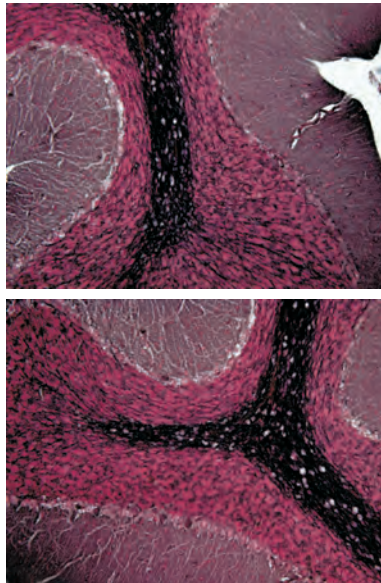


IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MYELINISIERUNG UND ROLLE DER OLIGODENDROGLIA IM GEHIRN NACH NEONATALER AEROGENER INFEKTION VON LEWIS RATTEN MIT DEM BORNA DISEASE VIRUS

MICHAELA SCHEPERS



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2009

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 Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Institut für Immunologie des
Friedrich-Loeffler-Institutes Tübingen

Betreuer: Prof. Dr. Lothar Stitz

und

dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Bilzer

**Immunhistochemische Untersuchungen zur Myelinisierung und
Rolle der Oligodendroglia im Gehirn nach neonataler aerogener
Infektion von Lewis Ratten mit dem Borna Disease Virus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Michaela Schepers

Tierärztin aus Mülheim an der Ruhr

Gießen 2009

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. L. Stitz

Prof. Dr. T. Bilzer

Tag der Disputation: 06.07.2009

Inhaltsverzeichnis

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	<u>I</u>
<u>ABKÜRZUNGEN</u>	<u>V</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
<u>2 LITERATURÜBERSICHT</u>	<u>4</u>
2.1 DAS BORNA DISEASE VIRUS (BDV)	4
2.1.1 TAXONOMIE	4
2.1.2 MOLEKULARBIOLOGIE	5
2.1.3 ALLGEMEINE ERREGEREIGENSCHAFTEN	11
2.1.4 PERSISTENZ	11
2.1.5 ZELLTROPISMUS	12
2.1.6 EINFLÜSSE DES BDV AUF DIE NEURONALE PLASTIZITÄT	14
2.1.7 IMMUNPATHOLOGIE	15
2.1.8 EPIDEMIOLOGIE	18
2.2 KLINIK UND NEUROPATHOLOGIE	20
2.2.1 NATÜRLICHE INFEKTIONEN BEIM TIER	20
2.2.2 BDV-INFEKTION BEIM MENSCHEN	24
2.2.3 MODELL DER NEONATAL INFIZIERTEN RATTE	26
2.2.4 MODELL DER ADULT INFIZIERTEN RATTE	28
2.2.5 MAUS-MODELL	29
2.2.6 GERBIL-MODELL	30
2.3 OLIGODENDROZYTEN UND MYELINISIERUNG	30
2.3.1 OLIGODENDROZYTEN	30
2.3.2 PHYSIOLOGIE DER MYELINISIERUNG	32
2.3.3 VIRUSINFEKTIONEN MIT BETEILIGUNG DER OLIGODENDROGLIA	33

3	MATERIAL UND METHODEN	38
3.1	MATERIAL	38
3.1.1	CHEMIKALIEN	38
3.1.2	GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	41
3.1.3	ANTIKÖRPER	42
3.1.4	VERSUCHSTIERE	43
3.1.5	VIRUSSTAMM	44
3.2	AEROGENE INFEKTION	44
3.3	AUFARBEITUNG DER GEHIRNE	45
3.3.1	PARAFFIN-EINBETTUNG	45
3.3.2	AUSGIEßEN UND AUFBLOCKEN DER PRÄPARATE	46
3.3.3	SCHNEIDEN	47
3.4	HISTOLOGISCHE UND HISTOCHEMISCHE FÄRBEMETHODEN	47
3.4.1	HE-FÄRBUNG	47
3.4.2	KV-FÄRBUNG	48
3.4.3	MYELIN-FÄRBUNG (SUDANSCHWARZ-FÄRBUNG)	48
3.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBEMETHODEN	49
3.5.1	GRUNDLAGEN DER IMMUNHISTOCHEMIE	49
3.5.2	IMMUNHISTOCHEMISCHES PROTOKOLL (ULTRATEK-METHODE) MIT DAB	51
3.5.3	IMMUNHISTOCHEMISCHES PROTOKOLL (ABC-METHODE) MIT DAB	52
3.5.4	DOPPELMARKIERUNGEN	55
3.6	AUSWERTUNG DER FÄRBUNGEN	61
3.6.1	HE-FÄRBUNG	61
3.6.2	KV-FÄRBUNG	61
3.6.3	P24 UND P38-IMMUNHISTOCHEMIE	62
3.6.4	ED1-IMMUNHISTOCHEMIE	63
3.6.5	CD45RC- UND CD8-IMMUNHISTOCHEMIE	64
3.6.6	OLIG2-IMMUNHISTOCHEMIE	65
3.6.7	SSW-FÄRBUNG UND MBP-IMMUNHISTOCHEMIE	65

4	ERGEBNISSE	67
4.1	KLINISCHE DATEN	67
4.2	HE-FÄRBUNG	72
4.3	KV-FÄRBUNG	75
4.4	BDV-VERTEILUNG	77
4.5	MIKROGLIA / MAKROPHAGEN	87
4.6	IMMUNZELLEN (CD45RC UND CD8)	95
4.7	OLIGODENDROZYTEN	103
4.8	CHARAKTERISIERUNG DER MYELINISIERUNG	111
4.9	GESAMTÜBERSICHT	120
5	DISKUSSION	126
5.1	INFEKTIONSVERLAUF UND KLINIK	127
5.2	HISTOMORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DES HIRNGEWEBES	133
5.3	BDV-VERTEILUNG	134
5.4	OLIGODENDROZYTEN	135
5.4.1	BDV-INFIZIERTE OLIGODENDROZYTEN	135
5.4.2	OLIGODENDROZYTENPATHOLOGIE	136
5.5	MYELINSTRUKTUR	138
5.5.1	MYELINSTRUKTUR NACH ZYTOLYSE DER OLIGODENDROZYTEN	140
5.5.2	FUNKTIONELLE BEEINTRÄCHTIGUNG DER MYELINISIERUNGSABLÄUFE	140
5.5.3	MYELINSTRUKTUR NACH PRIMÄRER AFFEKTION DER MYELINSCHIEDEN	141
5.5.4	MYELINSTRUKTUR NACH WALLERSCHER DEGENERATION	142
5.5.5	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG DER MYELINSTRUKTURVERÄNDERUNG IM VORLIEGENDEN MODELL	143
5.6	KORRELATION DER NEUROPATHOLOGISCHEN BEFUNDE	143
5.6.1	OLIGODENDROZYTEN-/MYELINPATHOLOGIE UND AXONALE SCHÄDEN	143
5.6.2	OLIGODENDROZYTEN-/MYELINPATHOLOGIE UND MIKROGLIA / MAKROPHAGEN	146
5.6.3	OLIGODENDROZYTEN-/MYELINPATHOLOGIE UND IMMUNZELLEN	148

Inhaltsverzeichnis

5.6.4	OLIGODENDROZYTEN-/MYELINPATHOLOGIE UND ASTROZYTEN	148
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>150</u>
7	<u>SUMMARY</u>	<u>152</u>
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>154</u>
9	<u>ANHANG</u>	<u>188</u>

Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
B	Bulbus olfactorius
BD	Borna disease (Bornasche Krankheit)
BDNF	Brain derived neurotrophic factor (<i>Neurotrophin</i>)
BDV	Borna disease virus
BPIV-3	Bovines Parainfluenzavirus Typ 3
BRSV	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
bzw.	beziehungsweise
C	Cortex
°C	Grad Celsius
CA	CA-Felder des Ammonshorns (Cornu ammonis)
Cc	Corpus callosum
CD	Cluster of differentiation
CDV	Canine distemper virus (Staupevirus)
CK II	Casein Kinase II
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
d.h.	das heißt
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
ECLIA	Elektrochemiluminescence immunosorbent assay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK 1/2	Extracellular signal regulated kinase 1/2
ffu	focus forming units

Abkürzungen

G	Glykoprotein des BDV
GAP-43	Growth associated protein 43
GP-C	C-terminales Spaltprodukt von G
GP-N	N-terminales Spaltprodukt von G
Hc	Hippocampus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ 1
HPIV-1	Humanes Parainfluenzavirus Typ 1
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus
i.c.	Intrazerebral
ICTV	International committee on taxonomy of viruses (Internationales Komitee für die Taxonomie von Viren)
IFN	Interferon
IFT	Immunfluoreszenztest
IHC	Immunhistochemie
IHNV	Infectious hematopoietic necrosis virus (Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose der Salmoniden)
IL	Interleukin
IRF-3	Interferon regulatory factor-3
ITR	Inverted terminal repeat
kb	Kilobasen
KH	Kleinhirn
KHM	Kleinhirnmark
Kör	Körnerzellschicht des Kleinhirns
KV	Kresylviolett
L	Polymerase des BDV
LNYYV	Lettuce necrotic yellows virus

Abkürzungen

LSAB-Methode	Labeled-Streptavidin-Biotin-Methode
M	Matrixprotein des BDV
MAG	Myelin associated glycoprotein (Myelinassoziertes Glykoprotein)
MBP	Myelin basic protein (Basisches Myelinprotein)
MH	Mittelhirn
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Mol	Molekularschicht des Kleinhirns
mRNA	messenger-RNA (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Multiple Sklerose
N	Nukleoprotein des BDV
N. olfactorius / N. opticus	Nervus olfactorius (Riechnerv) / Nervus opticus (Sehnerv)
NBAE	Neonatal aerogen infiziert
NF	Neurofilament
NF-kB	Nuclear factor-kappa B (<i>Transkriptionsfaktor</i>)
NGF	Nerve growth factor (<i>Neurotrophin</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLS	Nukleus-Lokalisations-Signal
nm	Nanometer
NNS-Virus	Nichtsegmentiertes Negativ-Strang-Virus
NT-3	Neurotrophin 3 (<i>Neurotrophin</i>)
NT-4/5	Neurotrophin 4/5 (<i>Neurotrophine</i>)
ORF	Open reading frame (Offener Leserahmen)
P	Phosphoprotein des BDV
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)

Abkürzungen

PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PC	Purkinje-Zellschicht
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
p.i.	post infectionem
PKC _ε	Proteinkinase C _ε
PMP22	Peripheres Myelin Protein 22
PNS	Peripheres Nervensystem
P-NS	Pferde-Normalserum
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNP	Ribonukleoprotein
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion)
SD	Staggering disease
SSPE	Subakute Sklerosierende Panenzephalitis
SSW	Sudanschwarz
StH	Stammhirn
Str.	Stratum
TANK	Traf family member-associated NF-kB activator
TBK-1	TANK-binding kinase-1
TMEV	Theiler's murine encephalomyelitis virus
u.a.	unter anderem
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem
Z-NS	Ziegen-Normalserum
z.T.	zum Teil
μl	Mikroliter

1 Einleitung

Das Borna Disease Virus (BDV) ist ein neurotropes nichtsegmentiertes Negativstrang-RNA-Virus (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a). Eine natürliche Infektion mit dem BDV kann vor allem bei Pferden und Schafen zu einer progressiv verlaufenden Meningopolioenzephalomyelitis führen (ZWICK, 1939; HEINIG, 1969; ROTT und BECHT, 1995).

Das BDV wird als einziger Vertreter der Familie Bornaviridae innerhalb der Ordnung Mononegavirales eingeordnet (PRINGLE, 1996). Untypisch für ein RNA-Virus ist die hohe Konserviertheit des BDV-Genoms (SCHNEIDER *et al.*, 1994a). Weitere Besonderheiten des Virus sind der strenge Neurotropismus mit einer Prävalenz für Strukturen des limbischen Systems sowie das breite natürliche Wirtsspektrum. Ursprünglich bei Pferd und Schaf beschrieben, umfasst das Wirtsspektrum des BDV inzwischen zahlreiche weitere Säugetierspezies wie Rind (CAPLAZI *et al.*, 1994; HAGIWARA *et al.*, 1996), Ziege (CAPLAZI *et al.*, 1999), Kaninchen (METZLER *et al.*, 1978), Hund (WEISSENBÖCK *et al.*, 1998a), Katze (LUNDGREN *et al.*, 1995; BERG *et al.*, 1998; REEVES *et al.*, 1998), Affe, Alpaka, Flußpferd (SCHÜPPEL *et al.*, 1994, 1995), Luchs (DEGIORGIS *et al.*, 2000), Fuchs (DAUPHIN *et al.*, 2001) sowie Vögel wie Strauß (MALKINSON *et al.*, 1995), Wildvögel (BERG *et al.*, 2001) und Psittaziden (HONKAVUORI *et al.*, 2008). Basierend auf serologischen und molekularbiologischen Untersuchungen beim Menschen wird BDV im Zusammenhang mit psychiatrischen Krankheitsbildern diskutiert (CHALMERS *et al.*, 2005). Experimentell sind nahezu alle Tierarten einschließlich Primaten mit dem BDV infizierbar (STITZ *et al.*, 1981; LUDWIG *et al.*, 1988; ROTT und BECHT, 1995). Die Auswirkungen der Infektion sind hierbei von der Spezies, dem Alter und dem Immunstatus zum Zeitpunkt der Infektion sowie vom verwendeten Virusstamm abhängig (LUDWIG *et al.*, 1985, 1988; ROTT und BECHT, 1995; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b; HALLENSLEBEN *et al.*, 1998).

Das BDV besitzt eine starke Affinität zu Neuronen der Hippocampus-Formation (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984; GOSZTONYI *et al.*, 1993; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b). Aufgrund seiner nicht-zytolytischen Eigenschaften und eines sehr langsamen Replikationszyklus etabliert sich eine persistente Virusinfektion (RICHT *et al.*, 1992). Die Bornasche Krankheit (Borna Disease, BD)

bezeichnet die durch virales Antigen ausgelöste immunpathologische und vorwiegend lymphozytäre Meningopolyoencephalomyelitis, an der CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen sowie Makrophagen beteiligt sind. CD8⁺ T-Zellen fungieren dabei als zytotoxische Effektorzellen, die zu neuronalen und glialen Zellverlusten mit resultierender kortikaler Atrophie führen (BILZER und STITZ, 1994; BILZER *et al.*, 1995; STITZ *et al.*, 1995, 2002).

Eine experimentelle Infektion neonataler Lewis Ratten verläuft ohne wesentliche immunpathologische Reaktionen und ist daher geeignet, direkte Viruswirkungen und Persistenzmechanismen zu erforschen (HIRANO *et al.*, 1983; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2005). Aufgrund der Manifestation von Verhaltensauffälligkeiten, Lerndefiziten und Hirnentwicklungsstörungen dient die neonatal infizierte Lewis Ratte außerdem als Modell für neuropsychiatrische Krankheiten des Menschen wie Autismus (PLETNIKOV *et al.*, 1999b; HORNIG *et al.*, 2001) und Schizophrenie (DITTRICH *et al.*, 1989; RUBIN *et al.*, 1999a).

Bisher haben sich die Forschungsarbeiten in dem Modell der neonatal infizierten Lewis Ratte nahezu ausschließlich auf die graue Hirnsubstanz konzentriert. Synapsendysfunktionen (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000; DIETZ *et al.*, 2004; HANS *et al.*, 2004; VOLMER *et al.*, 2006), Neurotransmitterstörungen (PLETNIKOV *et al.*, 2000, 2002b; DIETZ und PLETNIKOV, 2003; DIETZ *et al.*, 2004), Mikrogliose mit Expression von Zytokinen (HORNIG *et al.*, 1999; WEISSENBÖCK *et al.*, 2000; OVANESOV *et al.*, 2008) sowie Neuronenverluste (EISENMAN *et al.*, 1999; HORNIG *et al.*, 1999; WEISSENBÖCK *et al.*, 2000; PLETNIKOV *et al.*, 2002a; DIETZ und PLETNIKOV, 2003) bzw. funktionelle Neuronenstörungen (ZOCHER *et al.*, 2000; DIETZ *et al.*, 2004) wurden beschrieben. Systematische Untersuchungen der weißen Substanz wurden bisher nicht durchgeführt. Es ist lediglich bekannt, dass Oligodendrozyten sowohl *in vitro* (PAULI und LUDWIG, 1985; JORDAN *et al.*, 1999; PLANZ *et al.*, 2001b; IBRAHIM *et al.*, 2002; SAUDER *et al.*, 2004) als auch *in vivo* (NARAYAN *et al.*, 1983b; CARBONE *et al.*, 1989, DESCHL *et al.*, 1990; CARBONE *et al.*, 1991a; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995) mit dem BDV infiziert werden können. Die Auswirkungen der Infektion auf die Oligodendrozyten sind bisher aber noch unklar.

Oligodendrozyten sind bei zahlreichen Virusinfektionen des ZNS pathogenetisch involviert, u. a. bei Infektionen mit Viren aus der Ordnung der Mononegavirales wie dem Staupevirus

(MÜLLER *et al.*, 1995; ZURBRIGGEN *et al.*, 1998) und dem Masernvirus (BACZKO *et al.*, 1988; ISAACSON *et al.*, 1996).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Einflüsse des BDV auf Oligodendrozyten im Gehirn experimentell neonatal aerogen infizierter Lewis Ratten untersucht werden. Die Hauptfunktion der Oligodendrozyten ist die Myelinisierung der Axone im Zentralen Nervensystem (ZNS), um eine schnelle saltatorische Erregungsleitung zu gewährleisten (WAXMAN, 1977). Da die Myelinisierung postpartal nach einem zeitlich geordneten Schema abläuft, ist sie gleichzeitig ein wichtiger Funktionsparameter der Hirnontogenese (DAMBSKA und LAURE-KAMIONOWSKA, 1990). Mit histologischen und immunhistologischen Methoden sollte der Myelinisierungsgrad des ZNS zu unterschiedlichen Zeitpunkten post infectionem (p.i.) untersucht werden. Immunhistochemische Verfahren wurden eingesetzt, um eine bessere morphologische Beurteilung der Oligodendrozyten zu ermöglichen. Weiterhin sollte versucht werden, BDV-infizierte Oligodendrozyten mit Doppelmarkierungstechniken spezifisch darzustellen. Neben der Funktion als myelinbildende Zellen des ZNS existieren zahlreiche funktionelle Einflüsse von Oligodendrozyten auf Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Immunzellen (*Übersicht bei* NDUBAKU und DE BELLARD, 2008). Daher sollten die erhobenen Befunde im Zusammenhang mit anderen pathomorphologischen Veränderungen des ZNS-Gewebes diskutiert werden.

Die Untersuchungen sollen einen Beitrag zum Verständnis der Beteiligung von Oligodendrozyten im Infektionsgeschehen der persistenten BDV-Infektion liefern.

Bisher wurden die Ratten in der Regel intrazerebral infiziert. Der in der vorliegenden Studie gewählte aerogen intranasale Infektionsweg ist ein minimal invasives Verfahren, welcher die vermutete natürliche Transmissionsroute nachahmt.

Die experimentelle aerogene BDV-Infektion sowie klinische, virologische und serologische Untersuchungen der Versuchstiere im Rahmen dieser Studie wurden im Institut für Immunologie des Friedrich-Löffler-Instituts in Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. L. Stitz durchgeführt.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Borna Disease Virus (BDV)

2.1.1 Taxonomie

Das BDV ist ein behülltes RNA-Virus mit einem nichtsegmentierten einzelsträngigen Genom mit negativer Polarität (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a). Das Virus wurde wie die Filoviridae, Paramyxoviridae und Rhabdoviridae der Ordnung Mononegavirales zugeordnet (PRINGLE, 1996). Ähnlichkeiten im Genomaufbau lassen auf eine phylogenetische Verwandtschaft zwischen dem BDV und den genannten Familien schließen (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a; DE LA TORRE, 1994).

