (1967). Structure and function in the peripheral olfactory system. *Physiol Rev* 47(1): 1-52.

MUNSTER, V. J.; PRESCOTT, J. B.; BUSHMAKER, T.; LONG, D.; ROSENKE, R.; THOMAS, T.; SCOTT, D.; FISCHER, E. R.; FELDMANN, H.; DE WIT, E. (2012). Rapid Nipah virus entry into the central nervous system of hamsters via the olfactory route. *Sci Rep* 2: 736.

MUSSER, J. M.; HEATLEY, J. J.; KOINIS, A. V.; SUCHODOLSKI, P. F.; GUO, J.; ESCANDON, P.; TIZARD, I. R. (2015). Ribavirin inhibits parrot bornavirus 4 replication in cell culture. *PLoS One* 10(7): e0134080.

NARAYAN, O.; HERZOG, S.; FRESE, K.; SCHEEFERS, H.; ROTT, R. (1983a). Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science* 220(4604): 1401-1403.

NARAYAN, O.; HERZOG, S.; FRESE, K.; SCHEEFERS, H.; ROTT, R. (1983b). Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis* 148(2): 305-315.

NASCIMENTO, R.; COSTA, H.; PARKHOUSE, R. M. (2012). Virus manipulation of cell cycle. *Protoplasma* 249(3): 519-528.

NEUMANN, P.; LIEBER, D.; MEYER, S.; DAUTEL, P.; KERTH, A.; KRAUS, I.; GARTEN, W.; STUBBS, M. T. (2009). Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(10): 3710-3715.

NGUYEN, J. T.; SMEE, D. F.; BARNARD, D. L.; JULANDER, J. G.; GROSS, M.; DE JONG, M. D.; WENT, G. T. (2012). Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin in vivo against susceptible and amantadine-resistant influenza A viruses. *PLoS One* 7(1): e31006.

NICOLAU, S.; GALLOWAY, I.A. (1928). Borna disease and enzootic encephalo-myelitis of sheep and cattle. Privy Council, Med Res Council, Spec Rep Ser, No 121 H M Stat Office, London: 1–115.

NILLER, H. H.; ANGSTWURM, K.; RUBBENSTROTH, D.; SCHLOTTAU, K.; EBINGER, A.; GIESE, S.; WUNDERLICH, S.; BANAS, B.; FORTH, L. F.; HOFFMANN, D.; HOPER, D.; SCHWEMMLE, M.; TAPPE, D.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; NOBACH, D.; HERDEN, C.; BROCHHAUSEN, C.; VELEZ-CHAR, N.; MAMILOS, A.; UTPATEL, K.; EVERT, M.; ZOUBAA, S.; RIEMENSCHNEIDER, M. J.; RUF, V.; HERMS, J.; RIEDER, G.; ERRATH, M.; MATIASSEK, K.; SCHLEGEL, J.; LIESCHE-STARNECKER, F.; NEUMANN, B.; FUCHS, K.; LINKER, R. A.; SALZBERGER, B.; FREILINGER, T.; GARTNER, L.; WENZEL, J. J.; REISCHL, U.; JILG, W.; GESSNER, A.; JANTSCH, J.; BEER, M.; SCHMIDT, B. (2020). Zoonotic spillover infections with Borna disease virus 1 leading to fatal human encephalitis, 1999-2019: an epidemiological investigation. *Lancet Infect Dis*.

NOBACH, D.; BOURG, M.; HERZOG, S.; LANGE-HERBST, H.; ENCARNACAO, J. A.; EICKMANN, M.; HERDEN, C. (2015). Shedding of infectious Borna disease virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. *PLoS One* 10(8): e0137018.

NOBACH, D.; MÜLLER, J.; TAPPE, D.; HERDEN, C. (2020). Update on immunopathology of bornavirus infections in humans and animals. *Adv Virus Res* 107: 159-222.

NOWOTNY, N.; WEISSENBOCK, H. (1995). Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis ("staggering disease") and studies of its etiology. *J Clin Microbiol* 33(6): 1668-1669.

OBERDORSTER, G.; SHARP, Z.; ATUDOREI, V.; ELDER, A.; GELEIN, R.; KREYLING, W.; COX, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16(6-7): 437-445.

OKAMOTO, M.; KAGAWA, Y.; KAMITANI, W.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; IWAI, H.; IKUTA, K.; TANIYAMA, H. (2002). Borna disease in a dog in Japan. *J Comp Pathol* 126(4): 312-317.

ORTMANN, D.; OHUCHI, M.; ANGLIKER, H.; SHAW, E.; GARTEN, W.; KLENK, H. D. (1994). Proteolytic cleavage of wild type and mutants of the F protein of human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, furin and Kex2. *J Virol* 68(4): 2772-2776.

OWENS; FLORES; DI SERIO, FRANCESCO; LI, SHIFANG; PALLÁS, VICENTE; RANDLES, JOHN; SANO; VIDALAKIS (2012). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*; 1221-1234.

OZDEN, S.; LUCAS-HOURANI, M.; CECCALDI, P. E.; BASAK, A.; VALENTINE, M.; BENJANNET, S.; HAMELIN, J.; JACOB, Y.; MAMCHAOU, K.; MOULY, V.; DESPRES, P.; GESSAIN, A.; BUTLER-BROWNE, G.; CHRETIEN, M.; TANGY, F.; VIDALAIN, P. O.; SEIDAH, N. G. (2008). Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J Biol Chem* 283(32): 21899-21908.

PARKER, D.; PRINCE, A. (2011). Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45(2): 189-201.

PASQUATO, A.; RAMOS DA PALMA, J.; GALAN, C.; SEIDAH, N. G.; KUNZ, S. (2013). Viral envelope glycoprotein processing by proprotein convertases. *Antiviral Res* 99(1): 49-60.

PATERSON, R. G.; SHAUGHNESSY, M. A.; LAMB, R. A. (1989). Analysis of the relationship between cleavability of a paramyxovirus fusion protein and length of the connecting peptide. *J Virol* 63(3): 1293-1301.

PATTERSON, J. L.; FERNANDEZ-LARSSON, R. (1990). Molecular mechanisms of action of ribavirin. *Rev Infect Dis* 12(6): 1139-1146.

PAULI, G.; LUDWIG, H. (1985). Increase of virus yields and releases of Borna disease virus from persistently infected cells. *Virus Res* 2(1): 29-33.

PELLIER, V.; ASTIC, L. (1994). Cell death in the developing olfactory epithelium of rat embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 79(2): 307-315.

PENG, G.; ZHANG, F.; ZHANG, Q.; WU, K.; ZHU, F.; WU, J. (2007). Borna disease virus P protein inhibits nitric oxide synthase gene expression in astrocytes. *Virology* 366(2): 446-452.

PEREZ, M.; DE LA TORRE, J. C. (2005). Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *J Gen Virol* 86(Pt 7): 1891-1895.

PEREZ, M.; SANCHEZ, A.; CUBITT, B.; ROSARIO, D.; DE LA TORRE, J. C. (2003). A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* 84(Pt 11): 3099-3104.

PEREZ, M.; WATANABE, M.; WHITT, M. A.; DE LA TORRE, J. C. (2001). N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol* 75(15): 7078-7085.

PETTE, H.; KÖRNYEY, S. (1935). Über die Pathogenese und die Histologie der Bornaschen Krankheit im Tierexperiment. *Dtsch Z Nervenheilkd* 136: 20–63.

PETZOLD, J.; VAN DEN BRAND, J. M. A.; NOBACH, D.; HOFFMANN, B.; HOFFMANN, D.; FAST, C.; REUSKEN, CBEM; VAN RUN, PRWA; SCHLOTTAU, K.; BEER, M.; HERDEN, C. (2019). Distribution of zoonotic variegated squirrel bornavirus 1 in naturally infected variegated and Prevost's squirrels. *Sci Rep* 9(1): 11402.

PIEPENBRING, A. K.; ENDERLEIN, D.; HERZOG, S.; AL-IBADI, B.; HEFFELS-REDMANN, U.; HECKMANN, J.; LANGE-HERBST, H.; HERDEN, C.; LIERZ, M. (2016). Parrot Bornavirus (PaBV)-2 isolate causes different disease patterns in cockatiels than PaBV-4. *Avian Pathol* 45(2): 156-168.

PIEPENBRING, A. K.; ENDERLEIN, D.; HERZOG, S.; KALETA, E. F.; HEFFELS-REDMANN, U.; RESSMEYER, S.; HERDEN, C.; LIERZ, M. (2012). Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerg Infect Dis* 18(2): 234-241.

PILGRAM, O.; VAN LAM VAN, T. ; BESTLE, D.; HEINDL, M. R.; FRIEBERTSHÄUSER, E.; T., STEINMETZER (2020). Inhibition of virus-activating host cell proteases – A promising strategy for the treatment of life-threatening virus infections

PIXLEY, S. K. (1992a). The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro. *Glia* 5(4): 269-284.

PIXLEY, S. K. (1992b). Purified cultures of keratin-positive olfactory epithelial cells: identification of a subset as neuronal supporting (sustentacular) cells. *J Neurosci Res* 31(4): 693-707.

PLANZ, O.; BILZER, T.; STITZ, L. (1995). Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *J Virol* 69(2): 896-903.

PLANZ, O.; PLESCHKA, S.; LUDWIG, S. (2001). MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J Virol* 75(10): 4871-4877.

PLANZ, O.; PLESCHKA, S.; WOLFF, T. (2009). Borna disease virus: a unique pathogen and its interaction with intracellular signalling pathways. *Cell Microbiol* 11(6): 872-879.

POENISCH, M.; BURGER, N.; STAEHELI, P.; BAUER, G.; SCHNEIDER, U. (2009). Protein X of Borna disease virus inhibits apoptosis and promotes viral persistence in the central nervous systems of newborn-infected rats. *J Virol* 83(9): 4297-4307.

POENISCH, M.; STAEHELI, P.; SCHNEIDER, U. (2008). Viral accessory protein X stimulates the assembly of functional Borna disease virus polymerase complexes. *J Gen Virol* 89(Pt 6): 1442-1445.

POENISCH, M.; UNTERSTAB, G.; WOLFF, T.; STAEHELI, P.; SCHNEIDER, U. (2004). The X protein of Borna disease virus regulates viral polymerase activity through interaction with the P protein. *J Gen Virol* 85(Pt 7): 1895-1898.

POROMBKA, D. (2006). Untersuchungen zur Transkription, Replikation und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit im Gehirn von experimentell infizierten Lewis Ratten mittels real-time RT-PCR. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover. Dissertation.

POROMBKA, D.; BAUMGARTNER, W.; EICKMANN, M.; HERDEN, C. (2008a). Implications for a regulated replication of Borna disease virus in brains of experimentally infected Lewis rats. *Virus Genes* 36(2): 415-420.

POROMBKA, D.; BAUMGARTNER, W.; HERDEN, C. (2008b). A rapid method for gene expression analysis of Borna disease virus in neurons and astrocytes using laser microdissection and real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 148(1-2): 58-65.

POROMBKA, D.; HERZOG, S.; BAUMGARTNER, W.; HERDEN, C. (2006). Preservation of RNA and destruction of infectivity in microdissected brain tissues of Lewis rats infected with the Borna disease virus. *J Virol Methods* 135(2): 247-253.

PRAT, C. M.; SCHMID, S.; FARRUGIA, F.; CENAC, N.; LE MASSON, G.; SCHWEMMLE, M.; GONZALEZ-DUNIA, D. (2009). Mutation of the protein kinase C site in borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling and restores normal synaptic activity. *PLoS Pathog* 5(5): e1000425.

PRIESTNALL, S. L.; SCHONIGER, S.; IVENS, P. A.; EICKMANN, M.; BRACHTHAUSER, L.; KEHR, K.; TUPPER, C.; PIERCY, R. J.; MENZIES-GOW, N. J.; HERDEN, C. (2011). Borna disease virus infection of a horse in Great Britain. *Vet Rec* 168(14): 380b.

PRINGLE, C. R. (1996). Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch Virol* 141(11): 2251-2256.

PUORGER, M. E.; HILBE, M.; MULLER, J. P.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; ZLINSZKY, K.; EHRENSPERGER, F. (2010). Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol* 47(2): 236-244.

PYPER, J. M.; GARTNER, A. E. (1997). Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of Borna disease virus. *J Virol* 71(7): 5133-5139.

QIAN, J.; ZHAI, A.; KAO, W.; LI, Y.; SONG, W.; FU, Y.; CHEN, X.; ZHANG, Q.; WU, J.; LI, H.; ZHONG, Z.; LING, H.; ZHANG, F. (2010). Modulation of miR-122 on persistently Borna disease virus infected human oligodendroglial cells. *Antiviral Res* 87(2): 249-256.

RADTKE, C.; SASAKI, M.; LANKFORD, K. L.; GALLO, V.; KOCSIS, J. D. (2011). CNPase expression in olfactory ensheathing cells. *J Biomed Biotechnol* 2011: 608496.