Tabelle 2-1: Ordnung Mononegavirales (in Anlehnung an das ICTV)

Familie	Genus	Spezies
Bornaviridae	Bornavirus	Borna Disease Virus (BDV)
Filoviridae	Ebola-like-viruses Marburg-like-viruses	Zaire Ebola Virus Lake Victoria Marburgvirus
Paramyxoviridae		
- Paramyxovirinae	Respirovirus Morbillivirus Rubulavirus	BPIV-3, HPIV-1, Sendaivirus Masern-, Staupe-, Rinderpestvirus Mumps-Virus
- Pneumovirinae	Pneumovirus Metapneumovirus	BRSV, HRSV Rhinotracheitisvirus der Pute
Rhabdoviridae	Vesikulovirus Lyssavirus Ephemerovirus Novirhabdovirus Cytorhabdovirus Nucleorhabdovirus	Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV) Rabies (Tollwut) Virus Bovines Ephemeral Fieber Virus IHNV der Salmoniden LNYV Potato yellow dwarf virus

Entscheidende Unterschiede bestehen jedoch im Replikationsmechanismus. So finden Replikation und Transkription beim BDV und bei den Pflanzenrhabdoviren (Nucleorhabdoviridae) im Nukleus der Wirtszelle statt, während diese Prozesse bei allen anderen Vertretern der Mononegavirales im Zytoplasma stattfinden (BRIESE *et al.*, 1992; CUBITT und DE LA TORRE, 1994).

Zur Modifikation der mRNA bedient sich das BDV der Splicing-Maschinerie der Wirtszelle (CUBITT *et al.*, 1994b; SCHNEIDER *et al.*, 1994b). Dies ist sonst nur bei segmentierten RNA-Viren (Orthomyxoviridae) bekannt.

Aufgrund dieser einzigartigen Eigenschaften wurde das BDV in der neu definierten Familie Bornaviridae innerhalb der Ordnung Mononegavirales eingeordnet (PRINGLE, 1996).

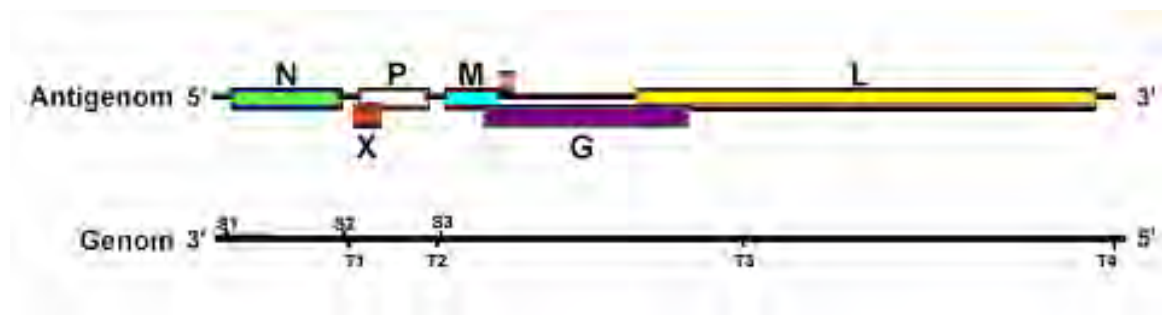
2.1.2 Molekularbiologie

Die Virusätiologie der BD wurde Anfang des 20. Jahrhunderts bewiesen (ZWICK und SEIFRIED, 1925; ZWICK *et al.*, 1927; ZWICK, 1939). 1929 gelang die erste Isolierung des Referenzstamms V aus Gehirnhomogenat eines erkrankten Pferdes nach mehrfacher Passage im Kaninchen (*Übersicht bei* DÜRRWALD und LUDWIG, 1997). Die vollständige Sequenzierung des RNA-Genoms erfolgte in den neunziger Jahren (LIPKIN *et al.*, 1990; VANDEWOUDE *et al.*, 1990). Das BDV-Genom ist mit einer Länge von 8,9 kb relativ kompakt im Vergleich zu anderen NNS RNA-Viren (BRIESE *et al.*, 1994; CUBITT *et al.*, 1994a). Dies hängt mit der Überlappung verschiedener offener Leserahmen (ORFs) und Transkriptionseinheiten zusammen. Das Genom enthält sechs ORFs, die sich auf drei Transkriptionseinheiten befinden (SCHNEEMANN *et al.*, 1994). Es erweist sich als ungewöhnlich stabil und hochkonserviert (SCHNEIDER *et al.*, 1994a). Die Konserviertheit des Genoms ist untypisch für RNA-Viren, die normalerweise eine hohe genetische Variabilität aufweisen (HOLLAND *et al.*, 1982). Vollständige Sequenzanalysen der Referenzstämme V und He/80 belegen eine 95%ige Genomhomologie (PLESCHKA *et al.*, 2001). Diese hohe genetische Übereinstimmung ist unabhängig vom Zeitpunkt der Isolierung und von der Tierart, aus der das Genom isoliert wurde (KOLODZIEJEK *et al.*, 2005), und zeigte sich auch in Zellkulturen nach mehrfacher Passage (STAEHELI *et al.*, 2000). Eine Ausnahme stellt ein neuer BDV-Stamm dar, der aus einem Pferd in Österreich isoliert wurde. No/98 weist eine Genomdivergenz von 15 % zu den Referenzstämmen auf, allerdings sind die

Aminosäuresequenzen der exprimierten Proteine bis auf das X-Protein zu mehr als 96 % homolog (NOWOTNY *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass Virusisolate auch außerhalb der endemischen Regionen erstaunliche Ähnlichkeiten mit den Referenzstämmen aufweisen, wird kontrovers diskutiert. Laborkontaminationen werden ebenso in Betracht gezogen wie die Existenz einer möglicherweise großen Vielfalt noch nicht klassifizierter BDV-Varianten (STAEHELI *et al.*, 2000).

Das Genom kodiert für mindestens sechs Proteine (BRIESE *et al.*, 1994). Bis auf das X-Protein korrelieren alle Proteine mit den Proteinen, die auch bei anderen NNS-Viren vorkommen. Vom 5' zum 3' Ende werden folgende Proteine kodiert:

Abbildung 2-1: Genomkarte des BDV



Modifiziert aus: BILLICH, 2002

Das 8,9 kb lange Genom in Negativstrang-Orientierung enthält sechs teilweise überlappende ORFs, die in drei Transkriptionseinheiten angeordnet sind. Startcodons (S1, S2, S3) und Terminationssignale (T1, T2, T3, T4) sind auf der unteren Leiste aufgetragen.

Nukleoprotein N: Der erste offene Leserahmen (ORF I) befindet sich auf der ersten Transkriptionseinheit und kodiert für das Nukleoprotein. N kommt in zwei Isoformen vor (p38/p40). Der funktionelle Unterschied zwischen den beiden Isoformen ist noch unklar. Dem p38-Protein fehlt das Nukleus-Lokalisations-Signal (NLS) (KOBAYASHI *et al.*, 1998). Da jedoch beide Isoformen im Nukleus nachgewiesen werden, wird der nukleäre Transport vermutlich durch Interaktion mit anderen Virusbestandteilen gewährleistet. Das N-Protein fungiert als Kernimport- und -exportprotein. Es scheint essentiell für den nukleären Export des Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes zu sein (KOBAYASHI *et al.*, 2001). N ist am stärksten immunogen wirksam: p40-AK werden schon in frühen Infektionsphasen detektiert (STITZ *et al.*, 1998; FURRER *et al.*, 2001a). Ein auf dem N-Protein lokalisiertes Epitop gilt

als Hauptziel der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunantwort (PLANZ und STITZ, 1999; PLANZ *et al.*, 2001a), was mit der starken Expression des Nukleoproteins in infiziertem Gewebe gut übereinstimmt (LUDWIG *et al.*, 1988).

Protein X: Das Protein X (p10) gilt als das kleinste Transkript des BDV-Genoms. Es ist auf der zweiten Transkriptionseinheit lokalisiert und überlappt mit dem ORF für P. Es handelt sich um ein Nicht-Strukturprotein. Quantitative Messungen der Proteine X, P und N haben ergeben, dass diese Proteine in einem Konzentrationsverhältnis von 1 : 6 : 40 im Nukleus der Wirtszelle vorkommen. Da X im Verhältnis 1 : 6 mit P die Polymerase-Aktivität um 30 % hemmt, wird diskutiert, dass X über diesen Mechanismus zur Viruspersistenz beiträgt. Das Fehlen von X in Viruspartikeln in frühen Infektionsphasen gewährleistet hingegen eine hohe Polymerase-Aktivität (SCHWARDT *et al.*, 2005). Für X wird die Funktion eines Kernexportproteins diskutiert. Es besitzt Leucin-reiche Regionen, die sequentiell den Kernexportproteinen anderer Viren, beispielsweise HIV-1, ähneln (FISCHER *et al.*, 1995; WEN *et al.*, 1995). Interaktionen mit den Proteinen P und N sind beschrieben und deuten darauf hin, dass X möglicherweise ein Bestandteil des RNP-Komplexes ist (SCHWEMMLE *et al.*, 1998; MALIK *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 2000). MAYER *et al.* konnten X jedoch nicht in RNP-Komplexen nachweisen (2005).

Phosphoprotein P: ORF II befindet sich auf der zweiten Transkriptionseinheit und exprimiert das Phosphoprotein P (p24). P verfügt über ein NLS und gelangt gebunden an andere virale Proteine in den Zellkern (SHOYA *et al.*, 1998; SCHWEMMLE *et al.*, 1999b). Virale Phosphoproteine dienen allgemein als Kofaktoren für die virale Transkription und Replikation (POENISCH *et al.*, 2004). P interagiert mit den Proteinen N und X sowie mit zellulären Kinasen. Hauptsächlich wird P durch die zelluläre Proteinkinase C_ε (PKC_ε) phosphoryliert, zu einem geringeren Anteil durch die Casein Kinase II (CK II) (THIEDEMANN *et al.*, 1992; SCHWEMMLE *et al.*, 1997). Die hohe Dichte der PKC_ε im limbischen System könnte daher mitverantwortlich für den Neurotropismus des BDV sein (THIEDEMANN *et al.*, 1992; SAITO *et al.*, 1993; SCHWEMMLE *et al.*, 1997; JORDAN und LIPKIN, 2001). P hemmt die BDNF-induzierte Phosphorylierung der ERK 1/2 mit

resultierender Synapsendysfunktion (HANS *et al.*, 2004). Durch Interaktion mit der PKC vermindert P kompetitiv die Phosphorylierung von Substraten in synaptischen Vesikeln. Die unzureichende Phosphorylierung der Substrate führt letztendlich zu einer Blockade der synaptischen Signalübertragung (VOLMER *et al.*, 2006). Desweiteren wird eine Beeinflussung der Immunantwort durch das Phosphoprotein beschrieben. P tritt durch einen kompetitiven Mechanismus mit der TANK-binding Kinase-1 (TBK-1) in Kontakt und hemmt dadurch die Phosphorylierung des zentralen Transkriptionsfaktors IRF3 im Rahmen der Interferon-Aktivierungs-Kaskade. Hierdurch wird die Bildung der antiviralen Zytokine IFN- α und IFN- β blockiert (UNTERSTAB *et al.*, 2005). Phosphorylierungsprozesse scheinen in der Pathogenese der BDV-Infektion eine wichtige Rolle zu spielen. Direkte modulative Eigenschaften des P-Proteins konnten am Modell der transgenen P-exprimierenden Maus eindrucksvoll demonstriert werden. Die Manifestation von Verhaltensauffälligkeiten lässt die Schlussfolgerung zu, dass P alleine die ZNS-Homöostase beeinträchtigen kann (KAMITANI *et al.*, 2003).

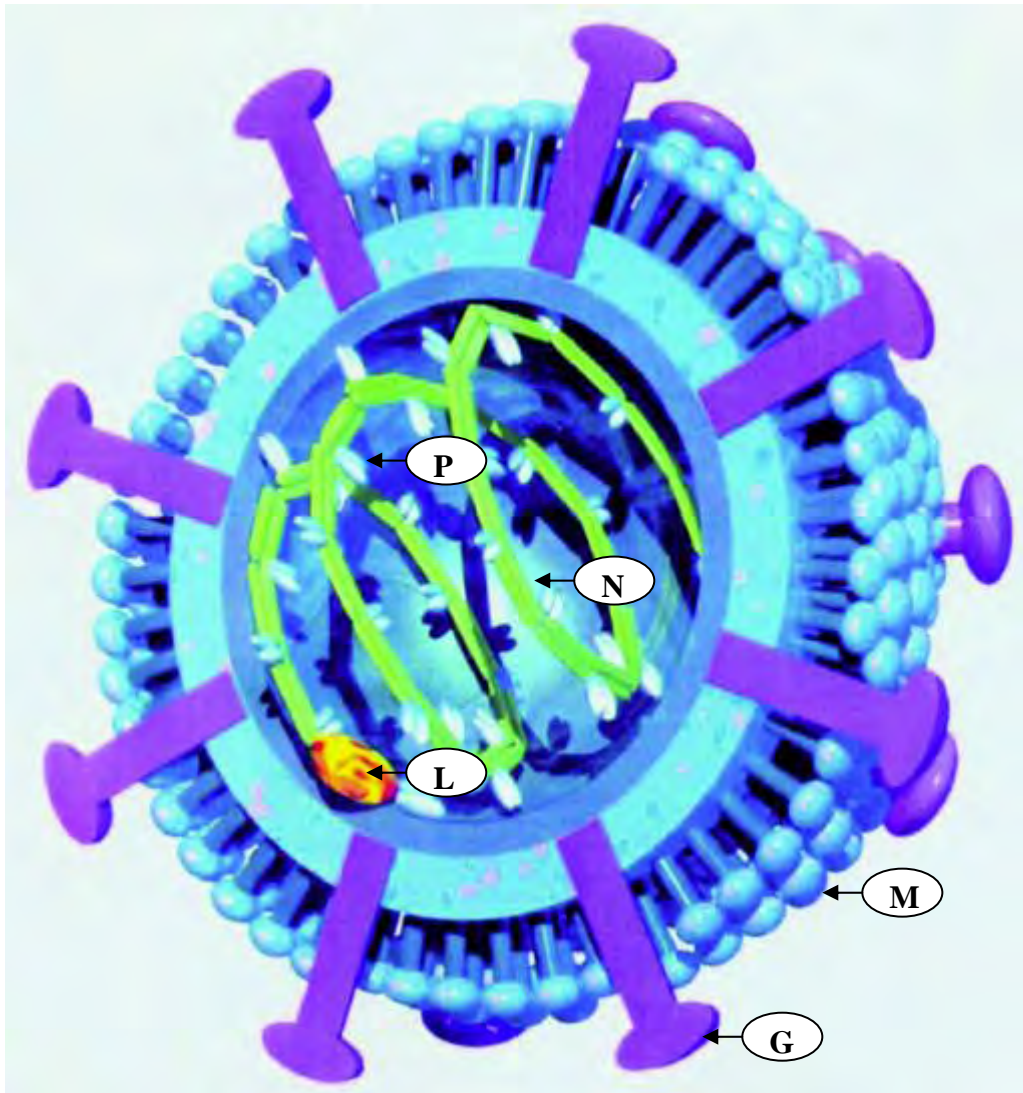
Matrixprotein M: Das Matrixprotein M (p16) des dritten Transkripts formt stabile Tetramere und besitzt hydrophobe Sequenzen, die für Transmembranproteine charakteristisch sind (STOYLOFF *et al.*, 1997). Es ist auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht der Virushülle lokalisiert. Dies dient vermutlich der Membranstabilisierung. Aufgrund seiner Struktureigenschaften ist das Matrixprotein wesentlich an der Bildung von Viruspartikeln beteiligt (KRAUS *et al.*, 2005). Zwei Beobachtungen lassen vermuten, dass M ein Oberflächenprotein des BDV ist und den Rezeptor-vermittelten Zellkontakt zur Wirtszelle herstellt. Zum einen besitzen Antikörper gegen M neutralisierende Eigenschaften (HATALSKI *et al.*, 1995). Zum anderen verhindert die Präinkubation empfänglicher Zellen mit M die Infektion (KLICHE *et al.*, 1994).

Glykoprotein G: Das Hüllprotein G (gp94) entsteht durch N-Glykosylierung des 57kD-Proteins, welches vom ORF IV des dritten Transkripts kodiert wird (SCHNEIDER *et al.*, 1997; RICHT *et al.*, 1998; KIERMAYER *et al.*, 2002). Die anschließende Spaltung durch die zelluläre Protease Furin in die zwei Untereinheiten GP-N (gp51) und GP-C (gp43) ist für die

Infektiosität des Virus essentiell (RICHT *et al.*, 1998; KIERMAYER *et al.*, 2002). Hierbei stellt GP-N über Rezeptorbindung den Erstkontakt zur Wirtszellmembran her, und GP-C vermittelt die anschließende Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a, 1998; PEREZ *et al.*, 2001). Die Präinkubation mit neutralisierenden AK gegen das Glykoprotein verhinderte die Virus-vermittelte Zellfusion und dadurch die Virusausbreitung in hippocampalen Zellkulturen (BAJRAMOVIC *et al.*, 2003; FURRER *et al.*, 2004). Dies steht im Widerspruch zu der früheren Annahme, dass die Infektionsausbreitung allein über Ribonukleoproteine gesteuert wird. Diese Hypothese stützte sich auf die Tatsache, dass in Gehirnen infizierter Tiere trotz hoher Expressionsleistung keine vollständigen umhüllten Viruspartikel nachgewiesen werden konnten (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995). In BDV-infizierten Zellen ist G vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, es ist weniger auf der Zelloberfläche zu finden (EICKMANN *et al.*, 2005). Im vollständigen Viruspartikel ist das Glykoprotein in Form von Spikes in die Hüllmembran integriert (KOHNO *et al.*, 1999).

Polymerase L: Das größte Protein repräsentiert vermutlich die RNA-abhängige RNA-Polymerase (p190) (WALKER *et al.*, 2000). Der Aktivitätszustand der Polymerase wird durch die Virusproteine N, P und X sowie deren Konzentrationsverhältnis bestimmt. Bei einem 10–20fach höheren Anteil von N gegenüber P besitzt die Polymerase die höchste Aktivität (SCHNEIDER *et al.*, 2004). P fungiert als Polymerase-Kofaktor, während X einen hemmenden Einfluss auf die Polymerase-Aktivität hat (POENISCH *et al.*, 2004).

Abbildung 2-2: Modell des BDV



Modifiziert aus: BODE, 1999, nach einer Computersimulation aus dem Magazin: Der Stern

Bei dem BDV handelt es sich um ein behülltes sphärisches Partikel mit einem Durchmesser von 100–130 nm. Das Glykoprotein G ist in Form von 7 nm langen Spikes in die Hüllmembran integriert (KOHNO *et al.*, 1999). Ebenfalls an die Hüllmembran assoziiert ist das Matrixprotein M (KRAUS *et al.*, 2005). Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das helikale Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 4 nm (KOHNO *et al.*, 1999). Das Nukleokapsid besteht aus der viralen RNA, die vom Nukleoprotein N umschlossen wird. An das Nukleokapsid assoziiert sind das Phosphoprotein P und die RNA-abhängige RNA-Polymerase L. Zusammen bilden diese Bestandteile den RNP-Komplex (PEREZ *et al.*, 2003).

P = Phosphoprotein; N = Nukleoprotein; L = Polymerase; M = Matrixprotein; G = Glykoprotein

2.1.3 Allgemeine Erregerseigenschaften

Das BDV besitzt einen Durchmesser von 100–130 nm (KOHNO *et al.*, 1999). Gegenüber Lipidlösungsmitteln ist es aufgrund seiner Hüllmembran empfindlich (DANNER und MAYR, 1979). Das Virus erweist sich als kälteresistent, bei Temperaturen von -70°C bleibt es über mehrere Jahre stabil (DANNER und MAYR, 1979). Warme Temperaturen werden schlechter toleriert. Bei 37°C ist das Virus nach zwei Tagen inaktiv, bei 56°C bereits nach einigen Minuten (DANNER, 1982).

Der Viruseintritt in die Wirtszelle findet durch Rezeptor-vermittelte Endozytose statt. Die Adsorption an die Zelloberfläche wird durch das Glykoprotein vermittelt (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997a, 1998). Das Nukleokapsid, bestehend aus RNA, die vom Nukleoprotein N umschlossen wird, bildet mit den Polypeptiden P, X und L des Polymerasekomplexes den RNP-Komplex (SCHWEMMLE *et al.*, 1998; PEREZ *et al.*, 2003). Der RNP-Komplex stellt gleichzeitig die minimal erforderliche infektiöse Einheit dar und erfüllt wichtige Funktionen wie Transkription und Replikation (GARCIA-SASTRE und PALESE, 1993; CONZELMANN, 1998, 2004).

Das Virus verbreitet sich vermutlich transsynaptisch über direkten Zell-zu-Zell-Kontakt (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995). Die anterograde und retrograde Ausbreitung des BDV konnte am Modell der Ratte demonstriert werden (MORALES *et al.*, 1988).