RAMON-CUETO, A.; AVILA, J. (1998). Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull* 46(3): 175-187.

RAMON-CUETO, A.; CORDERO, M. I.; SANTOS-BENITO, F. F.; AVILA, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25(2): 425-435.

RAMON-CUETO, A.; NIETO-SAMPEDRO, M. (1994). Regeneration into the spinal cord of transected dorsal root axons is promoted by ensheathing glia transplants. *Exp Neurol* 127(2): 232-244.

RAMON-CUETO, A.; PLANT, G. W.; AVILA, J.; BUNGE, M. B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18(10): 3803-3815.

RANKIN, J. T., JR.; EPPES, S. B.; ANTCHAK, J. B.; JOKLIK, W. K. (1989). Studies on the mechanism of the antiviral activity of ribavirin against reovirus. *Virology* 168(1): 147-158.

READ, EFFIE A. (1908). A contribution to the knowledge of the olfactory apparatus in dog, cat and man. *American Journal of Anatomy* 8(1): 17-47.

REISS, C. S.; PLAKHOV, I. V.; KOMATSU, T. (1998). Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain. *Ann N Y Acad Sci* 855: 751-761.

REUTER, A.; HORIE, M.; HOPER, D.; OHNEMUS, A.; NARR, A.; RINDER, M.; BEER, M.; STAEHEL, P.; RUBBENSTROTH, D. (2016). Synergistic antiviral activity of ribavirin and interferon-alpha against parrot bornaviruses in avian cells. *J Gen Virol* 97(9): 2096-2103.

RIBER-HANSEN, R.; VAINER, B.; STEINICHE, T. (2012). Digital image analysis: a review of reproducibility, stability and basic requirements for optimal results. *APMIS* 120(4): 276-289.

RICHT, J. A.; CLEMENTS, J. E.; HERZOG, S.; PYPER, J.; WAHN, K.; BECHT, H. (1993). Analysis of virus-specific RNA species and proteins in Freon-113 preparations of the Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol* 182(5): 271-280.

RICHT, J. A.; FURBRINGER, T.; KOCH, A.; PFEUFFER, I.; HERDEN, C.; BAUSE-NIEDRIG, I.; GARTEN, W. (1998). Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* 72(5): 4528-4533.

RICHT, J. A.; GRABNER, A.; HERZOG, S.; GARTEN, W.; HERDEN, C. (2007). *Equine Infectious Diseases*. Elsevier.Sellon.

RICHT, J. A.; PFEUFFER, I.; CHRIST, M.; FRESE, K.; BECHTER, K.; HERZOG, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis* 3(3): 343-352.

RICHT, J. A.; ROTT, R. (2001). Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet J* 161(1): 24-40.

RICHT, J. A.; SCHMEEL, A.; FRESE, K.; CARBONE, K. M.; NARAYAN, O.; ROTT, R. (1994). Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med* 179(5): 1467-1473.

RICHT, J. A.; STITZ, L. (1992). Borna disease virus-infected astrocytes function in vitro as antigen-presenting and target cells for virus-specific CD4-bearing lymphocytes. *Arch Virol* 124(1-2): 95-109.

RICHT, J. A.; STITZ, L.; WEKERLE, H.; ROTT, R. (1989). Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J Exp Med* 170(3): 1045-1050.

RICHTER, K.; HAUSMANN, J.; STAEHELI, P. (2009). Interferon-gamma prevents death of bystander neurons during CD8 T cell responses in the brain. *Am J Pathol* 174(5): 1799-1807.

RICHTER, M. W.; FLETCHER, P. A.; LIU, J.; TETZLAFF, W.; ROSKAMS, A. J. (2005). Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord. *J Neurosci* 25(46): 10700-10711.

ROBERTS, K. L.; MANICASSAMY, B.; LAMB, R. A. (2015). Influenza A virus uses intercellular connections to spread to neighboring cells. *J Virol* 89(3): 1537-1549.

ROCKWELL, N. C.; KRYSAN, D. J.; KOMIYAMA, T.; FULLER, R. S. (2002). Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem Rev* 102(12): 4525-4548.

ROTT, R.; BECHT, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 17-30.

ROTT, R.; HERZOG, S.; FLEISCHER, B.; WINOKUR, A.; AMSTERDAM, J.; DYSON, W.; KOPROWSKI, H. (1985). Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228(4700): 755-756.

RUBBENSTROTH, D.; RINDER, M.; STEIN, M.; HOPER, D.; KASPERS, B.; BROSIŃSKI, K.; HORIE, M.; SCHMIDT, V.; LEGLER, M.; KORBEL, R.; STAEHELI, P. (2013). Avian bornaviruses are widely distributed in canary birds (*Serinus canaria* f. *domestica*). *Vet Microbiol* 165(3-4): 287-295.

RUBBENSTROTH, D.; SCHLOTTAU, K.; SCHWEMMLE, M.; RISSLAND, J.; BEER, M. (2019). Human bornavirus research: Back on track! *PLoS Pathog* 15(8): e1007873.

RUBBENSTROTH, D.; SCHMIDT, V.; RINDER, M.; LEGLER, M.; CORMAN, V. M.; STAEHELI, P. (2014). Discovery of a new avian bornavirus genotype in estrildid finches (Estrildidae) in Germany. *Vet Microbiol* 168(2-4): 318-323.

RUBBENSTROTH, DENNIS; BRIESE, THOMAS; DÜRRWALD, RALF; HORIE, MASAYUKI; HYNDMAN, TIM; NOWOTNY, NORBERT; PAYNE, SUSAN; STENGLEIN, MARK; TOMONAGA, KEIZO; KUHN, JENS (2018a). One (1) new genus including one (1) new species in the family Bornaviridae (order Mononegavirales).

RUBBENSTROTH, DENNIS; SCHWEMMLE, M.; BEER, M.; ENSSER, ARMIN; HENGEL, HARTMUT; SCHMIDT, B.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; VAHLENKAMP, T. W. Stellungnahme der Gesellschaft für Virologie (GfV) zu humanen Infektionen mit dem Borna disease virus 1 (BoDV-1) 2018b.

RUBIN, S. A.; YEDNOCK, T. A.; CARBONE, K. M. (1998). In vivo treatment with anti-alpha4 integrin suppresses clinical and pathological evidence of Borna disease virus infection. *J Neuroimmunol* 84(2): 158-163.

RUDD, P. A.; CATTANEO, R.; VON MESSLING, V. (2006). Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol* 80(19): 9361-9370.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. (1959). The principles of humane experimental technique. Universities federation for animal welfare. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare.

SABIN, ALBERT B.; OLITSKY, PETER K. (1938). Influence of host factors on neuroinvasiveness of vesicular stomatitis virus. *J Exp Med* 67(2): 229-249.

SAKAMOTO, T.; KONDO, K.; KASHIO, A.; SUZUKAWA, K.; YAMASOBA, T. (2007). Methimazole-induced cell death in rat olfactory receptor neurons occurs via apoptosis triggered through mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *J Neurosci Res* 85(3): 548-557.

SAMMIN, D. J.; BUTLER, D.; ATKINS, G. J.; SHEAHAN, B. J. (1999). Cell death mechanisms in the olfactory bulb of rats infected intranasally with Semliki forest virus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25(3): 236-243.

SAUDER, C.; STAEHELI, P. (2003). Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol* 77(23): 12886-12890.

SAUNDERS, C. J.; CHRISTENSEN, M.; FINGER, T. E.; TIZZANO, M. (2014). Cholinergic neurotransmission links solitary chemosensory cells to nasal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(16): 6075-6080.

SCHLABERG, ROBERT (2003). Neuroprotektiver Effekt von Ribavirin bei Borna Disease Virus infizierten Lewis Ratten. Universität Würzburg, Medizinische Fakultät, Dissertation.

SCHLOTTAU, K.; FORTH, L.; ANGSTWURM, K.; HOPER, D.; ZECHER, D.; LIESCHE, F.; HOFFMANN, B.; KEGEL, V.; SEEHOFER, D.; PLATEN, S.; SALZBERGER, B.; LIEBERT, U. G.; NILLER, H. H.; SCHMIDT, B.; MATIASEK, K.; RIEMENSCHNEIDER, M. J.; BROCHHAUSEN, C.; BANAS, B.; RENDERS, L.; MOOG, P.; WUNDERLICH, S.; SEIFERT, C. L.; BARREIROS, A.; RAHMEI, A.; WEISS, J.; TAPPE, D.; HERDEN, C.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; SCHWEMMLE, M.; RUBBENSTROTH, D.; SCHLEGEL, J.; PIETSCH, C.; HOFFMANN, D.; JANTSCH, J.; BEER, M. (2018). Fatal encephalitic Borna disease virus 1 in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med* 379(14): 1377-1379.

SCHLOTTAU, K.; HOFFMANN, B.; HOMEIER-BACHMANN, T.; FAST, C.; ULRICH, R. G.; BEER, M.; HOFFMANN, D. (2017a). Multiple detection of zoonotic variegated squirrel bornavirus 1 RNA in different squirrel species suggests a possible unknown origin for the virus. *Arch Virol* 162(9): 2747-2754.

SCHLOTTAU, K.; JENCKEL, M.; VAN DEN BRAND, J.; FAST, C.; HERDEN, C.; HOPER, D.; HOMEIER-BACHMANN, T.; THIELEBEIN, J.; MENSING, N.; DIENDER, B.; HOFFMANN, D.; ULRICH, R. G.; METTENLEITER, T. C.; KOOPMANS, M.; TAPPE, D.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; REUSKEN, C. B.; BEER, M.; HOFFMANN, B. (2017b). Variegated squirrel bornavirus 1 in squirrels, germany and the netherlands. *Emerg Infect Dis* 23(3): 477-481.

SCHLOTTAU, K.; NOBACH, D.; HERDEN, C.; FINKE, S.; BEER, M.; HOFFMANN, D. (2020). First isolation, in-vivo and genomic characterization of zoonotic variegated squirrel Bornavirus 1 (VSBV-1) isolates. *Emerg Microbes Infect*: 1-49.

SCHMIDT, J. (1912). Untersuchung über das klinische Verhalten der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes nebst Angaben über diesbezügliche therapeutische Versuche. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 28: 581-586.

SCHMIDT, J. (1952). Die Bornakrankheit des Pferdes. 55, Jahre Forschung und Lehre *Arch Exp Veterinärmed* 6: 177-187.

SCHNEEMANN, A.; SCHNEIDER, P. A.; KIM, S.; LIPKIN, W. I. (1994). Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 68(10): 6514-6522.

SCHNEEMANN, A.; SCHNEIDER, P. A.; LAMB, R. A.; LIPKIN, W. I. (1995). The remarkable coding strategy of borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* 210(1): 1-8.

SCHNEIDER, P. A.; HATALSKI, C. G.; LEWIS, A. J.; LIPKIN, W. I. (1997). Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J Virol* 71(1): 331-336.

SCHNEIDER, P. A.; SCHNEEMANN, A.; LIPKIN, W. I. (1994). RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 68(8): 5007-5012.

SCHNEIDER, U. (2005). Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus. *Virus Res* 111(2): 148-160.

SCHNEIDER, U.; BLECHSCHMIDT, K.; SCHWEMMLE, M.; STAEHELI, P. (2004). Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *J Biol Chem* 279(53): 55290-55296.

SCHNEIDER, U.; NAEGELE, M.; STAEHELI, P.; SCHWEMMLE, M. (2003). Active borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* 77(21): 11781-11789.

SCHRAUWEN, E. J.; HERFST, S.; LEIJTEN, L. M.; VAN RUN, P.; BESTEBROER, T. M.; LINSTER, M.; BODEWES, R.; KREIJTZ, J. H.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D.; FOUCHIER, R. A.; KUIKEN, T.; VAN RIEL, D. (2012). The multibasic cleavage site in H5N1 virus is critical for systemic spread along the olfactory and hematogenous routes in ferrets. *J Virol* 86(7): 3975-3984.

SCHROEDER, G. D.; KEPLER, C. K.; VACCARO, A. R. (2016). The use of cell transplantation in spinal cord injuries. *J Am Acad Orthop Surg* 24(4): 266-275.

SCHULZE, V.; GROSSE, R.; FURSTENAU, J.; FORTH, L. F.; EBINGER, A.; RICHTER, M. T.; TAPPE, D.; MERTSCH, T.; KLOSE, K.; SCHLOTTAU, K.; HOFFMANN, B.; HOPER, D.; MUNDHENK, L.; ULRICH, R. G.; BEER, M.; MULLER, K. E.; RUBBENSTROTH, D. (2020). Borna disease outbreak with high mortality in an alpaca herd in a previously unreported endemic area in Germany. *Transbound Emerg Dis*.

SCHUTTE, R. J.; XIE, Y.; NG, N. N.; FIGUEROA, P.; PHAM, A. T.; O'DOWD, D. K. (2018). Astrocyte-enriched feeder layers from cryopreserved cells support differentiation of spontaneously active networks of human iPSC-derived neurons. *J Neurosci Methods* 294: 91-101.

SCHWARDT, M.; MAYER, D.; FRANK, R.; SCHNEIDER, U.; EICKMANN, M.; PLANZ, O.; WOLFF, T.; SCHWEMMLE, M. (2005). The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J Gen Virol* 86(Pt 11): 3163-3169.

SCHWEMMLE, M.; DE, B.; SHI, L.; BANERJEE, A.; LIPKIN, W. I. (1997). Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *J Biol Chem* 272(35): 21818-21823.

SCHWEMMLE, M.; JEHL, C.; FORMELLA, S.; STAEHEL, P. (1999). Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* 354(9194): 1973-1974.

SCHWEMMLE, M.; SALVATORE, M.; SHI, L.; RICHT, J.; LEE, C. H.; LIPKIN, W. I. (1998). Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem* 273(15): 9007-9012.

SCHWOB, J. E.; JANG, W.; HOLBROOK, E. H.; LIN, B.; HERRICK, D. B.; PETERSON, J. N.; HEWITT COLEMAN, J. (2017). Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *J Comp Neurol* 525(4): 1034-1054.

SCOTTI, A. L.; HOFFMANN, M. C.; NITSCH, C. (1994). The neurite growth promoting protease nexin 1 in glial cells of the olfactory bulb of the gerbil: an ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 278(2): 409-413.

SEIDAH, N. G.; BENJANNET, S.; PAREEK, S.; SAVARIA, D.; HAMELIN, J.; GOULET, B.; LALIBERTE, J.; LAZURE, C.; CHRETIEN, M.; MURPHY, R. A. (1996). Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 314 (Pt 3): 951-960.

SEIDAH, N. G.; DAY, R.; MARCINKIEWICZ, M.; CHRETIEN, M. (1998). Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci* 839: 9-24.

SEIDEN, A. M. (2004). Postviral olfactory loss. *Otolaryngol Clin North Am* 37(6): 1159-1166.

SHAARI, J.; PALMER, J. N.; CHIU, A. G.; JUDY, K. D.; COHEN, A. S.; KENNEDY, D. W.; COHEN, N. A. (2006). Regional analysis of sinonasal ciliary beat frequency. *Am J Rhinol* 20(2): 150-154.

SHANKAR, V.; KAO, M.; HAMIR, A. N.; SHENG, H.; KOPROWSKI, H.; DIETZSCHOLD, B. (1992). Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *J Virol* 66(2): 992-998.

SHEN, S.; KEPP, O.; KROEMER, G. (2012). The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8(1): 1-3.

SHI, M.; LIN, X. D.; CHEN, X.; TIAN, J. H.; CHEN, L. J.; LI, K.; WANG, W.; EDEN, J. S.; SHEN, J. J.; LIU, L.; HOLMES, E. C.; ZHANG, Y. Z. (2018). The evolutionary history of vertebrate RNA viruses. *Nature* 556(7700): 197-202.

SLEIGH, M. A.; BLAKE, J. R.; LIRON, N. (1988). The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis* 137(3): 726-741.

SMITH, A. E.; HELENIUS, A. (2004). How viruses enter animal cells. *Science* 304(5668): 237-242.

SMITH, G. (2012). Herpesvirus transport to the nervous system and back again. *Annu Rev Microbiol* 66: 153-176.

SOLBRIG, M. V.; SCHLABERG, R.; BRIESE, T.; HORSCROFT, N.; LIPKIN, W. I. (2002). Neuroprotection and reduced proliferation of microglia in ribavirin-treated bornavirus-infected rats. *Antimicrob Agents Chemother* 46(7): 2287-2291.

SONIGRA, R. J.; KANDIAH, S. S.; WIGLEY, C. B. (1996). Spontaneous immortalisation of ensheathing cells from adult rat olfactory nerve. *Glia* 16(3): 247-256.

SPAETE, R. R.; SAXENA, A.; SCOTT, P. I.; SONG, G. J.; PROBERT, W. S.; BRITT, W. J.; GIBSON, W.; RASMUSSEN, L.; PACHL, C. (1990). Sequence requirements for proteolytic processing of glycoprotein B of human cytomegalovirus strain Towne. *J Virol* 64(6): 2922-2931.

SPROCKHOFF, H (1955). Untersuchungen über das komplementbindende Antigen in Gehirnen Bornavirus-infizierter Kaninchen: 2. Mitteilung: Zeitliches Auftreten und Verhalten gegen höhere Temperaturen. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 2(3): 231-237.

SPROCKHOFF, H v (1954). Untersuchungen über die Komplementbindungsreaktion bei der Bornaschen Krankheit. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 1(5): 494-503.

STEINMETZER, T.; STURZEBECKER, J. (2004). Progress in the development of synthetic thrombin inhibitors as new orally active anticoagulants. *Curr Med Chem* 11(17): 2297-2321.

STITZ, L. (1991a). Immune intervention in Borna disease, Article in German. *Tierarztl Prax* 19(5): 509-514.

STITZ, L. (1991b). [Immune intervention in Borna disease]. *Tierarztl Prax* 19(5): 509-514.

STITZ, L.; BILZER, T.; PLANZ, O. (2002). The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci* 7: d541-555.

STITZ, L.; DIETZSCHOLD, B.; CARBONE, K. M. (1995). Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 75-92.

STITZ, L.; NOSKE, K.; PLANZ, O.; FURRER, E.; LIPKIN, W. I.; BILZER, T. (1998a). A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* 72(11): 8884-8892.

STITZ, L.; PLANZ, O.; BILZER, T. (1998b). Lack of antiviral effect of amantadine in Borna disease virus infection. *Med Microbiol Immunol* 186(4): 195-200.

STITZ, L.; SOEDER, D.; DESCHL, U.; FRESE, K.; ROTT, R. (1989). Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *J Immunol* 143(12): 4250-4256.

SU, Z.; CHEN, J.; QIU, Y.; YUAN, Y.; ZHU, F.; ZHU, Y.; LIU, X.; PU, Y.; HE, C. (2013). Olfactory ensheathing cells: the primary innate immunocytes in the olfactory pathway to engulf apoptotic olfactory nerve debris. *Glia* 61(4): 490-503.

SUCHY, A.; WEEISSENBOCK, H.; WALLER, R.; SCHMIDT, P.; NOWOTNY, N. (1997). Nachweis der Bornaschen Krankheit bei einem Pferd in Österreich. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 84: 317-321.

SUTHAR, M. S.; DIAMOND, M. S.; GALE, M., JR. (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol* 11(2): 115-128.

TADROUS, P. J. (2010). On the concept of objectivity in digital image analysis in pathology. *Pathology* 42(3): 207-211.

TANIYAMA, H.; OKAMOTO, M.; HIRAYAMA, K.; HAGIWARA, K.; KIRISAWA, R.; KAMITANI, W.; TSUNODA, N.; IKUTA, K. (2001). Equine Borna disease in Japan. *Vet Rec* 148(15): 480-482.

TAPPE, D.; FRANK, C.; HOMEIER-BACHMANN, T.; WILKING, H.; ALLENDORF, V.; SCHLOTTAU, K.; MUNOZ-FONTELA, C.; ROTTSTEGGE, M.; PORT, J. R.; RISSLAND, J.; EISERMANN, P.; BEER, M.; SCHMIDT-CHANASIT, J. (2019a). Analysis of exotic squirrel trade and detection of human infections with variegated squirrel bornavirus 1, Germany, 2005 to 2018. *Euro Surveill* 24(8).

TAPPE, D.; SCHLOTTAU, K.; CADAR, D.; HOFFMANN, B.; BALKE, L.; BEWIG, B.; HOFFMANN, D.; EISERMANN, P.; FICKENSCHER, H.; KRUMBHOLZ, A.; LAUFS, H.; HUHNDOERF, M.; ROSENTHAL, M.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; ISMER, G.; HOTOP, S. K.; BRONSTRUP, M.; OTT, A.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; BEER, M. (2018). Occupation-Associated Fatal Limbic Encephalitis Caused by Variegated Squirrel Bornavirus 1, Germany, 2013. *Emerg Infect Dis* 24(6): 978-987.

TAPPE, D.; SCHMIDT-CHANASIT, J.; RAUCH, J.; ALLARTZ, P.; HERDEN, C. (2019b). Immunopathology of Fatal Human Variegated Squirrel Bornavirus 1 Encephalitis, Germany, 2011-2013. *Emerg Infect Dis* 25(6): 1058-1065.

TENG, H. K.; TENG, K. K.; LEE, R.; WRIGHT, S.; TEVAR, S.; ALMEIDA, R. D.; KERMANI, P.; TORKIN, R.; CHEN, Z. Y.; LEE, F. S.; KRAEMER, R. T.; NYKJAER, A.; HEMPSTEAD, B. L. (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25(22): 5455-5463.

THACKER, C.; ROSE, A. M. (2000). A look at the *Caenorhabditis elegans* Kex2/Subtilisin-like proprotein convertase family. *Bioessays* 22(6): 545-553.

THIEDEMANN, N.; PRESEK, P.; ROTT, R.; STITZ, L. (1992). Antigenic relationship and further characterization of two major Borna disease virus-specific proteins. *J Gen Virol* 73 (Pt 5): 1057-1064.

THOMAS, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(10): 753-766.

THOMSON, B. J. (2001). Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol* 82(2): 65-76.

TIZARD, I.; BALL, J.; STOICA, G.; PAYNE, S. (2016). The pathogenesis of bornaviral diseases in mammals. *Anim Health Res Rev* 17(2): 92-109.

TOKUNAGA, T.; YAMAMOTO, Y.; SAKAI, M.; TOMONAGA, K.; HONDA, T. (2017). Antiviral activity of favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses. *Antiviral Res* 143: 237-245.

TOMONAGA, K.; KOBAYASHI, T.; IKUTA, K. (2002). Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect* 4(4): 491-500.

TOMONAGA, K.; KOBAYASHI, T.; LEE, B. J.; WATANABE, M.; KAMITANI, W.; IKUTA, K. (2000). Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12788-12793.

TRZCINSKA, A.; LASKOWSKA, A.; BRODZKA, I.; SIENNICKA, J. (2012). [Influence of selected preanalytical factors on viral DNA detection by PCR method]. *Med Dosw Mikrobiol* 64(2): 151-158.

TSUNEOKA, M.; NAKAYAMA, K.; HATSUZAWA, K.; KOMADA, M.; KITAMURA, N.; MEKADA, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* 268(35): 26461-26465.

TURK, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5(9): 785-799.

UBINK, R.; HALASZ, N.; ZHANG, X.; DAGERLIND, A.; HOKFELT, T. (1994). Neuropeptide tyrosine is expressed in ensheathing cells around the olfactory nerves in the rat olfactory bulb. *Neuroscience* 60(3): 709-726.

UHLIG, A.; KINNE, J. (1998). Neurologische Befunde bei Pferden mit Bornascher Krankheit. *Prakt Tierarzt XXVIII*: 33-36.

VAHLENKAMP, T. W.; KONRATH, A.; WEBER, M.; MULLER, H. (2002). Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* 76(19): 9735-9743.

VAISHNAV, R. A.; GETCHELL, M. L.; HUANG, L.; HERSH, M. A.; STROMBERG, A. J.; GETCHELL, T. V. (2008). Cellular and molecular characterization of oxidative stress in olfactory epithelium of Harlequin mutant mouse. *J Neurosci Res* 86(1): 165-182.

VALVERDE, F.; LOPEZ-MASCARAQUE, L. (1991). Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol* 307(4): 658-674.

VAN DEN BRAND, J. M.; STITTELAAR, K. J.; VAN AMERONGEN, G.; REPERANT, L.; DE WAAL, L.; OSTERHAUS, A. D.; KUIKEN, T. (2012). Comparison of temporal and spatial dynamics of seasonal H3N2, pandemic H1N1 and highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ferrets. *PLoS One* 7(8): e42343.

VAN DEN POL, A. N.; DALTON, K. P.; ROSE, J. K. (2002). Relative neurotropism of a recombinant rhabdovirus expressing a green fluorescent envelope glycoprotein. *J Virol* 76(3): 1309-1327.

VAN LAM VAN, T.; IVANOVA, T.; HARDES, K.; HEINDL, M. R.; MORTY, R. E.; BOTTCHE-FRIEBERTSHAUSER, E.; LINDBERG, I.; THAN, M. E.; DAHMS, S. O.; STEINMETZER, T. (2019). Design, Synthesis, and Characterization of Macrocyclic Inhibitors of the Proprotein Convertase Furin. *ChemMedChem* 14(6): 673-685.

VAN RIEL, D.; VERDIJK, R.; KUIKEN, T. (2015). The olfactory nerve: a shortcut for influenza and other viral diseases into the central nervous system. *J Pathol* 235(2): 277-287.

VARGAS, G.; LUCERO, M. T. (1999). A method for maintaining odor-responsive adult rat olfactory receptor neurons in short-term culture. *Chem Senses* 24(2): 211-216.