2.1.4 Persistenz

Die Viruspersistenz ist ein Hauptcharakteristikum der BDV-Infektion. Die Persistenz wird durch die funktionellen Eigenschaften der Virusproteine, durch genomische Besonderheiten sowie durch die nicht-zytopathogenen Eigenschaften des Virus gewährleistet (LUDWIG *et al.*, 1988). Beispielhaft seien folgende Mechanismen genannt, die zur Viruspersistenz beitragen:

X als negativer Regulator der Polymerase wird in frühen Infektionsstadien nicht in den Virusbestandteilen nachgewiesen. Nach Infestation in der Wirtszelle wird X im Nukleus in einem X : P : N-Verhältnis von 1 : 6 : 40 nachgewiesen und hemmt die Polymerase-Aktivität

in diesem Konzentrationsverhältnis zu 30 % (SCHWARDT *et al.*, 2005). Die Replikationsrate wird hierdurch gedrosselt.

Nach mehrfacher Zellpassage steigt der Anteil an RNA-Strängen mit verkürzten Genom-Enden. Diese Heterogenität an den 3' und 5' Enden beeinflusst die Promoter-Aktivität (ROSARIO *et al.*, 2005). Unvollständige ITRs (inverted terminal repeats) sind weniger infektiös und tragen zur nicht-zytolytischen Viruspersistenz bei. Die Kürzung der Genom-Enden um ein bis vier Nukleotide wird aktiv vom BDV gesteuert (SCHNEIDER *et al.*, 2005).

Das Glykoprotein G ist vorwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Die Herunterregulierung von G auf der Wirtszellmembran dient vermutlich der Vermeidung der Erkennung durch das Immunsystem des Wirts (EICKMANN *et al.*, 2005).

Das Nukleoprotein N verlangsamt die Zellteilung der Wirtszelle, indem es mit dem Cdc2-Cyclin-B1-Komplex interagiert und hierdurch eine Prolongation der G2-Phase bewirkt (PLANZ *et al.*, 2003a).

2.1.5 Zelltropismus

Das BDV besitzt einen ausgeprägten Neurotropismus. Es ist für die erfolgreiche Infektion und Ausbreitung an neuronales Gewebe gebunden. Eine Inokulation des Virus in die Fußsohle führte bei neurektomierten Ratten nicht zur Infektion (CARBONE *et al.*, 1987). Innerhalb des ZNS repräsentieren Neuronen die Hauptzielzellen des BDV, in späteren Infektionsstadien kann das Virus auch in Astrozyten, Oligodendrozyten, Schwannzellen und Ependymzellen nachgewiesen werden (NARAYAN *et al.*, 1983b; HERZOG *et al.*, 1984; CARBONE *et al.*, 1989, 1991a; DESCHL *et al.*, 1990; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; STITZ *et al.*, 1998). Ausgehend von Zellen des Peripheren Nervensystems (PNS) und der Retina kann es zur Streuung in Tränen- und Speicheldrüsen, Gesichtshaut-Epithelien sowie den Intestinaltrakt kommen (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995). Bei experimentell infizierten Ratten bestehen Unterschiede im Virustropismus, die vom Immunstatus des Wirts abhängen. Während das Virus bei immunkompetenten, adult infizierten Tieren auf das Nervengewebe beschränkt bleibt, kann es bei immuntoleranten bzw. immunsupprimierten Tieren auch außerhalb des Nervensystems nachgewiesen werden (HERZOG *et al.*, 1984). Für die Beschränkung des

Virus auf das Nervensystem scheinen Antikörper-produzierende B-Lymphozyten verantwortlich zu sein (STITZ *et al.*, 1989).

Im ZNS gelten Neuronen der Hippocampus-Formation als Hauptzielzellen des BDV (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984, 1995; GOSZTONYI *et al.*, 1993; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b). Mehrere Gründe werden hierfür diskutiert. Das BDV repliziert sehr langsam und bevorzugt daher nicht-teilungsfähige Zellen, um ausreichend hohe Virustiter zu erzeugen. Es wird außerdem diskutiert, dass das BDV Regionen mit einer niedrigen NF- κ B-Dichte bevorzugt. Im Hippocampus findet sich beispielsweise weniger aktiviertes NF- κ B als im Cortex (BOURTEELE *et al.*, 2005). NF- κ B gilt als wichtiger Aktivator des unspezifischen Immunsystems. Es ist ein Bestandteil der Interferon-Aktivierungs-Kaskade und verhindert Apoptose (BOURTEELE *et al.*, 2005). Hohe Konzentrationen der PKC $_{\epsilon}$ im limbischen System könnten ebenfalls den Tropismus des BDV beeinflussen, da P vorzugsweise von der PKC $_{\epsilon}$ phosphoryliert wird (THIEDEMANN *et al.*, 1992; SAITO *et al.*, 1993; SCHWEMMLE *et al.*, 1997; JORDAN und LIPKIN, 2001).

In vitro können neben Neuronenzellkulturen verschiedene nicht-neuronale Zellen erfolgreich mit dem BDV infiziert werden (HERZOG und ROTT, 1980; PAULI und LUDWIG, 1985; CARBONE *et al.*, 1993; MIZUTANI *et al.*, 1999; WOLFF *et al.*, 2000). Interessanterweise stellen Oligodendrozyten-Zelllinien sehr gut geeignete und häufig verwendete Zellkulturen in der BDV-Forschung dar (PAULI und LUDWIG, 1985; JORDAN *et al.*, 1999; PLANZ *et al.*, 2001b; IBRAHIM *et al.*, 2002; SAUDER *et al.*, 2004). In BDV-infizierten Oligodendrozyten konnte die antivirale Wirkung von Ribavirin belegt werden (JORDAN *et al.*, 1999).

IBRAHIM *et al.* wiesen in vitro in Oligodendrozyten eine restringierte Replikation des BDV nach, die durch eine niedrige Expressionsrate virusspezifischer Proteine bei vergleichsweise hohen Konzentrationen an viraler RNA gekennzeichnet war. Diese Beobachtungen sprechen für die Potenz des BDV, in Oligodendrozyten latente Infektionen zu erzeugen, zumal nach Klonierung der Oligodendrozyten das Replikationsverhalten des BDV unbeeinflusst blieb bzw. auf die nachfolgenden Zellgenerationen übertragen wurde (2002). CARBONE *et al.* untersuchten Replikation und Expression virusspezifischer Proteine in neuronalen und astrozytären Zellen und konnten bereits demonstrieren, dass der Replikationszyklus des BDV vom verwendeten Zelltyp abhängt (1993). BDV verhält sich in vitro und in vivo nicht-

zytolytisch (HERZOG und ROTT, 1980; LUDWIG *et al.*, 1988; BAUTISTA *et al.*, 1994). Ein Nachweis in Zellkultur ist daher nur über den Antigen-Nachweis möglich (LUDWIG *et al.*, 1993).

2.1.6 Einflüsse des BDV auf die neuronale Plastizität

Der Begriff der neuronalen Plastizität beinhaltet funktionelle und morphologische Anpassungsmechanismen des ZNS, die als Reaktionen auf exogene Noxen stattfinden (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000, 2005). Viren beeinträchtigen die ZNS-Homöostase auf unterschiedliche Weise. Teilweise beruhen die Effekte von Virusinfektionen im ZNS nicht auf einer direkten zytolytischen Schädigung infizierter Zellen und können auch nicht mit gegen das Virus gerichteten Immunreaktionen des Wirts erklärt werden, sondern beruhen ausschließlich auf einer virusinduzierten Störung von spezialisierten Zellfunktionen (OLDSTONE, 1989, 1991; DE LA TORRE und OLDSTONE, 1996). Da das BDV sowohl *in vitro* also auch *in vivo* nicht-zytotoxisch ist, lag es nahe, den Einfluss des BDV auf die neuronale Plastizität zu prüfen. Die Synapsenbildung stellt einen essentiellen Prozess der neuronalen Plastizität dar, da sie zu einer Steigerung der Effizienz der Hirnleistung führt. Veränderungen der Synapsenstrukturen zeigten sich bei neonatal BDV-infizierten Ratten anhand einer verminderten Expression von Synaptophysin und GAP-43. Eine Akkumulation von Synaptophysin in Granulosazellen des Gyrus dentatus und in Axonspheroiden in Corpus callosum und Cortex wurde als Zeichen gestörter axonaler Transportprozesse gewertet, in deren Folge es zum Neuronenuntergang in Cortex und Hippocampus kommt (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000). Auch Störungen im Neurotrophin-Netzwerk tragen zur Pathogenese der BDV-Infektion bei. Neurotrophine wie BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 sind essentielle Faktoren, die das neuronale Wachstum und die Synaptogenese steuern. Tatsächlich zeigte sich eine Störung im Neurotrophin-Netzwerk anhand der Herunterregulierung der mRNA von BDNF, NGF und NT-3 im Hippocampus neonatal BDV-infizierter Ratten (ZOCHER *et al.*, 2000). In einer *in-vitro*-Studie konnte außerdem nachgewiesen werden, dass das BDV die Rezeptor-vermittelte Neurotrophin-Antwort von BDNF hemmt (HANS *et al.*, 2004). VOLMER *et al.* belegten Synapsendysfunktionen durch unzureichende Phosphorylierung synaptischer Substrate (2006).

2.1.7 Immunpathologie

Im Allgemeinen beruhen die Auswirkungen einer Virusinfektion im ZNS auf einem Zusammenspiel von direkten zytolytischen bzw. modulativen Eigenschaften des Erregers und gegen das Virus gerichteten Immunreaktionen des Wirts (*Übersicht bei BILZER und STITZ, 1996*). Bei der klassischen BD spielen immunologische Aspekte eine entscheidende Rolle. Die Erkenntnisse über die immunpathologischen Zusammenhänge bei der BD stammen hauptsächlich aus dem Modell der adult BDV-infizierten Lewis Ratte.

Die Bedeutung des zellulären Immunsystems für die Erkrankung wurde bereits aus der Beobachtung abgeleitet, dass die Krankheitsausprägung direkt mit der Immuneinfiltration des ZNS korreliert (ZWICK, 1939). Die besondere Rolle der Lymphozyten in der Pathogenese der BDV-Infektion wurde erstmals bei splenektomierten Rhesusaffen vermutet. Diese Tiere konnten zwar persistent mit dem Erreger infiziert werden, hatten aber im Vergleich zu normalen Kontrolltieren eine verlängerte Inkubationszeit und einen milderen Krankheitsverlauf (CERVOS-NAVARRO *et al.*, 1981; STITZ *et al.*, 1981). Auch infizierte Ratten, deren Immunsystem experimentell abgeschwächt wurde, zeigten weder klinische Symptome noch infiltrierende Lymphozyten im Gehirn (NARAYAN *et al.*, 1983b; HERZOG *et al.*, 1985; MORALES *et al.*, 1988; STITZ *et al.*, 1989, 1991b; MORIMOTO *et al.*, 1996). Erst durch adoptiven Transfer BDV-spezifischer T-Lymphozyten konnte die typische Symptomatik ausgelöst werden, während eine Übertragung von Serum BDV-infizierter Tiere keine Wirkung zeigte (NARAYAN *et al.*; 1983a,b; RICHT *et al.*, 1989; STITZ *et al.*, 1989; SOBBE *et al.*, 1997). Durch weitere Untersuchungen wurden die am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen näher charakterisiert. Den CD8⁺ T-Lymphozyten wird die größte pathogenetische Bedeutung beigemessen (STITZ *et al.*, 1991a). Sie fungieren im Krankheitsverlauf als zytotoxische Effektorzellen, die für die destruktiven Veränderungen im ZNS-Gewebe verantwortlich sind (BILZER und STITZ, 1994; BILZER *et al.*, 1995; STITZ *et al.*, 1995, 2002). Die Infiltration von CD8⁺ T-Lymphozyten zeigte einen direkten Zusammenhang mit der Schwere des Krankheitsverlaufes (FURRER *et al.*, 2001b). CD4⁺ T-Lymphozyten haben hingegen eine wesentliche Bedeutung bei der Sensibilisierung und spezifischen Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen (NÖSKE *et al.*, 1998).

Das ZNS nimmt als privilegiertes Organ in Bezug auf das Immunsystem eine Sonderstellung ein. Verantwortlich hierfür ist die Blut-Hirn-Schranke. Aktivierte T-Lymphozyten sind jedoch unabhängig von ihrer Antigen-Spezifität in der Lage, die intakte Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (WEKERLE *et al.*, 1987; HICKEY, 1991, 1999). An der Rekrutierung antigenspezifischer T-Zellen in das ZNS-Gewebe sind Adhäsionsmoleküle sowie Chemokine beteiligt (PLANZ *et al.*, 1995; RUBIN *et al.*, 1998). Adhäsionsmoleküle vermitteln allgemein den ersten Kontakt zwischen Immunzellen und Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (RAINE *et al.*, 1990). Im Verlauf der BDV-Infektion konnte eine relevante Aufregulierung des Adhäsionsmoleküls α_4 -Integrin an Lymphozyten belegt werden (PLANZ *et al.*, 1995). Chemokine, die von residenten Mikrogliazellen, Astrozyten und infiltrierenden Makrophagen gebildet werden, signalisieren den Immunzellen den Ort der Entzündungsreaktion (MORIMOTO *et al.*, 1996). Die Bildung freier Radikale erhöht zusätzlich die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und erleichtert hierdurch den Eintritt der Immunzellen (HOOPER *et al.*, 2001).

Ein wesentlicher Aspekt in der Unterhaltung der BDV-Enzephalitis ist die ausgeprägte Expression von Histokompatibilitätsantigenen (MHC-Antigenen) in den entzündlichen Infiltraten. Die MHC-Moleküle sind für die Antigen-Erkennung und die spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten von essentieller Bedeutung. Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen, die die Peptidpräsentation vornehmen. $CD8^+$ T-Zellen sind MHC-I restringiert, d.h. sie erkennen Antigene nur, wenn sie von der Antigen-präsentierenden Zelle zusammen mit dem MHC-I-Molekül präsentiert werden. T-Lymphozyten, die den Oberflächenmarker CD4 tragen und meist eine Helferfunktion haben, erkennen Antigene nur im Zusammenhang mit MHC-II-Molekülen. Klasse-I-Moleküle werden auf Zellen des ZNS-Parenchyms nur minimal exprimiert. Klasse-II-Moleküle finden sich normalerweise gar nicht auf ZNS-residenten Zellen (WONG *et al.*, 1985).

Lichtmikroskopische Befunde bei BDV infizierten Ratten deuten darauf hin, dass im Krankheitsverlauf sowohl Neuronen als auch Astrozyten MHC-I-Moleküle exprimieren (PLANZ *et al.*, 1993; BILZER und STITZ, 1994). In vitro konnten MHC-I-exprimierende Neuronen durch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen lysiert werden (PLANZ *et al.*, 1993). Der

Neuronenverlust kann daher zum Teil mit dieser MHC-I-abhängigen Lyse durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen erklärt werden (BILZER und STITZ, 1994).

Neben den MHC-Molekülen spielen bestimmte Zytokine und deren Rezeptoren eine regulierende Rolle im Zusammenspiel der Lymphozyten und akzessorischen Zellen. In der akuten Krankheitsphase kommt es zu einer Aufregulierung der mRNA proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ (SHANKAR *et al.*, 1992; HATALSKI *et al.*, 1998). Das proinflammatorische Zytokin IL-16 wird ebenfalls vermehrt in Mikroglia BDV-infizierter Lewis Ratten nachgewiesen (GUO *et al.*, 2004). In der chronischen Krankheitsphase ändert sich das Zytokinprofil. Der IL-4 mRNA Level steigt in dieser Phase deutlich an, IL-10 fällt dagegen ab (HATALSKI *et al.*, 1998). Die Änderung des Zytokinprofils kann mit einer Verschiebung von einer TH1-gewichteten zu einer TH2-gewichteten Immunreaktion erklärt werden (HATALSKI *et al.*, 1998). TH1-Zellen definieren T-Helferzellen, die vorwiegend zelluläre Immunprozesse steuern, TH2-Zellen beeinflussen hauptsächlich das humorale Immunsystem, indem sie den B-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in Plasmazellen verhelfen. Tatsächlich ist das Zellbild in der chronischen Infektionsphase gekennzeichnet durch eine Zunahme von Antikörper-produzierenden Plasmazellen (NARAYAN *et al.*, 1983b; STITZ *et al.*, 1995; HATALSKI *et al.*, 1998). Den Plasmazellen hat man zunächst nur eine untergeordnete Rolle in der BD-Pathogenese eingeräumt. Es wird jedoch vermutet, dass Plasmazellen aufgrund ihrer Antikörper-Produktion verantwortlich sind für die Beschränkung des Virus auf neuronales Gewebe. Bei immunsupprimierten Tieren konnte durch Gabe eines BDV-spezifischen Antiserums die generalisierte Ausbreitung des BDV im gesamten Organismus verhindert werden (STITZ *et al.*, 1998).

Trotz ausgeprägter Immunantwort gelingt es nicht, das Virus zu eliminieren. Funktionelle Studien belegen eine verminderte Zytotoxizität der Lymphozyten in der chronischen Infektionsphase (SOBBE *et al.*, 1997). Mögliche Gründe hierfür sind, dass die Lymphozyten im Verlauf der BDV-Infektion anergisch werden oder aufgrund eines Mangels an kostimulatorischen Signalen in einen programmierten Zelltod (Apoptose) geführt werden (KARPUS *et al.*, 1994; KHOURY *et al.*, 1995). Eine Immunisierung mit BDV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen vor der experimentellen Infektion verhinderte bei Ratten die Erkrankung und

führte zur vollständigen Viruselimination. Die CD8⁺ T-Zellen der vakzinierten Tiere besaßen eine wesentlich höhere Zytotoxizität im Vergleich zu den CD8⁺ Zellen nicht vakzinierter Tiere (NÖSKE *et al.*, 1998).

2.1.8 Epidemiologie

Die klassische BD kommt bei den Tierarten Pferd und Schaf als relativ seltene progressive Meningopolioenzephalomyelitis vor, die auf bestimmte endemische Gebiete in Zentraleuropa begrenzt ist (LUDWIG *et al.*, 1985; GRABNER und FISCHER, 1991). Bis heute werden jährlich ca. 100 BD-Fälle pro Jahr bei Pferden und Schafen gezählt (HERZOG *et al.*, 1994; *Übersicht bei* STAEHELI *et al.*, 2000).

Aktuelle epidemiologische Datenerhebungen belegen inzwischen, dass das Wirtsspektrum sowie die geographische Verbreitung des BDV wesentlich umfangreicher sind als anfänglich vermutet.

Zu den für BDV empfänglichen Säugetierpezies gehören beispielsweise Rinder (CAPLAZI *et al.*, 1994; HAGIWARA *et al.*, 1996), Ziegen (CAPLAZI *et al.*, 1999), Kaninchen (METZLER *et al.*, 1978), Hunde (WEISSENBOCK *et al.*, 1998a) sowie Katzen (LUNDGREN *et al.*, 1995; BERG *et al.*, 1998; REEVES *et al.*, 1998). Im Erfurter Zoo wurden BDV-Infektionen bei Primaten, Alpakas sowie einem Flußpferd nachgewiesen (SCHÜPPEL *et al.*, 1994, 1995). Neurologische Ausfallserscheinungen bei einem freilebenden Luchs wurden ebenfalls auf eine BDV-Infektion zurückgeführt (DEGIORGIS *et al.*, 2000). Das Wirtsspektrum umfasst nicht nur Säugetiere, sondern auch Vögel. In einer Straußenfarm in Israel wurde von einer BDV-induzierten Paralyse berichtet (MALKINSON *et al.*, 1995). Das Krankheitsbild der neurogenen Drüsenmagendilatation bei Psittaziden (Proventricular dilatation disease, PDD) wurde kürzlich ebenfalls mit einer neuen BDV-Variante in Verbindung gebracht (HONKAVUORI *et al.*, 2008). Als latente Virusträger gelten Füchse (DAUPHIN *et al.*, 2001) sowie Wildvögel (BERG *et al.*, 2001).

Die experimentelle Infektion ist für fast alle Tierarten möglich, einschließlich Primaten (STITZ *et al.*, 1981; LUDWIG *et al.*, 1988; ROTT und BECHT, 1995).