VEY, M.; ORLICH, M.; ADLER, S.; KLENK, H. D.; ROTT, R.; GARTEN, W. (1992). Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* 188(1): 408-413.

- VILLANUEVA, I.; GRAY, P.; TIZARD, I. (2008). Detection of an antigen specific for proventricular dilation disease in psitticine birds. *Vet Rec* 163(14): 426.
- VIRAG, L.; ROBASZKIEWICZ, A.; RODRIGUEZ-VARGAS, J. M.; OLIVER, F. J. (2013). Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med* 34(6): 1153-1167.
- VODOVNIK, A. (2016). Diagnostic time in digital pathology: A comparative study on 400 cases. *J Pathol Inform* 7: 4.
- VOLMER, R.; BAJRAMOVIC, J. J.; SCHNEIDER, U.; UFANO, S.; POCHET, S.; GONZALEZ-DUNIA, D. (2005). Mechanism of the antiviral action of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on Borna disease virus. *J Virol* 79(7): 4514-4518.
- VOLMER, R.; MONNET, C.; GONZALEZ-DUNIA, D. (2006). Borna disease virus blocks potentiation of presynaptic activity through inhibition of protein kinase C signaling. *PLoS Pathog* 2(3): e19.
- VON MESSLING, V.; MILOSEVIC, D.; DEVAUX, P.; CATTANEO, R. (2004). Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol* 78(15): 7894-7903.
- WALKER, M. P.; JORDAN, I.; BRIESE, T.; FISCHER, N.; LIPKIN, W. I. (2000). Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* 74(9): 4425-4428.
- WATANABE, M.; ZHONG, Q.; KOBAYASHI, T.; KAMITANI, W.; TOMONAGA, K.; IKUTA, K. (2000). Molecular ratio between borna disease viral-p40 and -p24 proteins in infected cells determined by quantitative antigen capture ELISA. *Microbiol Immunol* 44(9): 765-772.
- WEHNER, T.; RUPPERT, A.; HERDEN, C.; FRESE, K.; BECHT, H.; RICHT, J. A. (1997). Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J Gen Virol* 78 (Pt 10): 2459-2466.
- WEISSENBOCK, H.; BAKONYI, T.; SEKULIN, K.; EHRENSPERGER, F.; DONELEY, R. J.; DURRWALD, R.; HOOP, R.; ERDELYI, K.; GAL, J.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N. (2009a). Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 15(9): 1453-1459.
- WEISSENBOCK, H.; NOWOTNY, N.; CAPLAZI, P.; KOLODZIEJEK, J.; EHRENSPERGER, F. (1998a). Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol* 36(7): 2127-2130.

WEISSENBOCK, H.; SEKULIN, K.; BAKONYI, T.; HOGLER, S.; NOWOTNY, N. (2009b). Novel avian bornavirus in a nonpsittacine species (Canary; *Serinus canaria*) with enteric ganglioneuritis and encephalitis. *J Virol* 83(21): 11367-11371.

WEISSENBOCK, H.; SUCHY, A.; CAPLAZI, P.; HERZOG, S.; NOWOTNY, N. (1998b). Borna disease in Austrian horses. *Vet Rec* 143(1): 21-22.

WELSCH, S.; MULLER, B.; KRAUSSLICH, H. G. (2007). More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett* 581(11): 2089-2097.

WENSMAN, J. J.; JADERLUND, K. H.; HOLST, B. S.; BERG, M. (2014). Borna disease virus infection in cats. *Vet J* 201(2): 142-149.

WERNER-KEISS, N.; GARTEN, W.; RICHT, J. A.; POROMBKA, D.; ALGERMISSSEN, D.; HERZOG, S.; BAUMGARTNER, W.; HERDEN, C. (2008). Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34(6): 590-602.

WEWETZER, K.; RADTKE, C.; KOCSIS, J.; BAUMGARTNER, W. (2011). Species-specific control of cellular proliferation and the impact of large animal models for the use of olfactory ensheathing cells and Schwann cells in spinal cord repair. *Exp Neurol* 229(1): 80-87.

WILEY, MICHAEL; CHIRGADZE, NICKOLAY; K. CLAWSON, DAVID; J. CRAFT, TRELIA; S. GIFFORD-MOORE, DONETTA; D. JONES, NOEL; L. OLKOWSKI, JENNIFER; SCHACHT, AARON; WEIR, LEONARD; F. SMITH, GERALD (1995). Serine protease selectivity of the thrombin inhibitor D-Phe-Pro-Agmatine and its homologs.

WILLIAMS, B. L.; LIPKIN, W. I. (2006). Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with borna disease virus. *J Virol* 80(17): 8613-8626.

WILLIAMS, S. K.; FRANKLIN, R. J.; BARNETT, S. C. (2004). Response of olfactory ensheathing cells to the degeneration and regeneration of the peripheral olfactory system and the involvement of the neuregulins. *J Comp Neurol* 470(1): 50-62.

WINKLER (1883). Über die Ursachen der subakuten Gehirnentzündung. *Arch wiss prakt Tierhk* 9: 419.

WÖRZ, J. J. (1858). Die halbakute Gehirnentzündung oder Kopfkrankheit der Pferde. Ebner & Seubert. Stuttgart.

WYSS-FLUEHMANN, G.; ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M.; PLATTET, P. (2010). Canine distemper virus persistence in demyelinating encephalitis by swift intracellular cell-to-

cell spread in astrocytes is controlled by the viral attachment protein. *Acta Neuropathol* 119(5): 617-630.

XU, J.; LAZARTIGUES, E. (2020). Expression of ACE2 in Human Neurons Supports the Neuro-Invasive Potential of COVID-19 Virus. *Cell Mol Neurobiol*: 1-5.

YAMADA, M.; HAYASHI, H.; YUUKI, M.; MATSUSHIMA, N.; YUAN, B.; TAKAGI, N. (2018). Furin inhibitor protects against neuronal cell death induced by activated NMDA receptors. *Sci Rep* 8(1): 5212.

YAMADA, M.; NAKAMURA, K.; YOSHII, M.; KAKU, Y.; NARITA, M. (2009). Brain lesions induced by experimental intranasal infection of Japanese encephalitis virus in piglets. *J Comp Pathol* 141(2-3): 156-162.

YANAI, M.; KOJIMA, S.; SAKAI, M.; KOMORIZONO, R.; TOMONAGA, K.; MAKINO, A. (2020). ADAR2 Is Involved in Self and Nonself Recognition of Borna Disease Virus Genomic RNA in the Nucleus. *J Virol* 94(6).

YILMAZ, H.; HELPS, C. R.; TURAN, N.; UYSAL, A.; HARBOUR, D. A. (2002). Detection of antibodies to Borna disease virus (BDV) in Turkish horse sera using recombinant p40. Brief report. *Arch Virol* 147(2): 429-435.

YOUNG, V. A.; RALL, G. F. (2009). Making it to the synapse: measles virus spread in and among neurons. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 3-30.

ZHAI, A.; QIAN, J.; KAO, W.; LI, A.; LI, Y.; HE, J.; ZHANG, Q.; SONG, W.; FU, Y.; WU, J.; CHEN, X.; LI, H.; ZHONG, Z.; LING, H.; ZHANG, F. (2013). Borna disease virus encoded phosphoprotein inhibits host innate immunity by regulating miR-155. *Antiviral Res* 98(1): 66-75.

ZHANG, L.; WANG, X.; ZHAN, Q.; WANG, Z.; XU, M.; ZHU, D.; HE, F.; LIU, X.; HUANG, R.; LI, D.; LEI, Y.; XIE, P. (2014). Evidence for natural Borna disease virus infection in healthy domestic animals in three areas of western China. *Arch Virol* 159(8): 1941-1949.

ZHANG, X.; FUGERE, M.; DAY, R.; KIELIAN, M. (2003). Furin processing and proteolytic activation of Semliki Forest virus. *J Virol* 77(5): 2981-2989.

ZIEGE, S.; BAUMGARTNER, W.; WEWETZER, K. (2013). Toward defining the regenerative potential of olfactory mucosa: establishment of Schwann cell-free adult canine olfactory ensheathing cell preparations suitable for transplantation. *Cell Transplant* 22(2): 355-367.

ZIMMERMANN, W.; BRETER, H.; RUDOLPH, M.; LUDWIG, H. (1994). Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. J Virol 68(10): 6755-6758.

ZWICK, W. (1939). Handbuch der Viruskrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena.

ZWICK, W.; SEIFRIED, O. (1925). Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Borna'schen Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kanninchen). Berl Tierärztl Wochenschr 41 9: 129-132.

ZWICK, W.; SEIFRIED, O. (1929). Weitere Beiträge zur Erforschung der Bornaschen Krankheit des Pferdes. Arch Wiss Prakt Tierheilkd 59: 511–545.

ZWICK, W.; SEIFRIED, O.; WITTE, J. (1926). Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). Zeitschr Inf Krkh Haustiere.

8 ANHANG

8.1 LÖSUNGEN UND PUFFER

8.1.1 Histologie

EDTA-Lösung

100 g EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)

50 ml 4 M NaOH

1 l Aqua dest.

EDTA mit ca. 600 ml Aqua dest. aufschwemmen und 50 ml 4 M NaOH dazu geben. Auf Magnetprüher lösen. Den pH-Wert mit 4 M NaOH auf 7,4 einstellen, auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen.

8.1.2 Immunhistologie und Immunfluoreszenz

Aqua bidest. steril

Aqua bidest. in sterile, ausgebackene Glasflaschen füllen und autoklavieren

Tris-buffered saline (TBS), pH 7,6

Stammlösung (10x):

60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan

610 ml Aqua dest.

390 ml 1 N HCl

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl auf 7,6.

Gebrauchslösung (1x):

Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen.

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf 7,6.

Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid (phosphate buffered saline, PBS; pH 7,4

Stammlösung (10x):

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄

1000 ml Aqua bidest.

Einstellen des pH-Wertes mit 1 N HCl auf 7,4.

Gebrauchslösung (1x):

Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen.

Einstellen des pH-Wertes mit 5 N NaOH auf 7,4.

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 M (pH 7,1)

6,81 g Imidazol

1000 ml Aqua dest.

500 ml 0,1 M HCl

Den pH-Wert mit 0,1 N HCl auf 7,1 einstellen.

3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung (DAB-Lösung)

100 mg DAB

200 ml 0,1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1)

Mit Magnetprüher mischen und mit Filterpapier (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) filtrieren.

Unmittelbar vor Gebrauch 70 µl 30%iges H₂O₂ zugeben.

Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0 und 4,0)

Stammlösung A:

0,1 M Zitronensäure (21,01 g C₆H₈O₇, in 1000 ml Aqua dest.)

Stammlösung B:

0,1 M Natriumzitrat (29,41 g C₆H₅Na₃O₇ x H₂O, in 1000 ml Aqua dest.)

9 ml Stammlösung A mit 41 ml Stammlösung B mischen.
450 ml Aqua dest. zugeben und mit 0,1 N HCl auf pH 4,0 oder 6,0 einstellen.

Kardasewitsch

200 ml 25 % Ammoniaklösung
800 ml 70 % Ethanol

Papanicolaous Gebrauchslösung

Papanicolaous Hämatoxylin 1b mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnen und filtrieren.

4%iges Paraformaldehyd (PFA) in Zellkulturmedium, pH 7,35-7,4

10 g PFA

250 ml Zellkulturmedium (DMEM oder Neurobasal®-A Medium, Gibco)

Auf Magnetrührer bei ca. 60-70 °C lösen, nicht autoklavieren.