Die ursprüngliche Region, in der das BDV endemisch vorkommt, umfasst Gebiete in Sachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Hessen, Baden-Württemberg und Bayern, sowie das

obere Rheintal zwischen Schweiz, Österreich und dem Fürstentum Liechtenstein (ROTT und BECHT, 1995; RICHT *et al.*, 1997; WEISSENBÖCK *et al.*, 1998b; CAPLAZI *et al.*, 1999). Die geographische Verbreitung des BDV wurde inzwischen auf Nordeuropa (BERG *et al.*, 1999), USA (KAO *et al.*, 1993), Frankreich (GALABRU *et al.*, 2000), Japan (NAKAMURA *et al.*, 1995; HAGIWARA *et al.*, 1997), China (HAGIWARA *et al.*, 2001), Iran (BAHMANI *et al.*, 1996), Israel (HERZOG *et al.*, 1994; RICHT *et al.*, 1994) und die Türkei (HELPS *et al.*, 2001; YILMAZ *et al.*, 2002) ausgeweitet. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es sich in den meisten Fällen um Prävalenzstudien handelt, die lediglich das Vorkommen des BDV belegen. Es ist nicht auszuschließen, dass die Erweiterungen lediglich das Ergebnis verbesserter Diagnostik sowie des gesteigerten Interesses an BD sind. Klinische Ausbrüche der BD wurden seltener außerhalb der Endemiegebiete beschrieben. Es existieren jedoch Berichte über Erkrankungen bei Pferden in Japan (HAGIWARA *et al.*, 2000; TANIYAMA *et al.*, 2001; WEISSENBÖCK *et al.*, 2002) und Schweden (BERG *et al.*, 1999), bei domestizierten Katzen in Japan (NAKAMURA *et al.*, 1999) sowie bei einem Hund in Japan (OKAMOTO *et al.*, 2002).

Übertragungswege und Reservoir sind nicht genau bekannt. Am wahrscheinlichsten ist die Ansteckung über die olfaktorische Route. Die Ausbreitung des BDV über olfaktorische Neurone ins limbische System ist am Beispiel der Ratte demonstriert worden (CARBONE *et al.*, 1987; MORALES *et al.*, 1988). Eine experimentelle transnasale Infektion ist bei Ratten möglich (CARBONE *et al.*, 1987; SAUDER und STAEHELI, 2003). Die infizierten Ratten scheiden das Virus lebenslänglich über Urin, Speichel und Kot aus und können naive Ratten über direkten Kontakt anstecken (NITZSCHKE, 1963; HERZOG *et al.*, 1984; MORALES *et al.*, 1988; SIERRA-HONIGMANN *et al.*, 1993; SAUDER und STAEHELI, 2003). Natürlich erkrankte Pferde zeigen typischerweise Entzündungszeichen und Ödeme im Bulbus olfactorius (JOEST und SEMMLER, 1911; LUDWIG *et al.*, 1988). Mittels PCR konnte sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Pferden das Virus im Nasensekret nachgewiesen werden (RICHT *et al.*, 1993). HAGA *et al.* gelang der Nachweis von BDV-RNA im Bulbus eines nicht erkrankten Menschen, ein weiterer Hinweis darauf, dass das BDV über das olfaktorische System eindringen kann (1997). Der Nachweis von BDV-RNA in peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC's) lässt auch eine hämatogene Übertragung vermuten (SIERRA-HONIGMANN *et al.*, 1993; RUBIN *et al.*,

1995). Die intravenöse Verabreichung einer BDV-haltigen Virussuspension führte jedoch bei Ratten nicht zur Infektion (CARBONE *et al.*, 1987). Da die Erkrankung eine saisonale Dynamik zeigt mit Häufung von klinischen Ausbrüchen im Frühling und Frühsommer, ist auch eine Übertragung über Vektoren denkbar (ROTT und BECHT, 1995). Diese These ist jedoch bislang nicht belegt. Die vertikale Übertragung wurde bei einer Stute und deren Fohlen in einem Fallbericht beschrieben (HAGIWARA *et al.*, 2000).

Als Erregerreservoir kommen Nager in Frage, da Ratten nach experimenteller intranasaler Infektion lebenslänglich Virus über Speichel, Urin und Kot ausscheiden (SIERRA-HONIGMANN *et al.*, 1993). Zunächst konnte eine Studie über die Prävalenz von BDV bei wildlebenden Nagern diese Hypothese nicht bestätigen (TSUJIMURA *et al.*, 1999). In einer neueren Untersuchung wiesen HILBE *et al.* das Virus in Gehirnproben von drei Spitzmäusen aus einer endemischen Region in der Schweiz nach. Das gefundene Isolat zeigte eine hohe genetische Übereinstimmung mit Virusisolat aus erkrankten Pferden aus dieser Region (2006). Aufgrund des Nachweises von BDV in Vogelkot werden auch Vögel als latente Virusträger diskutiert (BERG *et al.*, 2001). Eine Ansteckung empfänglicher Tiere oder Menschen über infizierte Pferde oder Schafe ist bisher unklar. Eine Vergleichsstudie aus Japan untersucht diesen Zusammenhang und belegt bei Menschen, die in der Nähe von Pferdefarmen leben, eine höhere Prävalenz an BDV-Antikörpern als bei Menschen, die in städtischen Gebieten leben (TAKAHASHI *et al.*, 1997).

Obwohl es seit mehr als 20 Jahren Hinweise für BDV-Infektionen beim Menschen gibt, wird der zoonotische Aspekt der Erkrankung nach wie vor kontrovers diskutiert (**Kapitel 2.2.2**).

2.2 Klinik und Neuropathologie

2.2.1 Natürliche Infektionen beim Tier

Die BD ist eine seit mehr als drei Jahrhunderten bekannte neurologische Erkrankung, die natürlicherweise hauptsächlich bei Pferden und Schafen auftritt (LUDWIG *et al.*, 1985; GRABNER und FISCHER, 1991).

Pferd: Klinische Beschreibungen der durch das BDV ausgelösten Erkrankung beim Pferd reichen bis in das Jahr 1660 zurück (GALIBERTI). 1767 beschrieb VON SIND in seinem

Buch die Symptome einer als „Kopfkrankheit“ bezeichneten Erkrankung von Pferden: „Das Pferd ist anfänglich traurig und versaget sein Futter; es läßt den Kopf und die Ohren hängen, hat Hitze und Schleim im Maul, trübe und wässrige Augen; wanket im Gehen hin und her, als ob es schwindlig wäre; [...] drückt den Kopf gegen die Mauer, [...] endlich fällt es in convulsive Bewegungen, woran es meistens das Leben lasset.“ 1823 berichtet AUTENRIETH von einer „hitzigen Kopfkrankheit“, an der zwei Drittel des Pferdebestandes auf der Schwäbischen Alb verendet sind. WÖRZ bezeichnet die Krankheit 1858 als „halb-acute Gehirn-Entzündung oder Kopfkrankheit der Pferde“. Das seuchenhafte Auftreten der Erkrankung bei Kavalleriepferden 1895 in der Stadt Borna führte schließlich zur Namensgebung (*Übersicht bei* DÜRRWALD und LUDWIG, 1997). Bereits 1886 wurde die Krankheit im Königreich Sachsen als wichtige Viehseuche angesehen und anzeigepflichtig. Seit 1989 unterliegt die Ansteckende Gehirn-Rückenmarksentzündung der Einhufer (Bornasche Krankheit) bundesweit der Meldepflicht (*Übersicht bei* DIECKHÖFER *et al.*, 2004). Man muss heute jedoch davon ausgehen, dass es eine hohe Durchseuchungsrate in der Pferdepopulation gibt bei nur seltenen Krankheitsausbrüchen. Daher bedarf die Einstufung der Erkrankung als meldepflichtige Tierseuche laut DIECKHÖFER *et al.* einer kritischen Neubewertung (2004).

Insgesamt beträgt die BDV-Seroprävalenz bei Pferden in Deutschland durchschnittlich 11,5 %, in Endemiegebieten bis zu 20 % (HERZOG *et al.*, 1994). Mithilfe eines Triple-Enzymimmunoassays, der die Untersuchung auf Antigene, Antikörper sowie zirkulierende Immunkomplexe einschließt, ermittelten DIECKHÖFER *et al.* sogar eine Prävalenz von 60 % (2004).

Die Erkrankung tritt nur noch sehr selten in ihrer klassischen Form akut auf, es werden jährlich weniger als 100 Fälle gemeldet (HERZOG *et al.*, 1994; *Übersicht bei* STAEHELI *et al.*, 2000). Nach einer Inkubationszeit von mindestens vier Wochen beginnt die Krankheit mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Inappetenz und Kolik. Im weiteren Verlauf treten neurologische Symptome auf. Typisch sind Bewußtseinsstörungen (Depression), Störungen der Propriozeption (Verharren in unphysiologischen Positionen wie Überkreuzen der Gliedmaßen), Ataxie, plötzliches Zusammenbrechen, Kreisbewegungen, Drängen gegen Hindernisse und Visusverlust aufgrund einer Retinitis des N. opticus. Im Endstadium treten

teilweise Konvulsionen und Paralysen auf. Die Krankheitsdauer beträgt ein bis drei Wochen, die Mortalitätsrate wird mit 80–100 % angegeben (*Übersicht bei* ROTT und BECHT, 1995). Viel häufiger scheinen jedoch latente bzw. subklinische Verläufe vorzukommen, die sich als Verhaltensstörungen oder milde Bewegungsstörungen der Hinterhand manifestieren können (BODE und LUDWIG, 1997).

Das histologische Bild der klassischen BD beim Pferd ist gekennzeichnet durch eine nichteitrige Meningopolioenzephalomyelitis mit perivaskulären Infiltraten aus Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen und Plasmazellen (JOEST und DEGEN, 1911; GOSZTONYI und LUDWIG, 1984; BILZER *et al.*, 1995, 1996; CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). In den perivaskulären Infiltraten finden sich überwiegend CD4⁺ Zellen, während im Gewebe überwiegend CD8⁺ Zellen anzutreffen sind (BILZER *et al.*, 1995, 1996). Der Anteil an Plasmazellen ist vergleichsweise niedrig (CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). Die inflammatorischen Kennzeichen beim Pferd entsprechen den histologischen Befunden in der akuten und subakuten Phase adult infizierter Ratten (STITZ *et al.*, 1993; CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). Die höchsten Viruskonzentrationen befinden sich in Bulbus olfactorius, Großhirncortex, Nucleus caudatus, Hippocampus und der Retina (BILZER *et al.*, 1996; LEBELT und HAGENAU, 1996). In Neuronen, seltener in Gliazellen, finden sich azidophile intranukleäre Einschlusskörperchen, die akkumulierten Virusproteinen entsprechen (CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). Diese Foki wurden schon vor dem Bekanntwerden der Virusätiologie beschrieben und nach ihren Entdeckern als Joest-Degen-Einschlusskörperchen benannt (JOEST und DEGEN, 1909; ROTT und BECHT, 1995). Anzeichen von Neurodegeneration sind insgesamt selten und finden sich vorwiegend im Hippocampus (CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). In der Retina führen Degenerationen zum Verlust von Neuronen (WALTHER, 1952). Im ZNS-Parenchym besteht eine begleitende reaktive Astroglieose (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998) und Mikroglieose (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; BILZER *et al.*, 1996). Virus-Antigen findet sich in Neuronen intranukleär, intrazytoplasmatisch sowie in den Axonen und Dendriten. Auch Astrozyten und Oligodendrozyten enthalten Virus-Antigen (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995).

Schaf: Erste Beschreibungen der BD bei Schafen stammen aus dem Jahr 1899 aus der Region um die Stadt Borna (WALTHER, 1899). Auch beim Schaf treten häufig klinisch inapparente BDV-Infektionen auf (HAGIWARA *et al.*, 1997; VAHLENKAMP *et al.*, 2002). Die Sero-Prävalenzrate in Schafherden beträgt bis zu 90,9 % (HAGIWARA *et al.*, 1997). Akut an BD erkrankte Tiere entwickeln Symptome, die denen beim Pferd ähneln, jedoch meist weniger ausgeprägt sind (HIEPE, 1958; LUDWIG *et al.*, 1988; BODE *et al.*, 1994; ROTT und BECHT, 1995; CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). Die Mortalitätsrate in der akuten Krankheitsphase beträgt 50 % (ROTT und BECHT, 1995). Überlebende Tiere können zeitlebens neurologische Symptome zurückbehalten. Einige Tiere erholen sich komplett (METZLER *et al.*, 1979). Auch rezidivierende Verläufe werden beschrieben (HEINIG, 1969). Die histologischen Befunde akut an BD erkrankter Schafe entsprechen im Wesentlichen den beim Pferd beschriebenen Befunden (BECK, 1925; BECK und FROHBÖSE, 1926; CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998). Histologische Anzeichen von Neurodegeneration fanden sich bei der Untersuchung von zwölf Schafen im Gegensatz zu den untersuchten Pferden jedoch nicht (CAPLAZI und EHRENSPERGER, 1998).

Katze: BDV wird als Verursacher der als Staggering Disease (SD) bezeichneten Erkrankung der Katze diskutiert. Sowohl eine höhere Seroprävalenz gegenüber klinisch gesunden Katzen als auch der Nachweis von BDV-Antigenen im Gehirn der an SD erkrankten Katzen bekräftigen diese Vermutung. Das Krankheitsbild der SD ist gekennzeichnet durch eine nichteitrigue Meningoenzephalomyelitis mit Ataxie und Verhaltensstörungen (KRONEVI *et al.*, 1974; LUNDGREN, 1992; LUNDGREN *et al.*, 1993; REEVES *et al.*, 1998). Gegenüber gesunden Katzen wurde bei Katzen mit Ataxie eine signifikant höhere Seroprävalenz (46,2 %) auf zirkulierende AK gegen die Bornaproteine p10 und p24 mittels Westernblot ermittelt. Innerhalb der gesunden Kontrollgruppe ergab sich eine Prävalenzrate von 23,7 %. Insgesamt wurden in der Studie 52 Katzen mit Ataxie und 152 gesunde Katzen getestet (OUCHI *et al.*, 2001).

Bei einer Studie an 15 neurologisch erkrankten Katzen in Japan wurde ebenfalls eine hohe BDV-Prävalenzrate ermittelt. Von den 15 Katzen wurde eine Katze histopathologisch untersucht. Interessanterweise ergab die Untersuchung bei dieser Katze eine ausgeprägte

disseminierte Demyelinisierung im Rückenmark, begleitet von einer schweren axonalen Degeneration. In Medulla oblongata und Pons cerebri wurden ebenfalls Demyelinisierung und Axondegeneration nachgewiesen. Mittels in-situ-Hybridisierung wurde p40-RNA in Bulbus olfactorius, Medulla cerebri, Medulla oblongata und Kleinhirn detektiert (NAKAMURA *et al.*, 1999b).

Hund: Beim Hund existieren zwei gut dokumentierte Fallberichte, die eine BDV-Infektion bei dieser Tierart belegen.

Der erste Fallbericht stammt aus einem endemischen Gebiet in Österreich und wurde in einer retrospektiven Studie aufgearbeitet. Es handelte sich um einen zwei Jahre alten Husky, der aufgrund einer akuten ZNS-Symptomatik euthanasiert wurde. Histopathologisch zeigte sich eine nichteitrigte Meningoenzephalitis mit neuronalen Nekrosen in Neocortex, Allocortex und Hippocampus. Daneben bestand eine fokale Gliose. Die immunhistochemische Untersuchung auf p38/p40 verlief positiv. Das Verteilungsmuster des Virusproteins ähnelte den Befunden bei natürlich erkrankten Pferden, wonach sich die höchsten Virusprotein-Konzentrationen in der Nähe von Immunezellinfiltraten fanden. Es waren Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten infiziert. Der mittels Nested-PCR isolierte BDV-Strang ähnelte den BDV-Strängen, die bei Pferden in dieser Region gefunden wurden (WEISSENBÖCK *et al.*, 1998a).

Bei einem Welsh Corgi in Japan ist ebenfalls eine BDV-induzierte Enzephalomyelitis diagnostiziert worden. Sowohl immunhistochemisch als auch mittels PCR ist das BDV in Rückenmark und Gehirn nachgewiesen worden. Der Hund litt an einer schweren akuten ZNS-Symptomatik mit tödlichem Verlauf. Histologisch fand man eine nichteitrigte Enzephalomyelitis mit großen perivaskulären Infiltraten bestehend aus Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen, begleitet von einer fokalen Gliose (OKAMOTO *et al.*, 2002).

2.2.2 BDV-Infektion beim Menschen

BDV wird beim Menschen im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen diskutiert. In der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen spielen sowohl genetische als auch exogene Faktoren, zu denen auch psychotrope Viren gehören, eine Rolle (YOLKEN und TORREY,

1995; LIPKIN und HORNIG, 2004). Die Entdeckung solcher persistenter Virusinfektionen im ZNS, die klinisch hauptsächlich mit Verhaltensstörungen einhergehen, setzte umfangreiche Forschungstätigkeiten in Gang, die eine Assoziation von Virusinfektionen zu neuropsychiatrischen Krankheitsbildern unbekannter Genese herstellen sollten (KRISTENSSON und NORRBY, 1986; MOHAMMED *et al.*, 1993; LIPKIN und HORNIG, 2004).

Das BDV kommt aus mehreren Gründen als psychotropes Virus in Frage: Das Wirtsspektrum des Virus ist breit. Es besitzt eine Präferenz für Neuronen des limbischen Systems (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984, 1995; GOSZTONYI *et al.*, 1993; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b). Über einen nicht-zytotoxischen Mechanismus verursacht das Virus eine Verhaltensmodulation mit Beeinträchtigung höherer Hirnfunktionen wie Lernen und Gedächtnis. Dies ist am Beispiel der experimentellen Infektion neugeborener Ratten demonstriert worden (HIRANO *et al.*, 1983; NARAYAN *et al.*, 1983a; DITTRICH *et al.*, 1989). Das klinische Bild weist zudem Parallelen zu bestimmten neuropsychiatrischen Erkrankungen des Menschen wie Schizophrenie, depressiven Erkrankungen und Autismus auf (DITTRICH *et al.*, 1989; PLETNIKOV *et al.*, 1999b; RUBIN *et al.*, 1999a; HORNIG *et al.*, 2001).

Erste Untersuchungen zur BDV-Seroprävalenz beim Menschen stammen aus dem Jahr 1985 und belegen signifikant erhöhte Antikörper-Titer bei Menschen mit psychiatrischen Erkrankungen (AMSTERDAM *et al.*, 1985; ROTT *et al.*, 1985). Der erste Nachweis von BDV-RNA in PBMC's bei hospitalisierten psychiatrischen Patienten stammt von BODE *et al.* (1994). DE LA TORRE *et al.* wiesen BDV-Antigen und RNA in Gehirnen von neuropsychiatrisch erkrankten Menschen nach (1996). Eine systematische Übersicht über 44 Prävalenzstudien und fünf Fallberichte bis Januar 2000 findet sich bei CHALMERS *et al.* (2005). BDV-Prävalenzen wurden anhand von AK-Bestimmungen mit IFT, ELISA, Westernblot, ECLIA in Serum und/oder Liquor ermittelt. Ein Nukleinsäure-Nachweis erfolgte mit RT-PCR, PCR oder in-situ-Hybridisierung an Autopsie-Material oder im Blut. Eine Schwierigkeit stellt die Vergleichbarkeit der Studien dar. Die Studien differieren hinsichtlich der verwendeten Nachweismethoden sowie hinsichtlich der Auswahl der Patientengruppen. Es sind definierte standardisierte Testbedingungen erforderlich, um die Reproduzierbarkeit

und die Aussagekraft der Studien zu erhöhen (CHALMERS *et al.*, 2005). In gesunden Kontrollgruppen sind ebenfalls Seroprävalenzen gefunden worden (*Übersicht bei SCHWEMMLE et al.*, 1999a). Die Antikörper binden nur mit einer niedrigen Avidität an BDV-Antigene, ein typisches Kennzeichen kreuzreagierender Antikörper (ALLMANG *et al.*, 2001). Mit Hilfe eines Peptide-Arrays konnte jedoch die Spezifität der Antikörper belegt werden (BILLICH *et al.*, 2002). Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen psychiatrischen Erkrankungen und BDV gilt daher zum jetzigen Zeitpunkt als nicht gesichert (STAEHELI *et al.*, 2001; CHALMERS *et al.*, 2005).

Möglicherweise spielt BDV als Komorbiditäts-Faktor bei verschiedenen zentralnervösen Erkrankungen des Menschen eine Rolle. Bei SSPE-Patienten konnte beispielsweise eine BDV-Seroprävalenz von 22,4 % ermittelt werden. Ein ätiologischer Zusammenhang ist daher unwahrscheinlich. Auffällig war jedoch, dass schwere fulminante Verläufe der SSPE häufig mit hohen BDV-Titern korrelierten (GÜNGÖR *et al.*, 2005).

2.2.3 Modell der neonatal infizierten Ratte

Grundsätzlich sind die Auswirkungen der BDV-Infektion abhängig vom Infektionszeitpunkt und Immunstatus (LUDWIG *et al.*, 1985, 1988; ROTT und BECHT, 1995; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b; HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). Bei der neonatal infizierten Ratte treten aufgrund der Immuntoleranz gegenüber dem Virus immunpathologische Entzündungsreaktionen in den Hintergrund (HIRANO *et al.*, 1983). Das Krankheitsbild bei neonatal infizierten Ratten entspricht daher nicht dem typischen Krankheitsbild bei der klassischen BD bzw. bei adult infizierten Ratten. Trotzdem etabliert sich eine persistierende Virusinfektion mit Störungen des Verhaltens, der emotionalen und kognitiven Funktionen sowie der physiologischen und neurologischen Entwicklung (MORALES *et al.*, 1988; RUBIN *et al.*, 1999b; PLETNIKOV *et al.*, 1999a, 1999b, 2002a). Die Symptomatik kann dabei sowohl auf direkten schädigenden Einflüssen durch das Virus beruhen, als auch auf indirekten Wirkungen, beispielsweise durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Dieses experimentelle Modell wird daher genutzt, um direkte Viruseinflüsse auf die Funktion der Wirtszelle *in vivo* zu erforschen (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2005). Aufgrund der Manifestation von Verhaltensauffälligkeiten, Lerndefiziten und Hirnentwicklungsstörungen dient die neonatal infizierte Lewis Ratte außerdem als

experimentelles Modell für neuropsychiatrische Krankheiten des Menschen wie Autismus (PLETNIKOV *et al.*, 1999b; HORNIG *et al.*, 2001) und Schizophrenie (DITTRICH *et al.*, 1989; RUBIN *et al.*, 1999a). Lewis Ratten werden aufgrund ihrer besonders hohen Suszeptibilität gegenüber dem BDV bevorzugt eingesetzt (NITZSCHKE, 1963; NARAYAN *et al.*, 1983a, 1983b; HERZOG *et al.*, 1984, 1991).

Klinisch dominieren Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität auf exogene Reize (BAUTISTA *et al.*, 1994; HORNIG *et al.*, 1999), Lerndefizite und Gedächtnisstörungen (DITTRICH *et al.*, 1989; RUBIN *et al.*, 1999a) sowie Störungen des Sozial- und Spielverhaltens (PLETNIKOV *et al.*, 1999b).

Die infizierten Tiere zeigen ein retardiertes Körperwachstum im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Die genaue Ursache für die Wachstumsverzögerung ist noch unklar. Vergleichende Messungen von Glukose, Wachstumshormon (STH) und Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) ergaben keine signifikanten Unterschiede zu gesunden Kontrolltieren (BAUTISTA *et al.*, 1994).

Nach intrazerebraler oder intranasaler Infektion kommt es zu einer persistierenden ZNS-Infektion. Das BDV induziert eine selektive Neuronendegeneration in Hippocampus und Gyrus dentatus sowie eine deutliche Kleinhirnhypoplasie mit Verlust von Purkinjezellen (NARAYAN *et al.*, 1983a,b; MORALES *et al.*, 1988; CARBONE *et al.*, 1991a; BAUTISTA *et al.*, 1995; EISENMAN *et al.*, 1999; HORNIG *et al.*, 1999; RUBIN *et al.*, 1999a,b; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000). Degenerationen der Neuronen im Gyrus dentatus des Hippocampus sind verantwortlich für Lerndefizite und Gedächtnisstörungen (HORNIG *et al.*, 1999; RUBIN *et al.*, 1999a; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000; ZOCHER *et al.*, 2000). Eine vorübergehende entzündliche Infiltration wird vier bis fünf Wochen p.i. hauptsächlich im Cortex beschrieben (HORNIG *et al.*, 1999). Astrozytose und Mikrogliose sind weitere Kennzeichen in späteren Krankheitsstadien (CARBONE *et al.*, 1989, SAUDER und DE LA TORRE, 1999; WEISSENBÖCK *et al.*, 2000; SOLLMANN, 2007). Die aktivierten Gliazellen exprimieren in hohem Ausmaß proinflammatorische Zytokine, die zur Zerstörung der Hirnsubstanz beitragen (HORNIG *et al.*, 1999; PLATA-SALAMAN *et al.*, 1999; SAUDER und DE LA TORRE, 1999; WEISSENBÖCK *et al.*, 2000; ZOCHER *et al.*, 2000).

2.2.4 Modell der adult infizierten Ratte

Die experimentelle Infektion adulter Lewis Ratten ist das am besten charakterisierte Modell der BD. Innerhalb der Rattenstämme weisen Lewis Ratten die höchste Empfänglichkeit gegenüber dem BDV auf (NITZSCHKE, 1963; NARAYAN *et al.*, 1983a,b; HERZOG *et al.*, 1984, 1991). Für die unterschiedliche Suszeptibilität werden genetische Einflüsse diskutiert. Lewis Ratten sind beispielsweise auch gegenüber weiteren immunologischen Erkrankungen wie die experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE) prädisponiert (STERNBERG *et al.*, 1990; CIZZA und STERNBERG, 1994). Adult infizierte Lewis Ratten entwickeln eine ähnliche klinische Symptomatik wie natürlich infizierte Tiere. Auch aus immunologischer Sicht ist die Erkrankung vergleichbar mit der natürlich auftretenden BD, sodass das Modell der adult infizierten Ratte geeignet ist, die T-Zell-medierte Pathogenese der BDV-Infektion zu erforschen (BILZER *et al.*, 1995).

Die Inkubationszeit beträgt 17 bis 90 Tage, abhängig von der Eintrittsstelle des Virus (CARBONE *et al.*, 1987). Der Infektionsverlauf ist biphasisch (NARAYAN *et al.*, 1983b). Die akute Phase ist gekennzeichnet durch Hyperaktivität, Aggression und Ataxie (NARAYAN *et al.*, 1983b; CARBONE *et al.*, 1987). Die Symptome beginnen zeitgleich mit Befall der Neuronen im limbischen System und mit der Infiltrierung des ZNS mit Immunzellen (CARBONE *et al.*, 1987; RICHT *et al.*, 1989; STITZ *et al.*, 1991a). Die akute Phase dauert ca. ein bis drei Wochen an. Mit Eintritt in die chronische Phase kommt es zu einer zunehmenden Lethargie und häufig Blindheit (NARAYAN *et al.*, 1983b; CARBONE *et al.*, 1987). Diese Symptome bestehen lebenslänglich. Die Mortalität liegt bei 80 % (CARBONE *et al.*, 1987).

In Abhängigkeit vom verwendeten Rattenstamm und der eingesetzten Viruspräparation entwickeln einige adult infizierte Ratten nach Überstehen der akuten Enzephalitis eine Obesitas, deren genaue Entstehungsmechanismen noch nicht bekannt sind (NARAYAN *et al.*, 1983a; KAO, 1985; GOSZTONYI *et al.*, 1991; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; ROTT und BECHT, 1995; HERDEN *et al.*, 2000). Vermutet wird eine Störung des endokrinen Systems, die mit einer lymphomonozytären Infiltration des Thalamus, Hyperplasie der Langerhansschen Inselzellen im Pankreas sowie erhöhten Blutfett- und Glukosewerten einhergeht (GOSZTONYI *et al.*, 1991; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995).

Histopathologische Hauptmerkmale der akuten Phase sind eine nichteitrige Meningoenzephalitis bei hohen Virustitern. Die immunzytochemische Differenzierung der Lymphozyten-Subpopulationen ergibt ein Überwiegen der CD4⁺ T-Zellen, der sogenannten T-Helfer-Zellen, in den peripheren Infiltraten, während CD8⁺ T-Zellen, sogenannte zytotoxische T-Zellen, überwiegend im Nervenparenchym anzutreffen sind (PLANZ *et al.*, 1993; BILZER und STITZ, 1994). Makrophagen repräsentieren 20–30 % der perivaskulären Zellen (DESCHL *et al.*, 1990). Gleichzeitig kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA-Expression von IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ (SHANKAR *et al.*, 1992; HATALSKI *et al.*, 1998). In der chronischen Infektionsphase geht die Entzündungsreaktion allmählich zurück bei gleichbleibend hohen Viruskonzentrationen und bestehender Astroglieose (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b). Teils werden auch bei adult infizierten Ratten neuronale Nekrosen in frontalem und parietalem Cortex, der CA3-Region oder im Gyrus dentatus des Ammonshorns beschrieben (DESCHL *et al.*, 1990; HERDEN *et al.*, 2000).

2.2.5 Maus-Modell

Mäuse galten lange Zeit als nicht empfänglich für eine Infektion mit dem BDV. Adult infizierte Mäuse entwickelten keine klinischen Symptome und keine Enzephalitis (KAO *et al.*, 1984; RUBIN *et al.*, 1993). Erst durch Verwendung einer mausadaptierten Viruspräparation konnten auch bei Mäusen Erkrankungen ausgelöst werden, allerdings nur nach neonataler Infektion (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998). Bei der experimentellen Infektion der Maus mit dem BDV ist die klinische Erkrankung sehr stark mit dem MHC-I-Haplotyp assoziiert. Mäuse vom Stamm MRL mit dem Haplotyp H-2^k zeichnen sich durch eine hohe Suszeptibilität gegenüber dem BDV aus, während C57BL/10-Mäuse mit dem Haplotyp H-2^b nach experimenteller Infektion mit dem BDV trotz massiver Virusreplikation nicht erkranken. Trotzdem ist dieses Kriterium alleine nicht hinreichend. B10.BR-Mäuse beispielsweise tragen zwar das H-2^k-Allel, erkranken aber im Gegensatz zur MRL-Maus nicht akut an der BD (HAUSMANN *et al.*, 1999). Dieser Unterschied wird mit einer immunologischen Toleranz gegenüber dem BDV erklärt. Nach Superinfektion mit N-exprimierenden Vacciniaviren entwickeln auch diese Mäuse eine fulminante Meningoenzephalitis (HAUSMANN *et al.*, 1999). Das BDV repliziert in Neuronen, maximale Titer werden drei bis vier Wochen p.i.

erreicht. Das Auftreten perivaskulärer Infiltrate korreliert mit dem Auftreten der klinischen Symptome (HALLENSLEBEN *et al.*, 1998).

Die Verwendung transgener Mauslinien bietet entscheidende Vorteile in der Grundlagenforschung von ZNS-Erkrankungen. Als Modell zur Erforschung neuropsychiatrischer Erkrankungen des Menschen wie Schizophrenie und Autismus hat man BDV-p24-exprimierende transgene Mäuse entwickelt. Der Vorteil der Verwendung solcher transgener Mauslinien ist die isolierte Erforschung von Mechanismen, die von einzelnen Virusproteinen gesteuert werden. In diesem Modell finden sich keine wesentlichen histopathologischen Veränderungen im ZNS-Gewebe wie bei experimentell infizierten Mäusen, d.h. es findet sich keine Enzephalitis oder Astrozytose. Trotzdem werden subtile Verhaltensstörungen beobachtet als Zeichen einer Reaktion auf Neurotransmitterbasis. Funktionelle Interaktionen werden gestört. Dieses neuropathologische Korrelat entspricht noch viel eher den Veränderungen, die beim Menschen in den Erkrankungen gefunden werden (KAMITANI *et al.*, 2003).

2.2.6 Gerbil-Modell

Wirtsspezifische Unterschiede der BDV-Infektion sind am eindrucksvollsten beschrieben im Vergleich zwischen der Infektion von Ratte und Gerbil (LEE *et al.*, 2003). Gerbile zeichnen sich durch eine hohe Empfänglichkeit gegenüber dem BDV aus (NAKAMURA *et al.*, 1999a). Sie zeigen nach BDV-Infektion schwerwiegende neurologische Symptome bei einer hohen Mortalitätsrate (WATANABE *et al.*, 2001, 2003). Im Gehirn dominieren hohe BDV-Titer ohne Anzeichen einer Meningoenzephalitis oder Neurodegeneration. Es findet sich keine Astrozytose. Hohe Expressionen von IL-1 β deuten auf eine durch dieses Zytokin induzierte neuronale Funktionsstörung hin (WATANABE *et al.*, 2003).

2.3 Oligodendrozyten und Myelinisierung

2.3.1 Oligodendrozyten

Die Hauptaufgabe der Oligodendrozyten ist die Myelinbildung (**Kapitel 2.3.2**).

Oligodendrozyten erfüllen jedoch neben der Myelinisierung weitere Funktionen im ZNS. Sie haben Einfluss auf die axonale Integrität und Stabilität und partizipieren am neuronalen

Transmitternetzwerk (BERGLES *et al.*, 2000; BAUMANN und PHAM-DINH, 2001). Ein Negativ-Effekt von myelinbildenden Oligodendrozyten ist jedoch, dass sie ein Aussprossen von Axonen und hierdurch die Regeneration nach Insult im ZNS verhindern (DAVID und AGUAYO, 1981; CARONI und SCHWAB, 1988a,b).

Oligodendrozyten und Schwannzellen beeinflussen durch Phosphorylierung der intraaxonalen Neurofilamente den Axondurchmesser und sind daher maßgeblich an einer effizienten Erregungsleitung beteiligt. Neurofilamente sind wesentliche struktur- und stabilitäts-erhaltende zytoskelettale Bestandteile großkalibriger Axone. Es existieren drei Untergruppen der Neurofilamente, die lange Seitenarme ausbilden und unterschiedlich stark phosphoryliert sind. Erste Untersuchungen bei Trembler-Mäusen, die aufgrund eines genetischen Defekts kein peripheres Myelinprotein PMP22 exprimieren (SUTER *et al.*, 1992), ließen einen Zusammenhang zwischen Myelinisierungsgrad und Phosphorylierungsgrad der Neurofilamente erkennen. Bei der Betrachtung der demyelinisierten Axone von Trembler-Mäusen fiel eine dichtere Packung der Neurofilamente, eine Verminderung des Axonkalibers sowie eine Reduktion der Neurofilament-Phosphorylierung auf (DE WAEGH *et al.*, 1992; KIRKPATRICK und BRADY, 1994). In normalen myelinisierten Axonen fiel weiterhin auf, dass der Grad der Phosphorylierung der Neurofilamente in den myelinisierten Bereichen (Internodien) gegenüber den nicht-myelinisierten Abschnitten (Initialsegment, Ranvier'sche Schnürringe) erhöht ist (HSIEH *et al.*, 1994). DE WAEGH *et al.* betrachten die Neurofilament-Phosphorylierung als Hauptregulator des Axonkalibers. Die Korrelation des Axonkalibers mit dem Phosphorylierungsgrad der Neurofilamente wird mit elektrostatischen Abstoßungskräften begründet. Durch die negative Ladung der phosphorylierten Anteile vergrößern sich die Abstände zwischen den einzelnen Filamenten (1992). Mit Zunahme des Axonkalibers ist gleichzeitig eine schnellere und effizientere Erregungsleitung verbunden (SAKAGUCHI *et al.*, 1993; KRIZ *et al.*, 2000). Dephosphorylierte Neurofilamente finden sich beispielsweise in chronischen Demyelinisierungsherden der Multiplen Sklerose, einer entzündlichen Entmarkungskrankheit des Menschen. Der Phosphorylierungsgrad der Neurofilamente ist mit Veränderungen der axonalen Zytoarchitektur assoziiert und trägt wesentlich zur Axondysfunktion bei (PETZOLD *et al.*, 2008). Der Prozess der myelinabhängigen Phosphorylierung der Neurofilamente läuft vermutlich über ein Kinase-

Phosphatase-System, welches vom Kontakt der myelinbildenden Zelle mit dem Neuron dynamisch gesteuert wird (NIXON und SIHAG, 1991; DE WAEGH *et al.*, 1992; STARR *et al.*, 1996; NIXON, 1998; GARCIA *et al.*, 2003).

2.3.2 Physiologie der Myelinisierung

Die multilamelläre Myelinscheide dient der elektrischen Isolation der Axone. Durch die spezifische Anordnung des Myelins in Segmenten mit Aussparungen im Bereich der sog. Ranvier'schen Schnürringe wird eine schnelle saltatorische Erregungsleitung bei hoher Energieeffizienz ermöglicht (BUNGE, 1968; WAXMAN, 1977; TASAKI, 1982; HILDEBRAND *et al.*, 1993). Im PNS werden die Markscheiden von Schwannzellen gebildet, im ZNS übernehmen Oligodendrozyten die Markscheidenbildung (BUNGE, 1968). Die Myelinisierung findet hauptsächlich postnatal statt.

Die Vorläuferzellen der Oligodendrozyten stammen aus der Subventrikularzone des Neuralrohrs sowie aus einer Zone im ventralen Rückenmark (LIU *et al.*, 2002; ROWITCH, 2004). Sie wandern bereits in den ersten Lebenswochen zu ihren endgültigen Positionen aus, um dort in reife Oligodendrozyten zu differenzieren (PRICE, 1994). Ob es im weiteren Verlauf zur Myelinisierung kommt oder ob es nur zur Umhüllung von Axonen ohne Myelinbildung kommt (marklose Fasern), hängt von verschiedenen Faktoren ab. Auch neuronale Signale sind an der Induktion der Myelinogenese beteiligt (NOTTERPEK und ROME, 1994; DEMERENS *et al.*, 1996; *Übersicht bei* ZALC und FIELDS, 2000). Im ZNS werden nur Axone myelinisiert, keine Dendriten (LUBETZKI *et al.*, 1993). Der erste Axonkontakt initiiert eine Proliferation der Oligodendrozyten (DOYLE und COLMAN, 1993). Sie reagieren mit einer gesteigerten Expression von Myelinenen. Im Laufe der Entstehung der Myelinscheide kommt es zunächst zur Bildung von nicht-kompaktiertem Myelin. Die myelinbildende Zelle nimmt Kontakt zum Axon auf, umschließt dieses, bis sich die gegenüberliegenden Zellmembranen berühren. Das Axon wird mit mehreren Lagen lockerer Membranen umwickelt. Zunehmend wird das Zytoplasma der myelinbildenden Zelle verdrängt. Es kommt zur Bildung von reifem kompaktem Myelin (DOYLE und COLMAN, 1993; *Übersicht bei* SHERMAN und BROPHY, 2005). Während im PNS eine Schwannzelle nur jeweils ein Axon myelinisiert, myelinisiert ein Oligodendrozyt im ZNS ein Bündel von bis zu 50 Nervenfasern (BUNGE, 1968).

Myelin ist Zielstruktur diverser ZNS-Pathologien, wie beispielsweise der Multiplen Sklerose des Menschen (MARTIN *et al.*, 1992). Die Myelinsubstanz zeichnet sich biochemisch durch einen geringen Wassergehalt sowie durch ein hohes Lipid-Protein-Verhältnis von etwa 70 % zu 30 % aus (NORTON und CAMMER, 1984).

Aufgrund verschiedener Beobachtungen kann man die Myelinisierung des ZNS als Marker der neuronalen bzw. synaptischen Plastizität betrachten (FIELDS, 2005). Beim Menschen beginnt die Myelinisierung im späten fetalen Stadium und ist erst zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr abgeschlossen (BARTZOKIS *et al.*, 2001; BARTZOKIS, 2004; GIEDD, 2004). Bei der Maus dauert der Myelinisierungsprozess vom Tag der Geburt bis zum 45. bis 60. Tag postnatal an (WIGGINS, 1982). Der Prozess der Myelinisierung folgt demnach speziesspezifisch einem zeitlich festgelegten Schema, daher kann der Myelinisierungsgrad auch als Funktionsparameter der Hirnontogenese herangezogen werden (DAMBSKA und LAURE-KAMIONOWSKA, 1990). Im Gehirn verläuft die Myelinisierung in kaudorostraler Richtung, im Rückenmark in rostrokaudaler Richtung. Exogene Einflüsse in der postnatalen Entwicklungsphase beeinflussen die Myelinisierung. Unter komfortablen Umgebungsbedingungen steigen beispielsweise bei Ratten die Oligodendrozytenzahlen im okzipitalen Cortex sowie der Myelinisierungsgrad im Corpus callosum (SZELIGO und LEBLOND, 1977; SIREVAAG und GREENOUGH, 1987; JURASKA und KOPCIK, 1988). Eine Steigerung der Myelinisierung wird mit einer höheren kognitiven Leistungsfähigkeit in Zusammenhang gebracht. Dies belegen Beobachtungen bei verschiedenen Säugetieren sowie beim Menschen (SANCHEZ *et al.*, 1998; FIELDS, 2005). Im Umkehrschluss führen Myelinisierungsstörungen zu einer herabgesetzten Hirnfunktion und kognitiven Defiziten (BECKMAN, 2004; SCHMITHORST *et al.*, 2005). Auch bei der Schizophrenie werden kognitive Defizite mit Myelinisierungsstörungen in Zusammenhang gebracht (FLYNN *et al.*, 2003; CHAMBERS und PERRONE-BIZZOZERO, 2004).