8.2 BEZUGSQUELLEN

Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage
Standarddiät Ratte/Maus Zucht (1310)

B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Omnifix®-F Feindosierspritze (9161406V)
Sterican® Mix, stumpfe Kanüle ohne Anschliff, 21 G (9180109)

Bender & Hobein AG, Bruchsal
Vortex Genie 2™

Biochrom GmbH, Berlin
Polylysin, wässrige Lösung mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin als Hydrobromid (MG > 300 000) (L7240)

Bio-med Labordiagnostik GmbH, Oberschleißheim
Thermocycler 60

Biomers.net GmbH, Ulm
5'-HEX-3'-BHQ-1-markierte TaqMan®-Sonde (GAPDH)
Primersynthese (GAPDH sense, GAPDH antisense, BoDV1--N sense, BoDV-1-N antisense)

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Multicycler® PTC 200

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ammoniaklösung ≥25 %, reinst (5460.1)
DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole; 6335.1)
Deckgläser 15 mm Ø (P232.1)
Ethanol vergällt ≥99,8 %, mit ca. 1 % MEK (K928.2)
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA; X986.3)
Formaldehydlösung säurefrei ≥37 %, für die Histologie (P733.3)
Methanol Rotipuran® ≥99,9 %, p.a., ACS, ISO (Art. 4627.3)
Natriumchlorid (NaCl) ≥99 %, Ph.Eur., USP (P029.3)
Paraffin Roti®-Plast, für die Histologie (6642.5)
Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen; Kalksoda-Klarglas, Gesamtlänge 150 mm (4518)
RNase away® (A998.1)
Rotilabo®-Spritzenfilter 22 µm, CME, steril (KH54.1)
Salzsäure (HCl) rauchend 37 % (2607.2)
Tris, Pufferan® ≥99,9 %, p.a. (4855.2)
Wasserstoffperoxid 30 % Rotipuran® p.a., ISO, stabilisiert (8070.1)
Zählkammer Neubauer Linien dunkel (T728.1)
Zellschaber, 280 mm (CE60.1)

Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena [früher Carl Zeiss West Germany,]
Stereomikroskop (4772992)

Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
Cleaved Caspase 3 (Asp175, #9661)

Covance, Princeton, NJ, USA
Neuronal Class III beta-Tubulin (TUJ1) Rabbit Monoclonal Antibody, Purified (MRB-435P)

Dianova GmbH, Hamburg [früher Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA]
Ziege IgG anti-Kaninchen IgG (H+L), Cy2 (111-225-003)
Ziege IgG anti-Maus IgG (H+L), Cy3 (115-165-166)

Emil Lux GmbH & Co. KG, Wermelskirchen
LUX Universal Säge Comfort 145 mm (Art.-Nr. 5201348)

Eppendorf AG, Hamburg [früher New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA]
Microcentrifuge Rotor F-45-18-11 5415C (2389)
Innova™ 2000 Platform Shaker (M1190-0002)

Eurogentec, Seraing, Belgien
5'-FAM-3'-TAMRA-markierte TaqMan®-Sonde (BoDV-1-N)

Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan
NanoZoomer S210 Digital slide scanner (C13239-01)

Janvier Labs®, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich
Lewis-Ratten, LEW/OrIRj, Barriere 2E und 5D (SPF)

Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Filterpapier MN 615¼, Durchmesser 320 mm (531032)

Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Aperio ImageScope V11.1.2.760-R2
Mikrotom RM2255

Merck KGaA (Merck Millipore), Darmstadt, inclusive Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol (M6250)
3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride-hydrate ≥96 % (DAB; D5637)
Entellan® in Toluol (107960)
Imidazole puriss. p.a., ≥99,5 % (GC; 56750)
Laminin from human fibroblasts cell culture derived (L4544)
Natronlauge Titrisol® 1mol/l (1N; 1.09956.0001)
Papanicolaous Lösung 1b Hämatoxylinlösung S (1.09254.0500)
Paraformaldehyd (158127)
Rolf B1.T, adult rat olfactory nerve ensheathing cells (03071601)
Salzsäure Titrisol® 1 mol/l (1N; 1.09970.0001)

MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege
BigPrep™ Lysing Matrix H 50x2 ml/tube (SKU 116917050)
FastPrep-24™ 5g bead grinder and lysis system, Homogenizer (SKU 116005500)

Nikon GmbH, Düsseldorf
Eclipse 80i
NIS-Elements BR 3.2

PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Donor Horse Serum (B15-023)
Goat Serum (B11-035)

Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
QuantiTect® Reverse Transcription Kit (205313)
RNase-Free DNase Set (50; 79254)
RNeasy® Mini Kit (250; 74106)
Rotor-Gene® Probe PCR Kit (204374)
Rotor-Gene® Q (9001586)

R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
SuperFrost® Plus Objektträger (03-0060)
Deckgläser rund Ø 12mm, Stärke 0,13 – 0,16mm, (01-0012/1)

Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Tissue-Tek® SCA™ Eindeckfilm (4770)
Tissue-Tek® TEC™ 5 Paraffinausgießstation mit Kühlplatte (5229)
Tissue-Tek® VIP™ 5 Jr. Gewebeeinbettungsautomat (5905)
Tissue-Tek® Coverslipper (4765)

Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Ziege anti-AIF (D-20, sc9416)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere® Filter Tips 0.5 - 20 µl (701.116.210)
Biosphere® Filter Tips 2 - 100 µl (70.760.212)
Biosphere® Filter Tips 2 - 200 µl (70.760.211)
Biosphere® Filter Tips 1250 µl extra long (701.186.210)
Röhre 15 ml 120x17mm (62.554.502)
Röhre 50 ml 114x28mm (62.547.254)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml (72.706)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml (72.695.500)
TC-Platte 24 Well, Standard, F (83.3922.005)
Zellkulturflasche, Kappe mit Filter, 25 cm² Kulturfläche (83.3910.002)

SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn
Xylol reinst (XTR-10000-97-1)
Ethanol 96 %, vergällt (ETO-10000-96-1)

Serva Electrophoresis GmbH, Frankfurt
Triton® X-100 rein (37240)

Simport, Canada, USA
Slimsette™, Tissue cassettes with four-compartments, (M511-11)

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA (früher: Gibco®, Invitrogen™, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA, Thermo Scientific/Thermo Shandon Limited Runcorn, UK)
B-27® supplement (50x; custom; 6080085SA)
Cassette Rack Assy (73310017)
Collagenase from Clostridium histolyticum (C0130)
Deoxyribonuclease II from bovine spleen (D8764)
Dispase II (D4693)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, pyruvate (41966029)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose, pyruvate, no glutamine (10313021)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), low glucose, pyruvate (31885023)
Färbeautomat Microm HMS 740
Fetal Bovine Serum (FBS), qualified, heat inactivated (10500-064)
Gentamicin (50mg/ml; 15750-060)
GlutaMAX™ supplement (35050061)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) mit Calcium und Magnesium, ohne Phenolrot (14025092)
Nanodrop 2000 Spektralphotometer
Neurobasal®-A (1x) Medium (10888022)
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/ml; 15140-122)
Shandon Coverplate™ (72110017) cycler
Tischzentrifuge Heraeus™ Labofuge™ 400 (75008150)

UNO BV, Zevenaar, Niederlande
Face Mask for rat

Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Avidin-Biotin-Komplex: Vectastain® ABC-Kit Peroxidase Standard (PK-4000)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), biotinyliert (BA-1000)
Pferd anti-Maus IgG (H+L), biotinyliert (BA-2000)
Pferd anti-Ziege IgG (H+L) biotinyliert (BA-9500)

Weiss Pharmatechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen [früher BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH]
Laminar Flow Sicherheitswerkbank (BDK-SK1500)

ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel [früher EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen]

Käfig Typ 4, PC (3010006)

Deckel mit Fallbügelschloss erhöhte Ausführung für Käfig Typ 4 (5023105)

Käfig Typ 3, erhöht, PC (3010033)

Bio. A.S ® Filterhaube, geschlossen, mit Befestigungsklammern für außenliegende Tränkflasche für

Käfig Typ 3, PC (5010907)

Edelstahldeckel, mit klappbarem Trennblech für Käfig Typ 3 (5023483)

8.3 TABELLEN

8.3.1 Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels

Tab. 13: BoDV-1-Infektionsrate und Anteil der Neurone in der Dissoziationskultur nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 (bezogen auf die Gesamtzellzahl)

Zeit nach der Infektion	Präparation	Infektionsstatus	Inhibitorzugabe	Anteil BoDV-1-positiver Zellen (%)	Anteil an Neuronen (%)			
4 d	1	nicht infiziert	ohne	0,00	4,36			
				0,00	2,20			
				0,00	1,72			
				0,00	1,61			
				0,00	-			
	2			0,00	2,05			
				0,00	1,27			
				0,00	9,17			
				0,00	-			
				0,00	14,83			
	3			0,00	6,85			
				0,00	12,74			
				0,00	-			
				1	BoDV-1	ohne	5,60	4,27
							6,67	2,67
	6,84	2,43						
	6,21	3,33						
	11,53	6,34						
	2	8,79	2,61					
		13,94	9,13					
		6,03	5					
		3,31	0,83					
		9,14	3,19					
	3	10,44	3,24					
		18,56	8,46					
		12,79	5,33					
		1	BoDV-1	0,1 µM			4,24	10,47
12,56							5,8	
3,72	0,98							
3,18	0,91							
11,98	6,68							
2	1,88				1,88			
	5,66	1,54						

Zeit nach der Infektion	Präparation	Infektionsstatus	Inhibitorzugabe	Anteil BoDV-1-positiver Zellen (%)	Anteil an Neuronen (%)	
				5,69	4,98	
				3,61	3,87	
				4,90	-	
				12,41	4,72	
				12,10	5,24	
				11,79	9,68	
				6,79	3,34	
	3	BoDV-1	1 µM	4,20	1,12	
				12,20	8,29	
				9,50	9,5	
				2,76	6,28	
				4,49	2,11	
	2			4,53	3,7	
				7,56	3,27	
				3,85	4,62	
				2,93	2,39	
				13,11	8,74	
	3			8,75	5,22	
				5,37	7,76	
				7,59	10,17	
		1	BoDV-1	10 µM	5,20	4,05
					9,30	3,1
	7,94				4,41	
	7,19				9,8	
	3,98				11,94	
	2	9,17			4,59	
		5,26			5,26	
		6,35			6,8	
		6,94			6,46	
		11,01			12,88	
	3	9,34			10,86	
		7,24			14,49	
		3,94			18,93	
7 d		1	nicht infiziert	ohne	0,00	5,13
					0,00	7,05
	0,00	-				
	0,00	2,67				
	2	0,00			14,89	
		0,00			-	

Zeit nach der Infektion	Präparation	Infektionsstatus	Inhibitorzugabe	Anteil BoDV-1-positiver Zellen (%)	Anteil an Neuronen (%)	
	3			0,00	4,74	
				0,00	-	
				0,00	-	
	1	BoDV-1	ohne	16,67	0,75	
				20,83	-	
				11,03	4,14	
				3,38	-	
				2	4,56	-
					8,84	3,02
					9,71	1
				3	9,26	4,36
					13,97	3,46
					7,19	-
	1	BoDV-1	0,1 µM	4,57	-	
				26,41	6,74	
				13,79	2,4	
				6,86	-	
				2	5,02	-
					6,06	-
					5,57	1,61
				3	8,40	3,36
					8,79	4,04
					8,53	-
	1	BoDV-1	1 µM	3,56	6,67	
				20,31	6,64	
				11,40	-	
				5,03	-	
				2	3,18	-
					8,97	2,53
					3,26	-
				3	10,62	2,77
					16,27	5,75
					9,51	5,14
	1	BoDV-1	10 µM	3,00	-	
				17,73	10,06	
				5,47	-	
				2	5,76	-
					6,51	-
					5,88	4,31

Zeit nach der Infektion	Präparation	Infektionsstatus	Inhibitorzugabe	Anteil BoDV-1-positiver Zellen (%)	Anteil an Neuronen (%)
	3			10,56	2,78
				6,75	3,94
				2,88	-
10 d	1	nicht infiziert	ohne	0,00	7,66
				0,00	6,16
				0,00	10,18
				0,00	8,43
				0,00	5,4
	2			0,00	10,94
				0,00	12,86
				0,00	7,52
				0,00	8,22
				0,00	2,29
	3			0,00	8,78
				0,00	5,97
				0,00	2,29
				0,00	4,04
		1	BoDV-1	ohne	16,67
	28,49				9,5
	12,67				-
	21,87				-
	13,32				-
	9,27				-
	22,19				6,45
	32,27				3,19
	27,07				4,44
	37,96				5,09
	15,18				3,37
	26,41	4,58			
	24,70	3,45			
	24,06	4,49			
	1	BoDV-1	0,1 µM	14,67	2,67
				34,46	14,19
				30,57	5,44
				29,49	-
				31,12	-
				15,65	-
				31,95	10,03
	28,64			4,41	
2					

Zeit nach der Infektion	Präparation	Infektionsstatus	Inhibitorzugabe	Anteil BoDV-1-positiver Zellen (%)	Anteil an Neuronen (%)		
				29,98	6,78		
				23,15	7,86		
				28,33	4,06		
				20,38	3,69		
				33,46	4,21		
				1,40	-		
	3	BoDV-1	1 µM	23,86	9,66		
				4,19	-		
				9,42	-		
				9,59	8,31		
				9,38	6,08		
				15,32	17,13		
	2			13,62	7,51		
				8,67	-		
				6,97	7,59		
				5,96	7,7		
				3	10,22	11,22	
					8,76	7,35	
	5,80				-		
	1				BoDV-1	10 µM	8,62
				15,00			5
				4,28			-
				3,80			15,54
				7,03			10,09
			5,17	4,18			
	2		2,18	9,99			
			5,05	13,97			
			2,17	-			
			3	4,43			13,45
	0,93			11,45			
	2,18			13,5			
	1,71			-			

Zeitpunkte nach der Infektion, Tag (d); Wiederholung der Präparationen 1-3; Infektionsstatus: BoDV-1-infiziert und nicht BoDV-1-infiziert; Dosis des zugegebenen Inhibitors MI-0701 (ohne=0 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM); Anteil positiver Zellen: prozentualer Anteil positiver Zellen pro 3200 ausgezählte Gesamtzellen im olfaktorischen Epithel; Anteil der Neurone: prozentualer Anteil der Neurone pro 3200 ausgezählte Gesamtzellen

Tab. 14: Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA in der Dissoziationskultur