2.3.3 Virusinfektionen mit Beteiligung der Oligodendroglia

Die hier genannten Virusinfektionen werden vor allem im Zusammenhang mit der Auslösung von Demyelinisierungsherden im ZNS beschrieben. Eine virusinduzierte Störung der Myelinogenese ist für diese Modelle nicht beschrieben, scheint aber angesichts der pathogenetischen Mechanismen durchaus denkbar zu sein. Die Beispiele sollen verdeutlichen,

mit welchen unterschiedlichen Pathogenitätsmechanismen Viren eine Demyelinisierung auslösen können.

Staupe: Ein wie das BDV zu den Mononegavirales gehörendes Virus, das Staupevirus (Canine distemper virus, CDV), löst beim Hund eine selektive primäre Entmarkung aus. Die Erkrankung tritt spontan auf und führt zu einer generalisierten Infektion, die häufig mit einer Meningoenzephalitis assoziiert ist (FANKHAUSER, 1982). Innerhalb des ZNS ist das Virus vorwiegend in Astrozyten nachzuweisen (MUTINELLI *et al.*, 1989). In vitro konnte eine Infektion von Oligodendrozyten nicht nachgewiesen werden (VANDEVELDE *et al.*, 1985a). Elektronenmikroskopische Studien in vivo belegen, dass die CDV-Infektion von Oligodendrogliazellen vergleichsweise selten ist (WISNIEWSKI *et al.*, 1972; RAINE, 1976; HIGGINS *et al.*, 1982; SUMMERS und APPEL, 1987; BLAKEMORE *et al.*, 1989). Die akute Phase der Erkrankung geht mit einer virusinduzierten schweren Immunsuppression einher (VANDEVELDE *et al.*, 1982). Die selektive Entmarkung in der akuten Phase ist daher nicht immunvermittelt, sondern wird auf eine direkte Oligodendrozytenschädigung als Folge der Virusreplikation zurückgeführt (VANDEVELDE *et al.*, 1985b; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993, 1998). Charakteristisch ist eine restriktive Virusreplikation mit Transkription ohne wesentliche Translation von Virusbestandteilen (ZURBRIGGEN *et al.*, 1986, 1987, 1993, 1998). Zeichen einer Oligodendrozytenschädigung sind eine deutlich verminderte Myelintranskription (ZURBRIGGEN *et al.*, 1998), morphologische Zellveränderungen (SUMMERS und APPEL, 1987; BLAKEMORE *et al.*, 1989) sowie eine metabolische Dysfunktion der Oligodendrozyten (GLAUS *et al.*, 1990). Es bestehen jedoch keine konkreten Hinweise auf Zelluntergang in Form von Apoptose oder Nekrose der Oligodendrozytenpopulation (SCHOBESBERGER *et al.*, 1999, 2002). Warum es trotz der niedrigen Infektionsrate der Oligodendrozyten zu derart massiven Auswirkungen auf die Oligodendrozyten-Population und die Myelinsubstanz kommt, ist noch weitgehend unklar (VANDEVELDE und ZURBRIGGEN, 2005). In akuten Entmarkungsherden finden sich auch vermehrt aktivierte Mikrogliazellen, die in hohem Maße zytotoxische Metaboliten produzieren, die zu einer Schädigung der Oligodendrozyten beitragen können (STEIN *et al.*, 2004).

In subakuten und chronischen Verlaufsformen scheinen aber auch immunologische Mechanismen und damit die Entzündungsreaktion an der Zerstörung der Myelinscheiden beteiligt zu sein (VANDEVELDE *et al.*, 1982). Die Demyelinisierung in der chronischen Infektionsphase wird mit einer sog. „Bystanderreaktion“ erklärt, bei der Antikörperproduzierende Zellen und Makrophagen im Nervensystem im Rahmen starker Entzündungsreaktionen unspezifisch mitstimuliert werden (WISNIEWSKI *et al.*, 1972; BOTTERON *et al.*, 1992). Virusspezifische Antikörper binden an persistent infizierte Zellen und induzieren hierüber die Freisetzung reaktiver Sauerstoff-Spezies und weiterer toxischer Metaboliten durch Makrophagen (BÜRGE *et al.*, 1989). Makrophagen sind daher Effektorzellen (WISNIEWSKI *et al.*, 1972).

Im Rahmen der CDV-Infektion werden in geringem Ausmaß auch Autoantikörper gegen Myelinbestandteile gebildet (KRAKOWKA *et al.*, 1973). In vivo konnten bei vier von elf Hunden auch zellvermittelte autoimmune Reaktionen nachgewiesen werden (CERRUTISOLA *et al.*, 1983). Diese autoimmunen Reaktionen korrelieren jedoch nicht mit der Schwere der Erkrankung und werden daher in der Pathogenese der Erkrankung nur untergeordnet betrachtet (VANDEVELDE und ZURBRIGGEN, 2005).

Charakteristisch für die CDV-Infektion ist die Viruspersistenz (MÜLLER *et al.*, 1995). Die Viruspersistenz ist assoziiert mit chronischen und chronisch-rezidivierenden Verlaufsformen der Erkrankung.

Maus-Hepatitis-Virus- (MHV-) Enzephalomyelitis: Die Infektion von Mäusen mit dem JHM-Stamm des MHV, einem Coronavirus, beschreibt ursprünglich ein Modell, in dem die Entmarkung im Wesentlichen auf eine direkte zytolytische Infektion der Oligodendrozyten zurückzuführen ist. Virusantigen findet sich überwiegend in Oligodendrozyten (BAILEY *et al.*, 1949; LAMPERT *et al.*, 1973; WEINER, 1973; KNOBLER *et al.*, 1983). Die akute Entmarkung ist eine direkte Konsequenz der virusinduzierten zytopathischen Veränderungen in den myelinbildenden Zellen (VAN BERLO *et al.*, 1989; BARAC-LATAS *et al.*, 1997). Die Oligodendrozyten zeigen zunächst morphologische Auffälligkeiten wie Hypertrophie, bevor sie schließlich degenerieren. Die Myelinsubstanz wird im Verlauf der Infektion durch Makrophagen abgetragen (LAMPERT, 1978). Immunsuppression hat in diesem Modell

keinen Einfluss auf die Entmarkungsaktivität (WEINER, 1973). Das Virus persistiert im ZNS und kann chronisch-rezidivierende Verläufe auslösen, in denen überlebende Oligodendrozyten proliferieren und Anzeichen von Remyelinisierung zeigen (HERNDON *et al.*, 1975).

Durch Verwendung bestimmter Virusmutanten und durch Variation des Zeitpunktes der Infektion gelang es, ein Corona-Virus-Modell zu entwickeln, das sich wesentlich von dem oben beschriebenen unterscheidet. Es konnte bei Ratten in hoher Inzidenz eine subakute, teilweise chronisch-rezidivierende demyelinisierende Enzephalomyelitis induziert werden, die in ihrem subakuten oder chronischen Stadium der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) sehr ähnlich ist, bei der durch Injektion von Myelinbestandteilen autoimmune Prozesse ausgelöst werden (NAGASHIMA *et al.*, 1978; *Übersichten über EAE bei* RAO und SEGAL, 2004; BAXTER, 2007). Interessanterweise fand sich in diesem MHV-Modell eine zelluläre Immunreaktion gegen MBP. Durch Transfer von T-Lymphozyten erkrankter Tiere konnte eine allergische Enzephalomyelitis auf gesunde Tiere übertragen werden (WATANABE *et al.*, 1983).

TMEV-Infektion: Ein Beispiel für eine virusinduzierte autoimmune Entmarkungskrankheit ist die experimentelle Infektion mit dem murinen TMEV (Theiler's murine encephalomyelitis virus). Eine natürliche Infektion mit dem Picornavirus TMEV ist selten, es wurden daher experimentelle Modelle entwickelt, die zum Studium der Pathogenitätsmechanismen demyelinisierender Erkrankungen genutzt werden. Die Erkrankung verläuft nach intrazerebraler Infektion biphasisch. In der akuten Phase infiziert das Virus vorzugsweise Neuronen der grauen Substanz und verursacht neuronale Nekrosen (AUBERT und BRAHIC, 1995). Nach einer vorübergehenden Erholungsphase kommt es einige Wochen später zur Entstehung von großflächigen Entmarkungsherden vorwiegend im Rückenmark. Virusantigen lässt sich in der chronischen Phase nur vereinzelt in Astrozyten, Oligodendrozyten und Axonen nachweisen (DAL CANTO und RABINOWITZ, 1982; KNOBLER *et al.*, 1983). Histologische Kennzeichen der Entmarkung sind vor allem vesikuläre Zerstörung der Markscheiden oder „Myelin Stripping“ durch Makrophagen (DAL CANTO und LIPTON, 1975). Die Erkrankung kann durch Immunsuppression weitgehend verhindert werden (DAL

CANTO und RABINOWITZ, 1982). Dies deutet darauf hin, dass immunpathologische Prozesse eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der durch TMEV induzierten Entmarkungsenzephalitis spielen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Immunreaktion nicht nur gegen Virusantigene richtet, sondern auch Autoantigene erfasst (BORROW *et al.*, 1998). Dieses Modell zeigt eindrucksvoll, dass durch eine Virusinfektion ein enzephalitogener Autoimmunprozess ausgelöst werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3-1: Alkoholreihe zur Entparaffinierung bzw. Entwässerung

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Xylol	Xylol reinst (Isomergemisch) Ph Helv V Merck: 8685
100%iger Alkohol	Ethanol 99,5 % (V/V) mit 1 % Petrolether vergällt VbFB UN1170 Eg-Nr.: 200-578-6
96%iger Alkohol	Ethanol 96 % (V/V) mit 1 % Petrolether vergällt VbFB UN1170 Eg-Nr.: 200-578-6
70%iger Alkohol	Ethanol 70 % (V/V) mit 1 % Petrolether vergällt VbFB UN1170 Eg-Nr.: 200-578-6
50%iger Alkohol	Ethanol 99,5 % (V/V) mit 1 % Petrolether vergällt VbFB UN1170 Eg-Nr.: 200-578-6 1 : 1 mit Aqua dest.

Tabelle 3-2: Reagenzien, Puffer, Lösungen

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
ABC	Vectastain ABC Kit (Vector, PK-4000) 2 µl Lsg. A + 2 µl Lsg. B + 100 µl PBSA mind. 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen
AP (Streptavidin Alkalische Phosphatase)	an alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin Dako Real™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP), 100 ml, gebrauchsfertig aus: Dako Real™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Dako, K5005)

3 - Material und Methoden

Tabelle 3-2: (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Citratpuffer	Dako Cytomation Target Retrieval Solution 10x Concentrate (Dako, S1699) 1 : 10 mit Aqua dest. → pH 6 (für Behälter: 30 ml Konzentrat + 270 ml Aqua dest.)
DAB	B: Substrate Buffer C: DAB + Chromogen (X50) (Dako, K 5007) C : B im Verhältnis 1 : 50 frisch ansetzen, kühl und dunkel lagern (Kühlschranktemperatur)
Double Staining Block	Dako Double Staining Block, gebrauchsfertig aus: EnVision™ Doublestain System (Dako, K1395)
Eosin	Pulver 1 %ig in Aqua dest. Certistain® Eosin G (gelblich) (C.I. 45380) (Merck, 1.15935.0100)
Fast Red – Chromogen	Dako Real™ AP Substrate Buffer (1000 µl) + Dako Real™ Levamisole (4 µl) + Dako Real™ Chromogen Red 1 (40 µl) + Dako Real™ Chromogen Red 2 (40 µl) + Dako Real™ Chromogen Red 3 (40 µl) Chromogen-Arbeitslösung in der oben angegebenen Reihenfolge und Menge frisch ansetzen, nach Zugabe jedes Chromogens gründlich mischen und innerhalb von 20 Minuten verbrauchen, kühl und dunkel lagern alle Substanzen aus: Dako Real™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Dako, K5005)
H₂O₂-Methanol	1%ig: 10 ml 30%iges H ₂ O ₂ Perhydrol® (Merck, 7200) + 290 ml Methanol (Merck, 6009)
Hämalaun (für HE-Färbung)	Mayers Hämalaunlösung® (Merck, 1.09249.2500)

3 - Material und Methoden

Tabelle 3-2: (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Hämalaun (für IHC)	1 g Hämatoxylin (Merck, 4302) 0,2 g Natrium-Jodad (Merck, 6526) 50 g Aluminium-Kalium-Sulfat (Merck, 1047) 50 g Chloralhydrat (Merck, 2811) 1 g Citronensäure (Merck, 244) auf 1 l Aqua dest.
Kernechtrot	5%ige wässrige Aluminiumsulfatlösung (Merck 101102) aufkochen + 0,1 % Certistain [®] Kernechtrot (Merck, 1.15939) 10 Minuten kochen lassen vor Gebrauch filtrieren
KV	Pulver 1%ig in Aqua dest. Kresylviolett (Merck, 5235)
PBS	für 10 l: 70,13 g NaCl (Merck, 6404) 13,80 g NaH ₂ PO ₄ (Merck, 6346) 54,40 g K ₂ HPO ₄ (Merck, 5104) 48 ml NaOH 1n ad 10 l Aqua dest. → pH 7,6
PBSA	Bovines Serumalbumin (BSA) 1%ig in PBS Albumin, bovine initial fractionation by heat shock Fraction V (Sigma-Aldrich, A-3294)
P-NS	Pferde-Normalserum Normal horse serum (Vector, S-2000)
Pronase	Pronase E (from Streptomyces griseus) (Merck, 1.07433.0005)
Sudanschwarz	0,3 g Sudanschwarz (Chroma Waldeck, 1A 430) mit 100 ml heißem 70%igen Ethanol übergießen, mehrere Stunden bei 60° C erwärmen vor Gebrauch filtrieren
Tween-Puffer	Tween [®] 20 (Dako, S1966) 5 ml auf 10 l PBS

Tabelle 3-2: (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller, Bestellnummer
Z-NS	Ziegen-Normalserum Normal goat serum (Vector, S-1000)

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3-3: Geräte, Arbeitsmittel

Bezeichnung	Hersteller, Handelsname
Ausgießapparat	Shandon, Histocentre 2
Ausgießformen aus Stahlblech	TissueTek
Brutschrank 37° C	Melag
Brutschrank 57° C	Memmert, Modell 400
Dampfgarer	Braun, MultiGourmet
Einbettautomat	Shandon, Citadel 1000
Eindeckautomat	Leica, CV5030
Foto-Kamera	Leica, DFC 480 R2
Inkubationscontainer (für hitzeinduzierte Epitop-demaskierung)	Dako REAL™ Incubation Container, S2030 Dako REAL™ Slide Holder, S2029
Mikroskop	Leica, DM 5000 B
Paraffinstreckbad	Bavimed oder Leica, HI 1210
pH-Meter	WTW, pH 525
Pipetten	Gilson (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, jeweils verstellbar)
Präzisionswaage	Sartorius, MC 210 P
Schlitten-Mikrotom	Reichert-Jung, Histoslide 2000

Tabelle 3-4: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller, Handelsname, Bestellnummer
Glycergel-Eindeckmedium	Dako, Glycergel [®] , C0563
Handschuhe	Ansell, Sensiclean II [®]
Objektträger	Menzel, OT Menzel-Gläser, SuperFrost [®] Plus, J 1800 AMNZ
Paraffinpastillen	Merck, Paraffinpastillen; Erstarrungspunkt 56–58° C
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Parafilm „M“ [®] , IL. 60631

3.1.3 Antikörper

Die Primärantikörper wurden in der im jeweiligen Protokoll angegebenen Verdünnung mit PBSA verdünnt. Bezugsquellen, Klonalität und Spezifität können der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 3-5) entnommen werden.

Tabelle 3-5: Primärantikörper

Bezeichnung	Produktname (Hersteller, Bestellnummer)
BDV p24, Klon 24kD/28D12	Prof. Stitz, FLI
BDV p38, Klon 38/17C1	Prof. Stitz, FLI
CD45RC, Klon MRC OX-22	Mouse Anti Rat CD45RC (Serotec, MCA53G)
CD68, Klon ED1	Mouse Anti Rat CD68 (Serotec, MCA341R)
CD8, Klon MRC OX-8	Mouse Anti Rat CD8 (Serotec, MCA48R)
MBP	Anti-Human Myelin Basic Protein Rabbit Antiserum (Dako, A0623)
Olig2	Anti-Human Olig2 Rabbit IgG Affinity Purity (IBL, Code-No. 18953)

Tabelle 3-6: Sekundärantikörper

Spezifität	Produktname (Hersteller, Bestellnummer)
Pferd-anti-Maus (biotinyliert, rattenabsorbiert)	Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) rat absorbed affinity purified made in horse (Vector, BA-2001)
Ziege-anti-Kaninchen (biotinyliert)	Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) affinity purified made in goat (Vector, BA-1000)
UltraTek Anti-Polyvalent Ziege-anti-Polyvalent (anti-Maus, -Ratte, -Kaninchen, -Meerschweinchen) (biotinyliert)	UltraTek Biotinylated Anti-Polyvalent (Ready-To-Use) (ScyTek Laboratories, ABN999)

Tabelle 3-7: Tertiärreagenzien

Reagenz	Produktname (Hersteller, Bestellnummer)
ABC	Vectastain ABC Kit (Vector, PK-4000) 2 µl Lsg. A + 2 µl Lsg. B + 100 µl PBSA, 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen
AP (Streptavidin Alkalische Phosphatase)	an alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin Dako Real™ Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP), 100 ml, gebrauchsfertig aus: Dako Real™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Dako, K5005)
UltraTek HRP (Horseradish Peroxidase)	UltraTek HRP (ScyTek Laboratories, ABN999)

3.1.4 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Studie wurden Lewis Ratten verwendet. Dieser Rattenstamm weist eine besonders hohe Suszeptibilität gegenüber dem BDV auf (HERZOG *et al.*, 1991). Sämtliche Versuchsvorgänge fanden im Friedrich-Loeffler-Institut für Immunologie in Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. L. Stitz statt. Insgesamt waren 42 Lewis Ratten Bestandteil dieser Versuchsreihe. Hiervon wurden 30 Tiere im Alter bis zu 24 Stunden post partum über die aerogene Route mit unterschiedlich hohen Virusdosen infiziert. Der Infektionsmodus wird im

Kapitel 3.2 näher beschrieben. Die Tiere wurden erst nach dem Absetzen von den Müttern getrennt. Wurfgeschwister wurden ab der Geschlechtsreife nach Geschlechtern getrennt. Die gleichgeschlechtlichen Wurfgeschwister wurden jeweils bis zur Tötung gemeinsam gehalten. In regelmäßigen Abständen erfolgten sowohl eine Bewertung des klinisch-neurologischen Status als auch serologische Untersuchungen auf BDV-spezifische Antikörper sowie PCR-Untersuchungen in PBMC's auf p24-RNA. Die Tiere wurden nach definierten Zeiträumen getötet. Ergebnisse der Untersuchungen sowie das Alter bei Tötung können **Tabelle 4-1** entnommen werden. Es wurden sowohl zwei Mütter (Wurf 0 und Wurf 11) als auch drei Sentinels (Wurf VII und Wurf X) zum Nachweis einer eventuellen natürlichen BDV-Übertragung in die Untersuchung einbezogen. Bei den Sentinels handelt es sich um nicht infizierte Tiere, die die gesamte Lebenszeit mit den Wurfgeschwistern zusammen gehalten wurden. Die Gruppenzahl bezeichnet alle Tiere eines Wurfs. Innerhalb des Wurfs wurden die Tiere fortlaufend nummeriert. Die Bezeichnung NBAE wurde ausschließlich für neugeborene aerogen infizierte Tiere verwendet, die Bezeichnung S wurde für Sentinels verwendet. Als Negativ-Kontrolltiere dienten sieben Tiere aus den Altersgruppen 28, 30, 42 und 56 Tage, die keinen Kontakt zu den infizierten Tieren hatten und nicht aerogen infiziert wurden. Die Negativ-Kontrolltiere sind in **Tabelle 4-3** aufgelistet.

Die Tötung erfolgte in Ethernarkose durch Dekapitation. Die Gehirne wurden in 4%iges Formalin verbracht und bis zur Aufarbeitung bei einer Temperatur von 4° C gelagert.

3.1.5 Virusstamm

Der ursprünglich im Institut für Virologie der Justus-Liebig-Universität Gießen isolierte Virusstamm He/80 entstammt dem Gehirn eines spontan an BD erkrankten Pferdes. Er wurde zweimal durch Kaninchen (intrazerebrale Infektion), dreimal in Kultur (fetale Kaninchen-Gehirnzellen, MDCK-Zellen), zweimal durch neugeborene Lewis Ratten passagiert, homogenisiert und auf eine 10%ige Suspension mit PBS eingestellt (PLANZ *et al.*, 2003b).

3.2 Aerogene Infektion

Die Infektion der Versuchstiere wurde am Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts unter Leitung von Prof. Dr. L. Stitz vorgenommen. Hierfür wurden die Tiere innerhalb von 24 Stunden post partum für die Dauer von 10 Minuten dem Aerosol einer

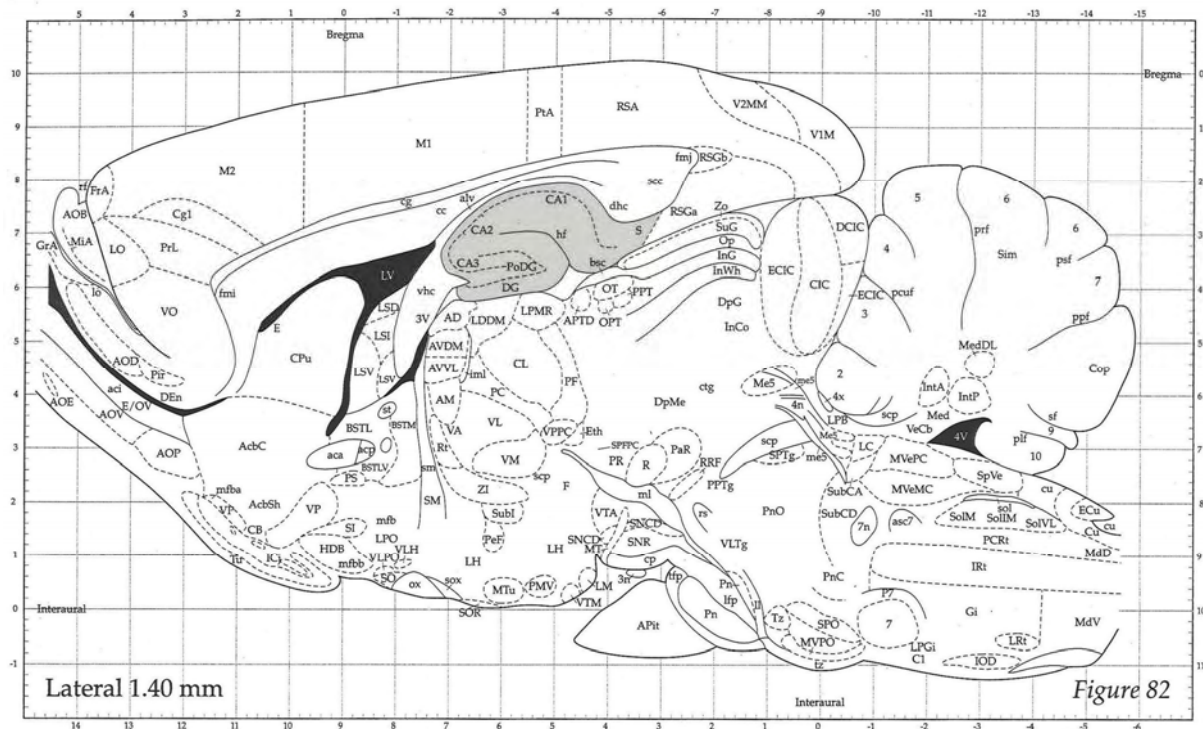
Virussuspension in einer Begasungskammer ausgesetzt. Der Ausgangstiter der Viruspräparation betrug 5×10^6 focus forming units (ffu) pro ml. Die Tiere wurden hierbei mit unterschiedlich hohen Viruskonzentrationen infiziert (**Tabelle 4-1**). Für die Generierung des Aerosols wurde ein Vernebler (Pari-Nebulizer[®]) verwendet, der Mikropartikel von höchstens 10 µm Durchmesser erzeugt (60 % der Gesamtpartikel sind kleiner als 2,5 µm, 52 % der Gesamtpartikel sind kleiner als 1,2 µm). Aufgrund der idealen Partikelgröße wird die Virussuspension direkt in tracheobronchiale und alveoläre Atemwege inokuliert.

3.3 Aufarbeitung der Gehirne

3.3.1 Paraffin-Einbettung

Die linke Gehirnhälfte der formalinfixierten Gehirne wurde parasagittal in Höhe der Hippocampus-Region geschnitten und in Kunststoff-Einbettkassetten verbracht. Dies entspricht der Schnittebene von 1,4 mm parasagittal nach PAXINOS und WATSON (1998) (**Abbildung 3-1**). Anschließend wurden die Gehirnproben in einem Einbettautomaten (Shandon, Citadel 1000) maschinell entwässert und mit Paraffin durchtränkt (Merck, Paraffinpastillen; Erstarrungspunkt 56–58° C).

Abbildung 3-1: Untersuchte sagittale Schnittebene



Modifiziert aus: PAXINOS und WATSON, 1998

Parasagittale Schnittebene in Höhe von 1,4 mm lateral; in dieser Schnittebene stellt sich die Hippocampusformation einschließlich Gyrus dentatus komplett dar; die Hippocampusformation ist grau hervorgehoben

3.3.2 Ausgießen und Aufblocken der Präparate

Am Ausgießapparat (Shandon, Histocentre 2) wurden die mit Paraffin durchtränkten, 48° C warmen Präparate in Ausgießformen aus Stahlblech gesetzt und mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Die Präparate wurden hierbei so justiert, dass die spätere Anschnittfläche in der hierfür vorgesehenen Aussparung der Ausgießform aufliegt. Die bereits beschriftete Einbettkassette des jeweiligen Präparates wurde als Spanträger aufgesetzt. Die gefüllte Form wurde bis zum Erkalten auf eine durch Eiswürfel gekühlte Metallplatte gestellt. Nach dem Erkalten der Proben wurden die Paraffinblöcke aus der Gießform genommen und bis zur vollständigen Aushärtung für 15 Minuten in Eiswasser gelagert. Die fertigen Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3.3 Schneiden

Am Schlitten-Mikrotom (Reichert-Jung, Histoslid 2000) wurden von allen Paraffinblöcken 2µm dicke Serienschritte in Höhe der Hippocampusformation angefertigt. Die Schnitte wurden zunächst auf kaltes Aqua dest. aufgelegt und anschließend zum Strecken in ein 47° C warmes Wasserbad (Aqua dest., Paraffinstreckbad Bavimed) überführt. Die auf Objektträger (OT Menzel-Gläser, SuperFrost® Plus, J 1800 AMNZ) aufgezogenen Schnitte wurden für 24 Stunden im Wärmeschrank (Memmert, Modell 400) bei 57° C getrocknet.

3.4 Histologische und histochemische Färbemethoden

3.4.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung stellt eine Übersichtsfärbung dar. Die positiv geladenen Komplexverbindungen des Hämalauns lagern sich an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren. Die tiefblaue Färbung der Kerne wird durch Bläuen mittels Leitungswasser erreicht. Eosin ist negativ geladen und bindet sich an die positiv geladenen Bestandteile im Zytoplasma (Proteine) und färbt diese rot.

1. Entparaffinierung der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe:
 - Xylol (12 Minuten)
 - 100%iger Alkohol (5 Sekunden)
 - Schnitte zur Fixierung antrocknen lassen
 - 96%iger Alkohol (5 Sekunden)
 - 70%iger Alkohol (5 Sekunden)
 - Aqua dest. (5 Sekunden)
2. Inkubation der Schnitte in **Hämalaun** (5 Minuten)
3. Bläuen unter fließendem Leitungswasser (4 Minuten)
4. Färbung der Schnitte in **Eosin** (1 Minute)
5. Kurzes Eintauchen der Schnitte in Leitungswasser

6. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Xylol; jeweils 5 Sekunden)
7. Maschinelles Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Leica, CV 5030)

3.4.2 KV-Färbung

Als Neuronenfärbung wurde die Kresylviolett-Färbung (KV-Färbung) eingesetzt. KV färbt endoplasmatisches Retikulum dunkelblau-violett. Neuronenzellkörper werden aufgrund ihres hohen Gehalts an Nissl-Substanz deutlich dargestellt.

1. Entparaffinierung der Schnitte wie unter 3.4.1.1. angeführt
2. KV-Lösung mit 2-3 Tropfen Eisessig ansäuern und frisch filtrieren, Inkubation der Schnitte in **KV-Lösung** (10 Minuten)
3. Schnitte kurz in Aqua dest. eintauchen
4. 96%igen Alkohol mit 2-3 Tropfen Eisessig ansäuern, Schnitte kurz eintauchen
5. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Xylol; jeweils 5 Sekunden)
6. Maschinelles Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Leica, CV 5030)

3.4.3 Myelin-Färbung (Sudanschwarz-Färbung)

Der lipophile Farbstoff Sudanschwarz (SSW) färbt die lipidhaltige Schicht myelinisierter Axone selektiv an. Markscheiden erscheinen daher schwarz, Kerne und Zytoplasma werden mit Kernechtrot gegengefärbt.

1. Entparaffinierung bis zum 70%igen Alkohol:
 - Xylol (12 Minuten)
 - 100%iger Alkohol (5 Sekunden)
 - Schnitte zur Fixierung antrocknen lassen
 - 96%iger Alkohol (5 Sekunden)

- 70%iger Alkohol (5 Sekunden)
2. Färbung in **Sudanschwarz** (10 Minuten)
 3. Schnitte mit Aqua dest. spülen
 4. Kurz in 50%igem Alkohol schwenken
 5. Kurz in Aqua dest. spülen
 6. Gegenfärbung mit **Kernechtrot** (5 Minuten)
 7. Kurz in Leitungswasser spülen
 8. Sofort mit Gelatine-Eindeckmedium (Glyergel[®]) eindecken; das Glycergel[®]-Eindeckmedium vorher zur Verflüssigung für einige Minuten im Wärmebad bei 40° C erwärmen

3.5 Immunhistochemische Färbemethoden

3.5.1 Grundlagen der Immunhistochemie

Mit Hilfe von Antikörpern, Enzymen und Chromogenen lassen sich verschiedene antigene Strukturen spezifisch anfärben. Man unterscheidet ein direktes Verfahren von einem indirekten Verfahren. Bei der direkten Methode wird in einer Ein-Schritt-Reaktion die gewünschte Struktur dargestellt. Dies geschieht durch biotinylierte oder enzymgekoppelte Antikörper gegen das gewünschte Antigen. In einer weiteren Chromogen-Substrat-Reaktion erfolgt die Markierung des Antigens. Dieses Verfahren ist hochspezifisch, aber aufgrund der fehlenden Signalverstärkung häufig nicht sensitiv genug. Bei der indirekten Methode werden daher zur Amplifizierung des Signals sogenannte Brückenantikörper (Sekundärantikörper) eingesetzt, die an den Fc-Anteil des Primärantikörpers binden. Die Sekundärantikörper können biotinyliert oder enzymgekoppelt sein. Ein gebräuchliches Nachweisverfahren ist die LSAB-Methode. Hierbei nutzt man die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin zu Biotin. Hierbei werden biotinylierte Sekundärantikörper verwendet, die die anschließende Verwendung von Avidin- oder Streptavidin-gekoppelten Enzymen ermöglichen. Gebräuchliche Enzyme sind die Peroxidase, die u. a. Diaminobenzidin umsetzt, und die Alkalische Phosphatase, die u. a. Fast Red umsetzt. In der vorliegenden Arbeit wurden

3 - Material und Methoden

ausschließlich indirekte Nachweisverfahren angewandt. Eine Kurzübersicht über die einzelnen Protokolle findet sich in **Tabelle 3-8**.

Tabelle 3-8: Übersicht über die immunhistochemischen Protokolle

Primär-antikörper Klon	Klonalität/ Spezifität	Verdünnung	Demaskierung	Blocking-Serum	Sekundär-antikörper	Tertiärreagenz	Chromogen
BDV p24 Klon 28D12	monoklonal Maus-anti-Ratte	1 : 100	-	P-NS	Pferd-anti-Maus IgG (ratten- absorbiert, biotinyliert)	ABC / AP	DAB / Fast Red
BDV p38 Klon 38/17C1	monoklonal Maus-anti-Ratte	1 : 500	-	P-NS	Pferd-anti-Maus IgG (ratten- absorbiert, biotinyliert)	ABC / AP	DAB / Fast Red
CD68 Klon ED1	monoklonal Maus-anti-Ratte	1 : 100	Pronase 1%ig 10 Minuten	P-NS	Pferd-anti-Maus IgG (ratten- absorbiert, biotinyliert)	ABC	DAB
CD45RC Klon OX22	monoklonal Maus-anti-Ratte	1 : 200	Citratpuffer Dampfgerar 20 Minuten	P-NS	Pferd-anti-Maus IgG (ratten- absorbiert, biotinyliert)	ABC	DAB
CD8 Klon OX8	monoklonal Maus-anti-Ratte	1 : 100	-	P-NS	Pferd-anti-Maus IgG (ratten- absorbiert, biotinyliert)	ABC	DAB
MBP	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch	1 : 200	Citratpuffer Dampfgerar 20 Minuten	-	Ziege-anti-Polyvalent UltraTek (biotinyliert)	UltraTek HRP	DAB
Olig2	polyklonal Kaninchen-anti-Mensch	1 : 50	Citratpuffer Dampfgerar 20 Minuten	Z-NS	Ziege-anti-Kaninchen (biotinyliert)	ABC / AP	DAB / Fast Red

3.5.2 Immunhistochemisches Protokoll (UltraTek-Methode) mit DAB

Die UltraTek-Methode bezeichnet eine vereinfachte immunhistochemische Methode unter Verwendung eines gebrauchsfertigen polyvalenten Reagenzienkits. Es handelt sich um ein indirektes Nachweisverfahren. Die Amplifizierung des Signals erfolgt mit einem polyvalenten biotinylierten Sekundärantikörper. Als Enzym dient die Peroxidase, die anschließend Diaminobenzidin umsetzt.

Dieses Protokoll wurde zum Nachweis von **MBP** angewendet. Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden statt des Primärantikörpers 100 µl PBSA aufgetragen. Alle sonstigen Schritte erfolgten nach dem folgenden Protokoll:

1. Erster Schritt der Entparaffinierung:
 - Xylol (12 Minuten)
 - 100%iger Alkohol (5 Sekunden)
 - Schnitte zur Fixierung antrocknen lassen
2. Hemmung der endogenen Peroxidase in 1%igem H₂O₂-Methanol (25 Minuten)
3. Fortsetzung der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 70 %, Aqua dest.; jeweils 5 Sekunden)
4. Demaskierung:
 - Inkubation der Schnitte in Citratpuffer im Dampfgarer (20 Minuten)
(hitzeinduzierte Epitopdemaskierung)
5. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
6. Auftragen von 100µl des Primärantikörpers (**MBP**) in einer Verdünnung von 1 : 100 mit PBSA (Negativkontrolle: 100 µl PBSA), Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (60 Minuten)
7. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
8. Auftragen von 300 µl der gebrauchsfertigen Lösung UltraTek Anti-Polyvalent, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (15 Minuten)
9. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer

10. Auftragen von 300 µl gebrauchsfertiger UltraTek-Lösung II, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (15 Minuten)
11. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
12. Auftragen von 300 µl **DAB** (Substrat C : Substrat B in einer Verdünnung von 1 : 50 frisch ansetzen), bei leichter Braunfärbung Schnitte in Aqua dest. überführen
13. Einmal mit Aqua dest. spülen
14. Schnitte in **Hämalaun (für IHC)** gegenfärben (4 Minuten)
15. Bläuen unter fließendem Leitungswasser (3 Minuten)
16. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Xylol; jeweils 5 Sekunden)
17. Maschinelles Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Leica, CV 5030)

3.5.3 Immunhistochemisches Protokoll (ABC-Methode) mit DAB

Die ABC-Methode ist ebenfalls eine indirekte immunhistochemische Nachweismethode. Nach Bindung des Primärantikörpers an das Antigen wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugefügt, welcher gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist. Anschließend wird mit Peroxidase markiertes Avidin (ABC-Komplex) hinzugegeben. Hierbei nutzt man die starke Affinität von Avidin zu Biotin. Als Chromogen dient Diaminobenzidin, das durch die Peroxidase umgesetzt wird.

Für folgende Antikörper wurde dieses Protokoll angewendet: **BDV p24**, **BDV p38**, **ED1**, **CD45**, **CD8** und **Olig2**. Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden statt des Primärantikörpers 100 µl PBSA aufgetragen. Alle sonstigen Schritte erfolgten nach dem folgenden Protokoll:

1. Erster Schritt der Entparaffinierung:
 - Xylol (12 Minuten)
 - 100%iger Alkohol (5 Sekunden)
 - Schnitte zur Fixierung antrocknen lassen

2. Hemmung der endogenen Peroxidase in 1%igem H₂O₂-Methanol (25 Minuten)
3. Fortsetzung der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 70 %, Aqua dest.; jeweils 5 Sekunden)
4. Demaskierung:
 - Für den Nachweis von **ED1**:
Inkubation der Schnitte in 1%iger Pronase-Lösung im Brutschrank bei 37° C (10 Minuten)

(enzymatische Gewebeprevorbehandlung)
 - Für den Nachweis von **CD45** und **Olig2**:
Inkubation der Schnitte in Citratpuffer im Dampfgerar (20 Minuten)
(hitzeinduzierte Epitopdemaskierung)
 - Für den Nachweis von **BDVp24**, **BDVp38** und **CD8** sind keine Demaskierungsschritte erforderlich
5. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
6. Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen:
 - Für den Nachweis von **BDVp24**, **BDVp38**, **CD45**, **CD8** und **ED1**:
Vorinkubation mit 1 : 100 in PBSA verdünntem Pferde-Normalserum (**P-NS**), 300 µl / Schnitt, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (30 Minuten)
 - Für den Nachweis von **Olig2**:
Vorinkubation mit 1 : 100 in PBSA verdünntem Ziegen-Normalserum (**Z-NS**), 300 µl / Schnitt, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (30 Minuten)
7. Normalserum abkippen, nicht spülen
8. Auftragen von 100 µl des Primärantikörpers entsprechend der in der Tabelle angegebenen Verdünnung mit PBSA (Negativkontrolle: 100 µl PBSA), Abdeckung mit Parafilm

Primärantikörper	Verdünnung
BDV p24	1 : 100
BDV p38	1 : 500
CD45	1 : 200
CD8	1 : 100
ED1	1 : 100
Olig2	1 : 50

9. Inkubation der Schnitte bei 4° C im Kühlschrank (24 Stunden)
10. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
11. Auftragen von 100 µl des Sekundärantikörpers:
 - Für den Nachweis von **BDVp24**, **BDVp38**, **CD45**, **CD8** und **ED1**:
biotinylierter **Pferd-anti-Maus** AK, rattenabsorbiert, in einer Verdünnung von 1 : 50 mit PBSA, Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (30 Minuten)
 - Für den Nachweis von **Olig2**:
biotinylierter **Ziege-anti-Kaninchen** AK in einer Verdünnung von 1 : 100 mit PBSA, Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (30 Minuten)
12. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
13. Auftragen von 100 µl der **ABC-Lösung** (2 µl A + 2 µl B + 100 µl PBSA; 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen), Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (1 Stunde)
14. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
15. Auftragen von 300 µl **DAB** (Substrat C : Substrat B in einer Verdünnung von 1 : 50 frisch ansetzen), bei leichter Braunfärbung Schnitte in Aqua dest. überführen
16. Einmaliges Waschen in Aqua dest.
17. Schnitte in **Hämalaun (für IHC)** gegenfärben (4 Minuten)

18. Bläuen unter fließendem Leitungswasser (3 Minuten)
19. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Xylol; jeweils 5 Sekunden)
20. Maschinelles Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Leica, CV 5030)

3.5.4 Doppelmarkierungen

Zur Etablierung von Doppelmarkierungstechniken wurde die LSAB-Methode mit Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase bei den Antikörpern **BDVp24**, **BDVp38**, und **Olig2** eingesetzt. Es handelt sich ebenfalls um eine indirekte Nachweismethode. In diesem Fall nutzt man die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin. Zur Erhöhung der Spezifität werden an den Primärantikörper adaptierte biotinylierte Brückenantikörper als Sekundärantikörper eingesetzt. Im Hinblick auf die zu etablierende Doppelmarkierungstechnik dient dies außerdem der eindeutigen Markierung der entsprechenden Primärantikörper, die aus unterschiedlichen Spezies generiert wurden (Maus, Kaninchen). Anschließend wird mit alkalischer Phosphatase markiertes Streptavidin zugegeben. Aufgrund der starken Affinität von Streptavidin zu Biotin reagieren die biotinylierten Antikörper-Moleküle (Sekundärantikörper) mit den mit alkalischer Phosphatase konjugierten Streptavidin-Molekülen. Die Enzymreaktion der alkalischen Phosphatase mit dem Fast Red-Chromogen ergibt am Ort des Zielantigens ein rotes Endprodukt.