Zeit nach der Infektion	Präparation	RNA	Normalisierte Kopienzahl	
			1. Wiederholung	2. Wiederholung
4 d	1	gRNA	-	0,01
		mRNA	0,01	0,01
	2	gRNA	-	0,01
		mRNA	-	0,02
	3	gRNA	0,05	0,02
		mRNA	-	0,03
7 d	1	gRNA	0,1	0,07
		mRNA	0,2	0,23
	2	gRNA	0,17	0,18
		mRNA	0,3	0,29
	3	gRNA	0,14	0,15
		mRNA	0,25	0,27

Zeitpunkte nach der Infektion, Tag (d); Wiederholung der Präparationen 1-3; RNA: genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA); Anzahl auf GAPDH normalisierte Kopienzahlen in der 1. und 2. Wiederholung des Versuchs

8.3.2 ROLF B1.T – KULTUR PERMANENTER ADULTER OLFAKTORISCHER HÜLLZELLEN DER RATTE

Tab. 15: BoDV-1-Infektionsrate in der Kultur der olfaktorischen Hüllzellen nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701

			Anteil infizierter Zellen		
Zeit nach der Infektion	Präparation	Inhibitorzugabe	1. Wdh.	2. Wdh.	3. Wdh.
2 d	1	ohne	8,18	7,34	4,43
			6,46	6,47	8,44
	2		8,06	7,24	4,01
			5,11	7,49	5,61
	3		4,98	5,75	4,43
			8,46	7,24	5,54
3 d	1	ohne	8,13	9,39	6,69
			7,14	9,96	8,56
	2		9,36	10,67	7,05
			7,34	9,66	6,45
	3		9,32	7,13	11,04
			5,56	10,21	7,87
4 d	1	ohne	11,66	8,05	8,01
			9,03	7,23	8,82
	2		6,18	11,43	-

			Anteil infizierter Zellen		
Zeit nach der Infektion	Präparation	Inhibitorzugabe	1. Wdh.	2. Wdh.	3. Wdh.
			7,8	8,24	9,85
	3		11,35	8,74	13,02
			10,38	8,4	8,63
	1	10 µM	4,15	3,22	2,27
			1,97	1,96	1,85
	2		1,67	2,56	3,45
			3,73	1,93	1,51
	3		1,78	1,65	1,55
			1,4	3,74	3,39
5 d	1	ohne	13,11	9,21	6,5
			16,13	11,65	-
	2		8,9	10,87	10,32
			10,57	11,55	7,97
	3		14,43	12,32	13,86
			10,32	9,78	11,57
	1	10 µM	1,58	2,81	1,74
			3,21	2,96	6,69
	2		3,72	4,63	2,81
			1,9	5,33	7,44
	3		2,72	5,11	3,3
			1,88	3,62	3,97
6 d	1	ohne	20,74	33,63	12,58
			22,07	29,52	17,98
	2		17,64	21,07	12,75
			16,49	11,14	12,24
	3		9,38	14,48	11,98
			10,93	13,3	14,38
	1	10 µM	2,33	1,99	2,48
			1,97	2,41	1,4
	2		2,26	0,97	1,72
			2,04	2,13	1,51
	3		0,98	2,5	2,03
			2,39	4,07	2,03

Zeitpunkte nach der Infektion, Tag (d); Wiederholung (Wdh.) der Präparationen 1-3; Dosis des zugegebenen Inhibitors MI-0701 (ohne=0 µM, 10 µM); Anteil positiver Zellen: prozentualer Anteil positiver Zellen pro 1000 ausgezählte Gesamtzellen in der 1., 2. und 3. Wiederholung des Versuchs

8.3.3 Experimentelle intranasale BoDV-1-Infektion und intranasale Inhibitor-Anwendung an Lewis-Ratten

Tab. 16: *Score Sheet* nach intranasaler und intrazerebraler BoDV-1-Infektion der Lewis-Ratten

Blatt 1				Versuchsbeginn (Datum/Uhrzeit):				Ausgangsgewicht:				Geburtsdatum:					
Ratte ID:																	
Eingriff																	
Verlauf	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11	Tag 12	Tag 13	Tag 14	Tag 15	Tag 16
Kriterium																	
Körpergewicht																	
Allgemeinzustand																	
Spontanverhalten																	
SUMME Score																	
Bemerkung																	
Untersucher																	

Nach den Bestimmungen des vom Regierungspräsidium Gießen genehmigten Tierversuchs V 54-19 c 20 15 (1) GI 18/4 Nr. 102/2011

Tab. 17: Bewertungskriterien für das *Score Sheet* nach intranasaler und intrazerebraler BoDV-1-Infektion der Lewis-Ratten

Score Sheet Infektion Ratten BDV Gruppen 2-9					
Punktwertung	0	1	5	10	20
Körpergewicht (Beurteilt wird der Gewichtsverlust innerhalb von 3 Tagen; Bestimmung alle 3-4 Tage, ab 14 dpi alle 2 Tage)	0-5% Verlust	5-10% Verlust	10-20% Verlust	20-25% Verlust	>25% Verlust
Allgemeinzustand (Tägliche Bewertung)	Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend	Fell geringgradig gestäubt, verminderte oder übersteigerte Körperpflege	Fell stumpf, ungeordnet; un gepflegte Körperöffnungen; Augen trüb; erhöhter Muskeltonus	Fokal verklebtes Fell; unnormale Haltung; Augen trüb; hoher Muskeltonus	Struppiges, rauhes Fell; aufgekrümmter Rücken; abnorme Kopf- und Gliedmaßenhaltung
Spontanverhalten (Tägliche Bewertung)	Normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	Geringe Abweichungen vom Normalverhalten	gesteigerte Aktivität, Nervosität	Selbstisolation, aggressives Verhalten gegenüber Käfiggenossen, Koordinationsstörungen, ataktische Bewegungen	Paralyse, Lethargie, Somnolenz, Desorientierung, Ataxie

Nach den Bestimmungen des vom Regierungspräsidium Gießen genehmigten Tierversuchs V 54-19 c 20 15 (1) GI 18/4 Nr. 102/2011

Tab. 18: Maßnahmen nach erfolgreichem Scoring

Die obigen Kriterien führen, für jedes Versuchstier über den gesamten Versuchszeitraum individuell bestimmt, zum Abbruch des Versuchs und zur Euthanasie. Die Tiere werden täglich zur gleichen Tageszeit kontrolliert. Das Wiegen findet alles 3-4 Tage (Gruppen 2-9). Die Intervalle werden an den kritischen Untersuchungszeitpunkten (ab 14 dpi) angepasst. Nach der intranasalen Applikation von Flüssigkeiten wird bei der täglichen Kontrolle vor allem auch auf eine Änderung des Atemtyps sowie Husten geachtet um sicher zu stellen, dass keine Flüssigkeit aspiriert wurde. Bewertung und Maßnahmen: <table border="1"> <tr> <th>Punktesumme</th><th>Belastungsgrad</th><th>Erläuterung</th></tr> <tr> <td>0</td><td>0</td><td>Keine Belastung</td></tr> <tr> <td>1-9</td><td>1</td><td>Geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten</td></tr> <tr> <td>10-19</td><td>2</td><td>Mittelgradige Belastung, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten Sollte der Einzelscore über 2 Tage lang bei 10 liegen, wird Rücksprache mit dem Tierarzt/Leiter die Euthanasie durchgeführt.</td></tr> <tr> <td>20 oder höher (max. 60 möglich)</td><td>3</td><td>Hochgradige Belastung, Euthanasie bzw. Rücksprache mit Leiter/Tierarzt</td></tr> </table> Gesamtscore 20 oder höher (max. 60 möglich) Die Tiere werden beim Erreichen eines Einzelscores von 20 euthanasiert, d.h. die Bewertung in einem der folgenden Kriterien „Körpergewicht“, „Allgemeinzustand“, sowie „Spontanverhalten“ mit einem Score 20 reicht zur Euthanasie aus. Bei einem Gesamtscore (durch Addition von Befunden an den Scores 1, 5 und 10) von 20 oder mehr (max. 60 möglich), wird der Tierarzt/Projektleiter kontaktiert und es erfolgt in Absprache die Euthanasie.			Punktesumme	Belastungsgrad	Erläuterung	0	0	Keine Belastung	1-9	1	Geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten	10-19	2	Mittelgradige Belastung, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten Sollte der Einzelscore über 2 Tage lang bei 10 liegen, wird Rücksprache mit dem Tierarzt/Leiter die Euthanasie durchgeführt.	20 oder höher (max. 60 möglich)	3	Hochgradige Belastung, Euthanasie bzw. Rücksprache mit Leiter/Tierarzt
Punktesumme	Belastungsgrad	Erläuterung															
0	0	Keine Belastung															
1-9	1	Geringe Belastung, sorgfältig weiter beobachten															
10-19	2	Mittelgradige Belastung, ggf. tierärztliche Versorgung einleiten Sollte der Einzelscore über 2 Tage lang bei 10 liegen, wird Rücksprache mit dem Tierarzt/Leiter die Euthanasie durchgeführt.															
20 oder höher (max. 60 möglich)	3	Hochgradige Belastung, Euthanasie bzw. Rücksprache mit Leiter/Tierarzt															

Tab. 19: Anzahl infizierter Zellen in der Nase nach BoDV-1-Infektion und Behandlung der Versuchstiere mit dem Inhibitor MI-0701 (bezogen auf die definierte Strecke)

				Anzahl infizierter Zellen					
				Zelltyp					Gesamt-zahl
Zeit nach der Infektion	Inhibitor-zugabe	V.-Nr.	Lokalisa-tion	Stützzellen	olf. Neurone	Basal-zellen	Nerven-fasern	OEC	
14 d	ohne	V314/ 12	D	1	1	1	2	1	6
			E	0	0	0	1	1	2
			F	3	4	4	5	1	17
			G	1	3	1	1	1	7
		V315/ 12	D	0	2	1	0	0	3
			E	6	5	2	0	0	13
			F	19	18	19	11	8	75
			G	9	10	3	4	3	29
		V316/ 12	D	0	0	0	4	2	6
			E	3	3	1	0	0	7
			F	1	2	3	3	2	11
			G	2	0	2	2	3	9
		V317/ 12	D	5	6	3	0	1	15
			E	20	21	25	19	10	95
			F	13	10	5	7	1	36
			G	9	13	14	14	4	54

				Anzahl infizierter Zellen					
				Zelltyp					Gesamt-zahl
Zeit nach der Infektion	Inhibitor-zugabe	V.-Nr.	Lokalisation	Stütz-zellen	olf. Neurone	Basal-zellen	Nerven-fasern	OEC	
		V363/12	D	-	-	-	-	-	-
			E	18	22	18	6	6	70
			F	11	12	11	6	4	44
			G	5	6	6	4	3	24
	300 µM	V18/17	D	11	18	20	6	5	60
			E	20	47	29	7	7	110
			F	3	24	13	4	1	45
			G	-	-	-	-	-	-
		V19/17	D	1	2	2	4	3	12
			E	6	7	10	3	1	27
			F	6	11	12	5	4	38
			G	2	15	14	3	1	35
		V20/17	D	1	3	2	0	0	6
			E	1	4	4	2	1	12
			F	12	17	19	8	10	66
			G	4	17	17	5	2	45
		V21/17	D	0	0	0	0	0	0
			E	12	22	18	9	7	68
			F	14	21	12	13	8	68
			G	15	15	12	4	4	50
		V22/17	D	2	2	0	6	4	14
			E	1	4	5	6	5	21
			F	6	13	10	9	7	45
			G	3	4	5	3	4	19
21 d	ohne	V395/12	D	12	28	13	40	18	111
			E	38	57	34	45	30	204
			F	136	214	160	99	98	707
			G	28	53	27	21	8	137
		V396/12	D	-	-	-	-	-	-
			E	34	59	48	45	10	196
			F	7	27	14	9	3	60
			G	16	23	7	2	4	52
	300 µM	V28/17	D	6	2	0	0	0	8
			E	15	21	16	2	2	56
			F	44	43	26	22	10	145
			G	15	15	13	7	8	58
		V29/17	D	6	10	4	2	0	22
			E	39	62	30	3	5	139
			F	64	99	23	12	7	205

				Anzahl infizierter Zellen					
				Zelltyp					Gesamt-zahl
Zeit nach der Infektion	Inhibitor-zugabe	V.-Nr.	Lokalisation	Stütz-zellen	olf. Neurone	Basal-zellen	Nerven-fasern	OEC	
			G	32	58	27	12	4	133
		V30/17	D	-	-	-	-	-	-
			E	45	61	26	12	9	153
			F	25	65	34	30	19	173
			G	31	37	22	18	16	124
		V31/17	D	-	-	-	-	-	-
			E	16	34	18	7	6	81
			F	18	41	22	29	15	125
			G	14	29	15	18	11	87
		V32/17	D	18	33	16	6	4	77
			E	21	33	16	16	6	92
			F	20	35	17	35	24	131
			G	23	28	15	15	15	96

Zeitpunkte nach der Infektion, Tag (d); Dosis des zugegebenen Inhibitors MI-0701 (ohne=0 μ M, 300 μ M); V.-Nr. der Versuchstiere, Lewis-Ratten; definierte Lokalisationen der Nase nach Abb. 13 (D-G); Anzahl infizierter Zellen nach Zelltyp und Gesamtzellzahl in 20 Strecken des Epithels von je 250 μ m Länge

Tab. 20: Infektionsscore im Gehirn nach BoDV-1-Infektion und Behandlung der Versuchstiere mit dem Inhibitor MI-0701

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	Region	Infektionsscore
14 d	ohne	V314/12	I	1,29
			II	1,24
			III	0
			IV	0,33
			V	0,11
			VI	0,13
			VII	-
			VIII	0,04
			IX	0
			X	0
			XI	0,33
			XII	-
			XIII	-
			XIV	-
		V315/12	I	1,33
			II	1,39

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	Region	Infektionsscore
			III	-
			IV	0,36
			V	0,09
			VI	0,36
			VII	0,17
			VIII	0,1
			IX	0,33
			X	0,44
			XI	1
			XII	1
			XIII	0
			XIV	0
		V316/12	I	1
			II	1,44
			III	-
			IV	0,76
			V	0,39
			VI	1
			VII	-
			VIII	0,55
			IX	0,34
			X	0,8
			XI	1
			XII	1
			XIII	-
			XIV	-
		V317/12	I	1,89
			II	1,39
			III	1
			IV	0,24
			V	0,29
			VI	0,58
			VII	0,25
			VIII	0,31
			IX	0,81
			X	0,7
			XI	1
			XII	0,75
			XIII	0
			XIV	0,5
		V363/12	I	2,54
			II	2,2
			III	1

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	Region	Infektionsscore
			IV	0,55
			V	0,64
			VI	1
			VII	0,8
			VIII	0,31
			IX	0,1
			X	0
			XI	1,33
			XII	1
			XIII	1
			XIV	1
	300 µM	V18/17	I	-
			II	1,58
			III	1
			IV	0,46
			V	0,02
			VI	0,63
			VII	0
			VIII	0
			IX	0
			X	0
			XI	1
			XII	1
			XIII	0
			XIV	1
		V19/17	I	1,14
			II	1,09
			III	-
			IV	0,33
			V	0,04
			VI	0,36
			VII	0
			VIII	0,08
			IX	0
			X	0
			XI	1
			XII	1
			XIII	0
			XIV	1
		V20/17	I	1,85
			II	1,47
			III	0
			IV	0,4

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	Region	Infektionsscore
			V	0,08
			VI	0,5
			VII	0
			VIII	0,21
			IX	0,64
			X	0,1
			XI	-
			XII	1
			XIII	1
			XIV	1
		V21/17	I	2,08
			II	1
			III	1
			IV	0,3
			V	0,02
			VI	0,36
			VII	0
			VIII	0
			IX	0
			X	0,33
			XI	0
			XII	1
			XIII	0
			XIV	0
		V22/17	I	1,14
			II	0,82
			III	1
			IV	0,22
			V	0,05
			VI	0,18
			VII	0
			VIII	0,11
			IX	0,33
			X	0,4
			XI	0
			XII	0
			XIII	0,5
			XIV	0
21 d	ohne	V395/12	I	4,38
			II	4,2
			III	-
			IV	2,18
			V	1,74

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	Region	Infektionsscore
			VI	4,17
			VII	2,2
			VIII	1,75
			IX	0,79
			X	1
			XI	5
			XII	4,5
			XIII	2,5
			XIV	2
		V396/12	I	4,5
			II	4,1
			III	-
			IV	2
			V	1,43
			VI	5
			VII	1,57
			VIII	1,59
			IX	0,71
			X	1,26
			XI	4
			XII	4
			XIII	1,5
			XIV	2
	300 µM	V28/17	I	2,33
			II	2,52
			III	1,5
			IV	0,83
			V	1,11
			VI	2,43
			VII	1
			VIII	0,89
			IX	0,19
			X	0,25
			XI	-
			XII	2
			XIII	1
			XIV	1
		V29/17	I	4,6
			II	2,9
			III	1
			IV	1,27
			V	1,49
			VI	2,56

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	Region	Infektionsscore
			VII	1,5
			VIII	1,03
			IX	1
			X	1,15
			XI	3
			XII	1,25
			XIII	1
			XIV	1
		V30/17	I	2,5
			II	2,77
			III	1
			IV	1,14
			V	1,39
			VI	4,42
			VII	1,17
			VIII	1,14
			IX	0,62
			X	1
			XI	-
			XII	2
			XIII	1
			XIV	-
		V31/17	I	3
			II	2,6
			III	2
			IV	0,93
			V	0,9
			VI	2,22
			VII	1,6
			VIII	1,03
			IX	0,13
			X	0,43
			XI	2,67
			XII	1,67
			XIII	1
			XIV	1
		V32/17	I	2,31
			II	2,47
			III	2
			IV	1,18
			V	0,99
			VI	2,35
			VII	1,11

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	Region	Infektionsscore
			VIII	1
			IX	0,5
			X	0,5
			XI	3
			XII	2
			XIII	1,5
			XIV	1

Zeitpunkte nach der Infektion, Tag (d); Dosis des zugegebenen Inhibitors MI-0701 (ohne=0 μ M, 300 μ M); V.-Nr. der Versuchstiere, Lewis-Ratten; definierte Region des Gehirns nach 3.3.3.2Abb. 12 (I-XIV); durchschnittlicher Infektionsscore der definierten Fläche (0= keine markierten Zellen im Teilstück; 1= bis zu 25 markierte Zellen im Teilstück; 2= zwischen 26 und 50 markierte Zellen im Teilstück; 3= zwischen 51 und 75 markierte Zellen im Teilstück; 4= zwischen 76 und 100 markierte Zellen im Teilstück; 5= mehr als 100 markierte Zellen im Teilstück)

Tab. 21: Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA im Gehirn nach BoDV-1-Infektion und Behandlung der Versuchstiere mit dem Inhibitor MI-0701

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	RNA	Lokalisation			
				N	G-I	G-III	G-IV
14 d	ohne	V314/12	gRNA	0	0,11	0	0
			mRNA	0	2,62	0	0,18
		V315/12	gRNA	0	0	0	0
			mRNA	0	1,1	0	0
		V316/12	gRNA	0	0,02	0	0
			mRNA	0	0,28	0	0
		V317/12	gRNA	0	0,16	0	0
			mRNA	0	1,12	0	0
	300 μ M	V363/12	gRNA	0	0,37	0	0
			mRNA	0	2,4	0,07	0,12
		V18/17	gRNA	0,08	0	0	0
			mRNA	0,69	1,89	0	0
		V19/17	gRNA	0,02	0,09	0	0
			mRNA	0,09	1,76	0	0,25
		V20/17	gRNA	0	0,32	0	0
			mRNA	0,03	2,01	0,15	0
21 d	ohne	V396/12	gRNA	0,8	2,68	0,9	0,54
			mRNA	1,19	8,31	3,04	2,08
	300 μ M	V28/17	gRNA	1,22	2,95	0,52	1,01

Zeit nach der Infektion	Inhibitorzugabe	V.-Nr.	RNA	Lokalisation			
				N	G-I	G-III	G-IV
		V29/17	mRNA	3,42	12,91	2,31	7,1
			gRNA	0,41	2,14	0,01	0,57
		V30/17	mRNA	3,35	10,07	0,81	5,12
			gRNA	0,03	1,52	0,28	0,35
		V31/17	mRNA	0,55	13,85	3,06	2,84
			gRNA	0,09	2,34	0,5	0,27
		V32/17	mRNA	0,28	8,75	1,55	5,1
			gRNA	-	1,74	3	-
			mRNA	0,41	11,39	3,1	0,51

Zeitpunkte nach der Infektion, Tag (d); Dosis des zugegebenen Inhibitors MI-0701 (ohne=0 μ M, 300 μ M); V.-Nr. der Versuchstiere, Lewis-Ratten; genomische RNA (gRNA) und messenger RNA (mRNA); definierte Lokalisationen der Nase und des Gehirns nach Abb. 11 und Tab. 12 (N= Nase; G-I, -III und -IV= Gehirn I, III und IV)

Tab. 22: P-Werte des exakten Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (R_s) des Nachweises von viraler gRNA und viraler mRNA in der Nase und im Gehirn

		R_s	p
Nase	gRNA	0,4399	0,0625
	mRNA	0,4399	0,0625
G-I	gRNA	0,7865	0,0005
	mRNA	0,876	0
G-III	gRNA	0,4399	0,0625
	mRNA	0,5221	0,0208
G-IV	gRNA	0,4399	0,0625
	mRNA	0,61	0,006

R_s : exakten Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman, p: Wahrscheinlichkeit, G: definierte Lokalisation des Gehirns nach Abb. 11

Tab. 23. P-Werte des exakten Friedman-Tests zum Vergleich der Versuchsgruppen nach 14 und 21 dpi

	14 BoDV-1 (5)	14 BoDV-1+MI-0701 (5)	21 BoDV-1+MI0701 (5)
gRNA	0,0156	0,0169	0,0329
mRNA	0,0013	0,003	0,0023

14 BoDV-1: 14 dpi, nach BoDV-1-Infektion, n= 5; 14 BoDV-1+MI-0701: 14 dpi, nach BoDV-1-Infektion und Inhibitorapplikation, n= 5; 21 BoDV-1+MI-0701: 21 dpi, nach BoDV-1-Infektion und Inhibitorapplikation, n= 5

8.3.4 Immunhistologische Untersuchung zum Vorkommen von Zelltod bei experimentell intranasal BoDV-1- und Mock-infizierten Lewis-Ratten

Tab. 24: Anzahl der Caspase-positiven Zellen des olfaktorischen Epithels nach BoDV-1-Infektion (bezogen auf die definierte Strecke)

Zeit nach der Infektion	Infektionsstatus	V-Nr.	Anzahl positiver Zellen
3 h	BoDV-1	V348/12	35
	BoDV-1	V349/12	27
	BoDV-1	V350/12	40
	BoDV-1	V351/12	29
	BoDV-1	V352/12	36
	Mock	V346/12	40
	Mock	V347/12	24
1 d	BoDV-1	V424/12	35
	BoDV-1	V425/12	31
	BoDV-1	V426/12	44
	BoDV-1	V427/12	42
	BoDV-1	V428/12	37
	Mock	V353/12	39
	Mock	V354/12	36
2 d	BoDV-1	V429/12	36
	BoDV-1	V430/12	12
	BoDV-1	V431/12	13
	BoDV-1	V138/13	58
	BoDV-1	V139/13	34
	Mock	V294/12	15
	Mock	V295/12	12
4 d	BoDV-1	V357/12	12
	BoDV-1	V358/12	19
	BoDV-1	V359/12	18
	BoDV-1	V360/12	21
	BoDV-1	V361/12	12
	Mock	V355/12	21
	Mock	V356/12	29
7 d	BoDV-1	V296/12	34
	BoDV-1	V297/12	16
	BoDV-1	V298/12	11
	BoDV-1	V299/12	11
	BoDV-1	V362/12	16
	Mock	V300/12	10
	Mock	V301/12	14

Zeit nach der Infektion	Infektionsstatus	V-Nr.	Anzahl positiver Zellen
14 d	BoDV-1	V314/12	29
	BoDV-1	V315/12	34
	BoDV-1	V316/12	45
	BoDV-1	V317/12	31
	BoDV-1	V363/12	32
	Mock	V323/12	36
	Mock	V324/12	35
21 d	BoDV-1	V395/12	35
	BoDV-1	V396/12	21
	Mock	V337/12	36
	Mock	V394/12	31

Zeitpunkte nach der Infektion, Stunde (h), Tag (d); Infektionsstatus: BoDV-1-Infektion, Mock-Infektion; V.-Nr. der Versuchstiere, Lewis-Ratten; Anzahl Caspase-positiver Zellen in 20 Strecken des Epithels von je 250 µm Länge

8.4 ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BD	<i>Borna disease</i> , Bornasche Krankheit
BoDV-1	<i>Borna disease virus 1</i> , Virus der Bornaschen Krankheit
BoDV-1-GP	BoDV-1-Glykoprotein
BoDV-1-L	RNA-abhängige RNA Polymerase des BoDV-1
BoDV-1-M	BoDV-1-Matrixprotein
BoDV-1-N	BoDV-1-Nukleoprotein
BoDV-1-P	BoDV-1-Phosphoprotein
BoDV-1-X	BoDV-1-X-Protein
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Ct	threshold cycle
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat-Lösung
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>days post infection</i> ; Tage nach der Infektion
EBL	<i>endogenous borna-like elements</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FFPE	formalin-fixed and paraffin-embedded
g	Gramm
x g	Gravitation
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , saures Gliafaserprotein
gRNA	genomische RNA
h	<i>hour(s)</i> ; Stunde(n)
HCl	Salzsäure
hpi	<i>hours post infection</i> , Stunden nach der Infektion
ID50	infektiöse Dosis, die 50 % der inkubierten Zellen infiziert
i.n.	intranasal
IVCs	<i>individually ventilated cages</i> , Einzelbelüftete Käfige
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
min	<i>minute(s)</i> , Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
mRNA	messenger RNA
µl	Mikroliter
N-CAM	<i>nerve cell adhesion molecule</i> , neurales Zelladhäsionsmolekül
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NGFr	<i>nerve growth factor receptor</i> ; Rezeptor des Nervenwachstumsfaktors
nm	Nanometer
NTC	<i>no template control</i> , PCR-Negativkontrolle
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
p	<i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion

PDD	<i>proventricular dilatation disease</i> , neuropathische Drüsenmagenerweiterung
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	<i>post infectionem</i> , nach Infektion
qPCR	quantitative real time PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
R _s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i> , trisgepufferte Kochsalzlösung
TC	<i>tissue culture</i>
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
VSBV-1	variegated squirrel bornavirus 1
Wdh.	Wiederholung
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.5 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Taxonomie der Familie <i>Bornaviridae</i> [nach AMARASINGHE <i>et al.</i> (2018) und SHI <i>et al.</i> (2018)]	32
Tab. 2: Immunhistochemische Darstellung des BoDV-1-N-Antigens im olfaktorischen Epithel der Ratte nach intranasaler Infektion [nach KUPKE (2016)]	58
Tab. 3: Immunhistologische Darstellung des BoDV-1-N-Antigens im zentralen Nervensystem der Ratte nach intranasaler Infektion [nach MORALES <i>et al.</i> (1988)]	58
Tab. 4: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper	64
Tab. 5: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper, DAPI und die Fluoreszenzfilter	64
Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden in der RT-Reaktion sowie in der quantitativen real time PCR	69
Tab. 7: Übersicht über die Komponenten der RT-Reaktion	69
Tab. 8: Übersicht über die Reaktionsansätze der quantitativen real time PCR	71
Tab. 9: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Primärantikörper	74
Tab. 10: Übersicht über die in der Immunfluoreszenz verwendeten Sekundärantikörper, DAPI und die Fluoreszenzfilter	74
Tab. 11: Übersicht über die verwendeten Versuchstiere und die Behandlung	78
Tab. 12: Überblick über das gewonnene Probenmaterial	80
Tab. 13: BoDV-1-Infektionsrate und Anteil der Neurone in der Dissoziationskultur nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 (bezogen auf die Gesamtzellzahl)	221
Tab. 14: Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA in der Dissoziationskultur	226
Tab. 15: BoDV-1-Infektionsrate in der Kultur der olfaktorischen Hüllzellen nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701	226
Tab. 16: <i>Score Sheet</i> nach intranasaler und intrazerebraler BoDV-1-Infektion der Lewis-Ratten	228
Tab. 17: Bewertungskriterien für das <i>Score Sheet</i> nach intranasaler und intrazerebraler BoDV-1-Infektion der Lewis-Ratten	228
Tab. 18: Maßnahmen nach erfolgtem Scoring	229
Tab. 19: Anzahl infizierter Zellen in der Nase nach BoDV-1-Infektion und Behandlung der Versuchstiere mit dem Inhibitor MI-0701 (bezogen auf die definierte Strecke)	229
Tab. 20: Infektionsscore im Gehirn nach BoDV-1-Infektion und Behandlung der Versuchstiere mit dem Inhibitor MI-0701	231
Tab. 21: Nachweis viraler genomischer und viraler messenger RNA im Gehirn nach BoDV-1-Infektion und Behandlung der Versuchstiere mit dem Inhibitor MI-0701	237
Tab. 22: P-Werte des exakten Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (R_s) des Nachweises von viraler gRNA und viraler mRNA in der Nase und im Gehirn	238
Tab. 23: P-Werte des exakten Friedman-Tests zum Vergleich der Versuchsgruppen nach 14 und 21 dpi	238
Tab. 24: Anzahl der Caspase-positiven Zellen des olfaktorischen Epithels nach BoDV-1-Infektion (bezogen auf die definierte Strecke)	239

8.6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung des intranasalen/peripheren und intrakraniellen/zentralen Teils des olfaktorischen Systems	5
Abb. 2: Schematische Darstellung des olfaktorischen Epithels	6
Abb. 3: Schematische Darstellung des Bulbus olfactorius	8
Abb. 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Merkmale der olfaktorischen Bahn	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der Präproform des Enzyms Furin [modifiziert nach IVANOVA (2017)]	16
Abb. 6: Schematische Darstellung der Strukturformel des Furininhibitors 4-Guanidinomethyl-Phenylacetyl-Arginin-Valin-Arginin-4-Aminobenzylamid (MI-0701)	21
Abb. 7: Schematische Darstellung des BoDV-1-Genoms und der Transkripte (nach POROMBKA, (2006); HERDEN, (2009); OWENS et al.(2012); HERDEN et al., (2013))	34
Abb. 8: Schematische Darstellung des Borna disease virus 1 (modifiziert nach ViralZone: www.viralzone.expasy.org , SIB Swiss Institute of Bioinformatics).....	39
Abb. 9: Schematische Darstellung des Infektionszyklus des Borna disease virus 1 nach DE LA TORRE (2006)	42
Abb. 10: Schematische Darstellung potentieller Infektionswege des Borna disease virus 1 nach LENNARTZ et al. (2016)	44
Abb. 11: Schematische Darstellung der Proben des Gehirns (Lagerung bei -80 °C)	79
Abb. 12: Schematische Darstellung der Proben des Gehirns (Formalinfixierung)	80
Abb. 13: Schematische Darstellung der Proben der Nase (Formalinfixierung)	81
Abb. 14: Nachweis von BoDV-1-N mittels Immunfluoreszenz in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels, 10 dpi	92
Abb. 15: Anteil der infizierten Zellen nach BoDV-1-Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701	93
Abb. 16: Nachweis durch Immunfluoreszenz von Neuronen mittels β -III-Tubulin-Antigen in der Dissoziationskultur, 10 dpi.....	94
Abb. 17: Anteil der Neurone nach BoDV-1-Infektion der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701	95
Abb. 18: Darstellung der statistischen Trendanalyse des Neuronenanteils in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels in Bezug auf die Behandlung nach 4 dpi	97
Abb. 19: Darstellung der statistischen Trendanalyse des Neuronenanteils in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels in Bezug auf die Behandlung nach 7 dpi	97
Abb. 20: Darstellung der statistischen Trendanalyse des Neuronenanteils in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels in Bezug auf die Behandlung nach 10 dpi	98
Abb. 21: Darstellung der normalisierten Kopienzahl für die genomische und messenger RNA vier und sieben Tage nach der Infektion des olfaktorischen Epithels	99
Abb. 22: Nachweis olfaktorischer Hüllzellen der Ratte (Rolf B1.T) mittels Immunfluoreszenz	100
Abb. 23: Nachweis von BoDV-1-N in der permanenten Kultur olfaktorischer Hüllzellen der Ratte mittels Immunfluoreszenz (5 dpi).....	101
Abb. 24: Darstellung des Anteils der BoDV-1-infizierten Hüllzellen der Ratte (Rolf B1.T) an der Gesamtzellzahl.....	102
Abb. 25: Native olfaktorische Hüllzellen (Rolf B1.T) mit einfacher Poly-L-Lysin- und zusätzlicher Laminin-Beschichtung nach fünf Tagen	103
Abb. 26: Prozentualer Anteil der infizierten Zellen nach BoDV-1-Infektion der olfaktorischen Hüllzellen (Rolf B1.T) mit einfacher und doppelter Beschichtung	104
Abb. 27: Prozentualer Anteil der BoDV-1-infizierten olfaktorischen Hüllzellen (Rolf B1.T) nach Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701	105
Abb. 28: Darstellung der normalisierten Kopienzahl für die virale genomische und messenger RNA vier und sieben Tage nach der BoDV-1-Infektion der olfaktorischen Hüllzellen	107
Abb. 29: Vergleichende Darstellung des Nachweises viraler genomischer und viraler messenger RNA in der Dissoziationskultur des olfaktorischen Epithels (OE) und den olfaktorischen Hüllzellen (OEC).....	108

Abb. 30: Darstellung der durchschnittlichen Gewichtsveränderung der Versuchstiere in Prozent des Anfangsgewichts bezogen auf die Zeit nach der Infektion bzw. Mock-Infektion.....	110
Abb. 31: Histologischer Nachweis von mononukleären, meningealen und perivaskulären Infiltraten nach 21 dpi.....	111
Abb. 32: Nachweis von BoDV-1-N im olfaktorischen Epithel nach 21 dpi mittels Immunhistologie ...	112
Abb. 33: Nachweis von BoDV-1-N im Gehirn nach 21 dpi mittels Immunhistologie	112
Abb. 34: Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N im olfaktorischen Epithel nach 21 dpi (Mock-Infektion).....	113
Abb. 35: Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N im olfaktorischen Epithel nach 21 dpi	114
Abb. 36: Gesamtanzahl der infizierten Zellen 14 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 in der Nase (Lokalisation D-G).....	115
Abb. 37: Gesamtanzahl der infizierten Zellen 21 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 in der Nase (Lokalisation D-G).....	116
Abb. 38: Immunhistologischer Nachweis von BoDV-1-N in diversen Zelltypen des olfaktorischen Epithels nach 21 dpi	117
Abb. 39: Anzahl der infizierten Zellen 14 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Zelltypen	119
Abb. 40: Anzahl der infizierten Zellen 21 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Zelltypen	120
Abb. 41: Nachweis von BoDV-1-N mittels Immunhistologie im Gehirn nach intranasaler Infektion (21 dpi).....	121
Abb. 42: Kartierung am Beispiel der Lokalisation II des Gehirns (nach Abb. 12) eines BoDV-1-infizierten Tieres nach 21 dpi	122
Abb. 43: Kartierung am Beispiel der Lokalisation IV des Gehirns (nach Abb. 12) eines BoDV-1-infizierten Tieres nach 21 dpi	123
Abb. 44: Score der infizierten Zellen 14 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701	124
Abb. 45: Score der infizierten Zellen 21 Tage nach BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701	126
Abb. 46: Gegenüberstellung ausgewählter Gehirnlokalisationen von BoDV-1-infizierten und zusätzlich MI-0701-behandelten Tieren nach 21 dpi mittels immunhistologischem Nachweis von BoDV-1-N	128
Abb. 47: Kinetik des Nachweises von BoDV-1-N-spezifischer gRNA und mRNA in der Nase und im Gehirn	130
Abb. 48: Vergleichende Infektionskinetik 14 Tage nach intranasaler BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Lokalisation (Nase und Gehirn)	131
Abb. 49: Vergleichende Infektionskinetik 21 Tage nach intranasaler BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Lokalisation (Nase und Gehirn)	132
Abb. 50: Vergleichende Infektionskinetik 14 und 21 Tage nach intranasaler BoDV-1-Infektion und Behandlung mit dem Inhibitor MI-0701 bezogen auf die Lokalisation (Nase und Gehirn)	134
Abb. 51: Immunhistologischer Nachweis von Caspase 3 im olfaktorischen Epithel, 14 dpi	135
Abb. 52: Anzahl der Caspase-positiven Zellen des olfaktorischen Epithels nach BoDV-1-Infektion..	136

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt

Frau Prof. Dr. Christiane Herden für die hervorragende Betreuung sowie den unermüdlichen Ansporn und die kritische Diskussion.

Herrn Dr. Werner Hecht für den exzellenten wissenschaftlichen Beistand und ein stets offenes Ohr.

Herrn Dr. Manfred Henrich und Herrn Dr. Kernt Köhler für die ansteckende Begeisterung für die Disziplin der Pathologie, ihre ausgezeichnete Hilfe bei technischen Hindernissen und ihre zielorientierte Problemlösung.

Frau Silke Engel, Frau Silke Gantz sowie dem gesamten technischen Personal des Instituts für die hervorragende Unterstützung im Labor.

Herrn Dr. Markus Eickmann für die freundliche Aufnahme und das entgegengebrachte Vertrauen bei den Arbeiten im BSL3-Labor.

Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

der Justus-Liebig-Universität Gießen für die finanzielle Unterstützung in Form eines Graduiertenstipendiums.

den Doktoranden des Instituts für Veterinär-Pathologie für die Begleitung durch Höhen und Tiefen.

Frau Dr. Alexandra Kupke für ihre souveräne Unterstützung in allen Bereichen, das geduldige Beantworten all meiner Fragen und das Mutmachen in schwierigen Phasen.

all den Ratten, welche für diese wissenschaftlichen Erkenntnisse ihr Leben gelassen haben.

meiner Familie und meinen Freunden für ihre grenzenlose Unterstützung und ihren steten Zuspruch.

meinem Mann Christian für seine bedingungslose Liebe und seine erstaunliche Geduld.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6989-6