Bei jedem Färbedurchgang wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden statt des Primärantikörpers 100 µl PBSA aufgetragen. Alle sonstigen Schritte erfolgten nach dem folgenden Protokoll:

1. Erster Schritt der Entparaffinierung:
 - Xylol (12 Minuten)
 - 100%iger Alkohol (5 Sekunden)
 - Schnitte zur Fixierung antrocknen lassen
2. Hemmung der endogenen Peroxidase in 1%igem H₂O₂-Methanol (25 Minuten)

3 - Material und Methoden

3. Fortsetzung der Entparaffinierung in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 70 %, Aqua dest.; jeweils 5 Sekunden)
4. Demaskierung:
 - Für den Nachweis von **BDVp24** und **BDVp38** sind keine Demaskierungsschritte erforderlich
 - Für den Nachweis von **Olig2**:
Inkubation der Schnitte in Citratpuffer im Dampfgerar (20 Minuten) (hitzeinduzierte Epitopdemaskierung)
5. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
6. Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen:
 - Für den Nachweis von **BDVp24** und **BDVp38** erfolgt die Vorinkubation mit 1 : 100 in PBSA verdünntem Pferde-Normalserum (**P-NS**), 300 µl / Schnitt, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (30 Minuten)
 - Für den Nachweis von **Olig2** erfolgt die Vorinkubation mit 1 : 100 in PBSA verdünntem Ziegen-Normalserum (**Z-NS**), 300 µl / Schnitt, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (30 Minuten)
7. Normalserum abkippen, nicht spülen
8. Auftragen von 100 µl des Primärantikörpers entsprechend der in der Tabelle angegebenen Verdünnung (Negativkontrolle: 100 µl PBSA), Abdeckung mit Parafilm

Primärantikörper	Verdünnung
BDV p24	1 : 100
BDV p38	1 : 500
Olig2	1 : 50

9. Inkubation der Schnitte bei 4° C im Kühlschrank (24 Stunden)
10. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
11. Auftragen von 100 µl des Sekundärantikörpers:

- Für den Nachweis von **BDVp24** und **BDVp38**:
biotinylierter **Pferd-anti-Maus** AK, rattenabsorbiert, in einer Verdünnung von 1 : 50 mit PBSA, Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (45 Minuten)
 - Für den Nachweis von **Olig2**:
biotinylierter **Ziege-anti-Kaninchen** AK in einer Verdünnung von 1 : 100 mit PBSA, Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in feuchter Kammer bei Raumtemperatur (45 Minuten)
12. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
 13. Auftragen von 100 µl der gebrauchsfertigen **AP-Lösung**, Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in dunkler feuchter Kammer bei Raumtemperatur (45 Minuten)
 14. Fünfmaliges Waschen der Schnitte in Tween-Puffer
 15. Auftragen von 100 µl der frisch angesetzten **Fast Red-Chromogen-Lösung**, zur Blockierung der endogenen alkalischen Phosphatase wird dem Chromogen vor Zugabe der Chromogen-Komponenten Levamisol zugesetzt, Abdeckung mit Parafilm, Inkubation in dunkler feuchter Kammer bei Raumtemperatur (20 Minuten)
 16. Schnitte in Aqua dest. überführen
 17. Einmaliges Waschen in Aqua dest.
 18. Schnitte in **Hämalaun (für IHC)** gegenfärben (4 Minuten)
 19. Bläuen unter fließendem Leitungswasser (3 Minuten)
 20. Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Xylol; jeweils 5 Sekunden)
 21. Maschinelles Eindecken der Schnitte mit Hilfe eines Eindeckautomaten (Leica, CV 5030)

Zum Nachweis der Kolokalisation verschiedener Antigene kommen Doppelfärbungen zum Einsatz. Zum Nachweis einer BDV-Infektion von Oligodendrozyten wurden immunhistochemische Färbungen von **Olig2** mit **BDVp38** bzw. **BDVp24** kombiniert. Die

Visualisierung des ersten Antikörpers erfolgte nach der ABC-Methode mit DAB. In einem weiteren Schritt wurden die Schnitte nach der LSAB-Methode mit Fast Red auf den zweiten Antikörper hin untersucht. BDV-positive Oligodendrozyten stellen sich hierdurch in einer braun-roten Mischfarbe dar. Die beiden immunhistochemischen Verfahren wurden nacheinander angewendet. **Tabelle 3-9** und **Tabelle 3-10** geben hierzu eine Übersicht. Die Reihenfolge der immunhistochemischen Färbungen variiert in beiden Verfahren.

**Tabelle 3-9: Immunhistochemischen Doppelmarkierungstechnik I:
BDVp24 / BDVp38 (DAB) und Olig2 (Fast Red)**

VORGANG	REAGENZ	ZEIT
Entparaffinierung	absteigende Alkoholreihe	wie unter 3.5.2 beschrieben
Blockierung Peroxidase	H ₂ O ₂ -Methanol (1%ig)	25 Minuten
Blocking-Serum	P-NS (1 : 100)	30 Minuten
1. Primärantikörper	BDVp24 (1 : 100) bzw. BDVp38 (1 : 500)	24 Stunden bei 4° C
TAG 2		
1. Sekundärantikörper	Pferd-anti-Maus, biotinyliert, rattenabsorbiert (1 : 50)	30 Minuten
1. Tertiärreagenz	ABC	1 Stunde
1. Chromogen	DAB	einige Sekunden, dann von Aqua. dest. in Tween-Puffer
Abstoppen der 1. IHC	Double Stain Block	3 Minuten
Demaskierung	Citratpuffer im Dampfgerar	20 Minuten
Blocking-Serum	Z-NS (1 : 100)	30 Minuten
2. Primärantikörper	Olig2 (1 : 50)	24 Stunden bei 4° C
TAG 3		
2. Sekundärantikörper	Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert (1 : 100)	45 Minuten
2. Tertiärreagenz	AP	45 Minuten
2. Chromogen	Fast Red	20 Minuten, dann in Aqua dest.
Gegenfärben	Hämalaun (für IHC)	4 Minuten
Bläuen	Leitungswasser	3 Minuten
Entwässern	aufsteigende Alkoholreihe	jeweils kurz eintauchen
Eindecken	maschinell (Leica, CV 5030)	

Tabellarische Darstellung der immunhistochemischen Doppelfärbung; die beiden Antigene werden nacheinander immunhistochemisch markiert; Vorgänge der ersten IHC sind braun markiert; Vorgänge der zweiten IHC sind rot markiert

**Tabelle 3-10: Immunhistochemischen Doppelmarkierungstechnik II:
Olig2 (DAB) und BDVp24 / BDVp38 (Fast Red)**

VORGANG	REAGENZ	ZEIT
Entparaffinierung	absteigende Alkoholreihe	wie unter 3.5.2 beschrieben
Blockierung Peroxidase	H ₂ O ₂ -Methanol (1%ig)	25 Minuten
Demaskierung	Citratpuffer im Dampfgerar	20 Minuten
Blocking-Serum	Z-NS (1 : 100)	30 Minuten
1. Primärantikörper	Olig2 (1 : 50)	24 Stunden bei 4° C
TAG 2		
1. Sekundärantikörper	Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert (1 : 100)	30 Minuten
1. Tertiärreagenz	ABC	1 Stunde
1. Chromogen	DAB	einige Sekunden, dann von Aqua. dest. in Tween-Puffer
Abstoppen der 1. IHC	Double Stain Block	3 Minuten
Blocking-Serum	P-NS (1 : 100)	30 Minuten
2. Primärantikörper	BDVp24 (1 : 100) bzw. BDVp38 (1 : 500)	24 Stunden bei 4° C
TAG 3		
2. Sekundärantikörper	Ziege-anti-Maus, biotinyliert, rattenabsorbiert (1 : 50)	45 Minuten
2. Tertiärreagenz	AP	45 Minuten
2. Chromogen	Fast Red	20 Minuten, dann in Aqua dest.
Gegenfärben	Hämalaun (für IHC)	4 Minuten
Bläuen	Leitungswasser	3 Minuten
Entwässern	aufsteigende Alkoholreihe	jeweils kurz eintauchen
Eindecken	maschinell (Leica, CV 5030)	

Tabellarische Darstellung der immunhistochemischen Doppelfärbung; die beiden Antigene werden nacheinander immunhistochemisch markiert; Vorgänge der ersten IHC sind braun markiert; Vorgänge der zweiten IHC sind rot markiert

3.6 Auswertung der Färbungen

3.6.1 HE-Färbung

Die HE-Färbung diente als Übersichtsfärbung, die nach folgenden Kriterien ausgewertet wurde:

Bei der HE-Färbung wurde besonders auf das Vorhandensein perivaskulärer mononukleärer Infiltrate innerhalb des ZNS-Gewebes geachtet. Die Protokollierung erfolgte unter Angabe von Anzahl, Größe sowie Lokalisation der Infiltrate. Der Schweregrad entzündlicher Reaktionen wurde unter Berücksichtigung von Anzahl und Größe der entzündlichen Infiltrate semiquantitativ eingeschätzt.

Im Hinblick auf die Fragestellung in dieser Arbeit wurden Vakuolisierungen der weißen Substanz ebenfalls protokolliert und zusammen mit den Befunden der SSW- und MBP-Färbungen bewertet.

Tötungsbedingte histologische Veränderungen sowie Veränderungen, die im Rahmen der Aufarbeitung des Gewebes entstanden sind, wurden nicht in die Bewertung einbezogen. Eine generalisierte leichte Hyperämie in Form von weiten Gefäßen mit intraluminalen Erythrozytenansammlungen sowie Vakuolisierungen des Gewebes ohne zelluläre Reaktionen wurden dementsprechend als unspezifisch angesehen.

Abweichungen von der Schnittebene sowie fehlende Gehirnanteile wurden protokolliert. Bei deutlichen Abweichungen wurde die Färbung wiederholt.

3.6.2 KV-Färbung

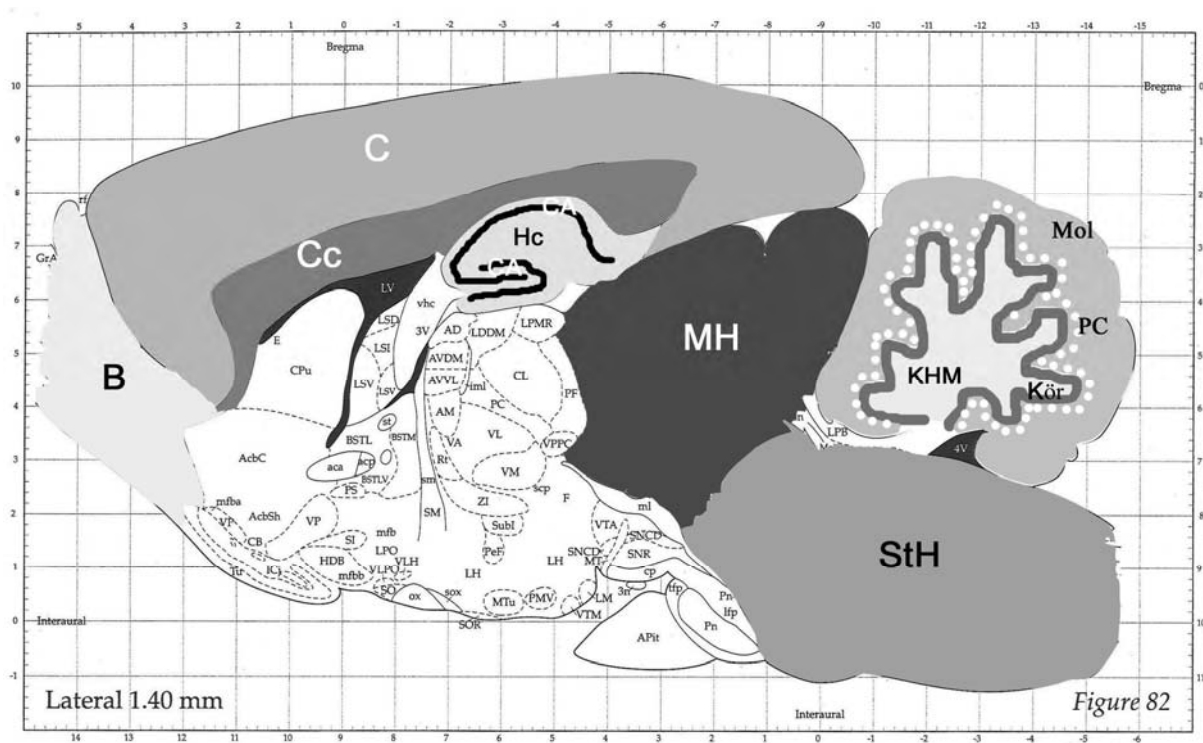
In der KV-Färbung stellen sich Neuronenzellkörper aufgrund ihres hohen Gehaltes an Nissl-Substanz deutlich dar. Daher diente diese Färbung vorwiegend der Einschätzung der Purkinje-Zelldichte. Zellkörper von Purkinje-Zellen erscheinen in dieser Färbung dunkelviolett und lassen sich daher besonders gut vom umgebenden Gewebe unterscheiden. Die Purkinje-Zelldichte wurde im mikroskopischen Vergleich mit Kontrolltieren bewertet und - wegen der Schwierigkeit einer exakten Quantifizierung - in lediglich zwei Kategorien eingeteilt: reduzierte Purkinje-Zelldichte sowie altersabhängig physiologische Purkinje-Zelldichte.

3.6.3 p24 und p38-Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des Phosphoproteins P (p24) und des Nukleoproteins N (p38) erfolgte für jedes Antigen getrennt nach einem einheitlichen Bewertungsprotokoll.

Zur Charakterisierung des Verteilungsmusters der BDV-Proteine im ZNS wurde das Gehirn in elf Regionen unterteilt (Abbildung 3-2).

Abbildung 3-2: Elf untersuchte Gehirnregionen für die Auswertung der p24- und p38-Immunhistochemie



Modifiziert aus: PAXINOS und WATSON, 1998

B = Bulbus olfactorius; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; Hc = Hippocampus (außer Neuronen der CA-Felder und des Gyrus dentatus); CA = CA-Felder; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KHM = Kleinhirnmark; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; PC = Purkinje-Zellschicht; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns

Die gewählten Regionen berücksichtigen auch schichtenspezifische Unterschiede innerhalb eines anatomisch definierten Bezirks, um auf den Zelltyp der infizierten Zellen schlussfolgern

zu können. Im Hippocampus wurde unterschieden zwischen den neuronalen Zellen der CA-Felder und des Gyrus dentatus (CA) und den restlichen Zellen (Hc). Das Kleinhirn wurde aufgrund des schichtenspezifischen Aufbaus in vier Subregionen unterteilt: Kleinhirnmantel (KHM), Körnerzellschicht (Kör), Purkinje-Zellschicht (PC) und Molekularschicht (Mol).

Eine Quantifizierung der viralen Proteine erfolgte für jede Gehirnregion getrennt. In jedem Areal wurde bei 400facher Vergrößerung in zwei bis drei repräsentativen Gesichtsfeldern der Prozentsatz p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl durch Auszählung ermittelt. Der Mittelwert der Prozentsätze aus den drei Zählfeldern wurde angegeben. Bezogen auf die Zellkompartimente wurde zwischen einer nukleären, einer zytoplasmatischen und einer gesamtzellulären Lokalisation virusspezifischer Proteine unterschieden.

3.6.4 ED1-Immunhistochemie

ED1 ist ein phagolysosomales Antigen, das sowohl von Makrophagen als auch phagozytisch aktivierter Mikroglia exprimiert wird (DIJKSTRA *et al.*, 1985; FLARIS *et al.*, 1993). Zwar ist eine Unterscheidung dieser beiden Zelltypen immunhistochemisch nicht möglich, jedoch sind weitere Kennzeichen für aktivierte Mikroglia eine Proliferation und eine Veränderung der Zellform von einer ramifizierten Zellmorphologie zu einer amöboid-rundlichen Zellform (DAVIS *et al.*, 1994). OVANESOV *et al.* konnten demonstrieren, dass ED1 als verlässlicher Marker für BDV-aktivierte Mikroglia einsetzbar ist, da ED1⁺ mikrogliale Zellen sich im Vergleich zu Kontrolltieren überwiegend bei neonatal BDV-infizierten Ratten fanden (2008). Es wurden ED1⁺ Zellen in folgenden Gehirnregionen gezählt: **Bulbus (B)**, **Cortex (C)**, **Corpus callosum (Cc)**, **Mittelhirn (MH)**, **Stammhirn (StH)**, **Kleinhirn (KH)**. In jeder Region wurden ED1⁺ Zellen in drei repräsentativen Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Hierbei wurden nur Zellen mit einem eindeutig erkennbaren Zelleib und/oder Zellkern berücksichtigt. Der Mittelwert aus den drei Gesichtsfeldern wurde protokolliert und nach einem Bewertungsschlüssel semiquantitativ eingeordnet. Infiltrat-assoziierte ED1⁺ Zellen wurden aufgrund ihrer Lokalisation als Makrophagen angesprochen. Die Zählung erfolgte in diesem Fall ebenfalls nach den beschriebenen Kriterien unter Angabe der semiquantitativen Einordnung außerhalb und innerhalb der Infiltrate.

3.6.5 CD45RC- und CD8-Immunhistochemie

Die CD45RC- und CD8-Immunhistochemie dienen der Charakterisierung entzündlicher Infiltratzellen. CD45 wird auch als „leucocyte-common antigen“ (L-CA) bezeichnet, da es als Oberflächenmolekül von allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Es handelt sich bei dem CD45-Molekül um ein Glykoprotein mit Protein-Tyrosin-Phosphataseaktivität, welches sich aus einer hochkonservierten zytoplasmatischen Komponente und einer variablen externen Domäne zusammensetzt (CHAN *et al.*, 1994; TROWBRIDGE und THOMAS, 1994). Durch alternatives Spleißen der variablen Exons entstehen unterschiedliche Isoformen des CD45-Moleküls, die unterschiedliche Leukozyten-Subpopulationen charakterisieren (WOOLLETT *et al.*, 1985). Der in der vorliegenden Studie verwendete monoklonale Antikörper MRC-OX22, der sich an die Isoform CD45RC bindet, erkennt alle B-Lymphozyten, alle CD8⁺ T-Lymphozyten sowie ca. 2/3 der CD4⁺ T-Lymphozyten (SPICKETT *et al.*, 1983; WOOLLETT *et al.*, 1985).

Das Glykoprotein CD8 ist ein Heterodimer aus α - und β -Ketten, die durch eine Disulfidbrücke kovalent gebunden sind. CD8 ist ein spezieller Co-Rezeptor für MHC-Klasse-I-Moleküle und wird vorwiegend auf zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert (BRIDEAU *et al.*, 1980).

Die immunhistochemische Untersuchung zum Nachweis von CD45RC⁺ Zellen wurde bei allen Tieren durchgeführt. Eine Untersuchung auf CD8⁺ T-Zellen entfiel bei Tieren, die bereits in der CD45RC-Immunhistochemie unauffällig waren, da CD8⁺ Zellen immer CD45RC-positiv reagieren.

Die Auswertung der beiden Färbungen berücksichtigt perivaskuläre, parenchymatöse sowie meningeale Zellen. Alle im Hirnschnitt vorhandenen Infiltrate wurden ausgezählt. Der prozentuale Anteil CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl wurde für jedes Infiltrat angegeben. CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen im Parenchym sowie meningeale CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen wurden semiquantitativ in vier Kategorien eingeordnet: negativ (-), vereinzelt (+), mäßig (++), vermehrt (+++).

3.6.6 Olig2-Immunhistochemie

Olig2 ist ein oligodendrozytenspezifischer Transkriptionsfaktor, der sowohl in prämaturen als auch in adulten Oligodendrozyten exprimiert wird (LU *et al.*, 2000; TAKEBAYASHI *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2000; TEKKI-KESSARIS *et al.*, 2001; YOKOO *et al.*, 2004). Aufgrund der hohen Oligodendrozytenzahlen im Corpus callosum wurde diese Region zur Bewertung von Zahl, Morphologie und Verteilungsmuster der Oligodendrozyten ausgewählt.

Morphologische Auffälligkeiten wie Zellschwellungen, Kondensation des Zellkerns und Zytoplasmas, Veränderungen der Kernstruktur und Zellpyknose innerhalb des Corpus callosum wurden lichtmikroskopisch erfasst und protokolliert. In zwei bis drei repräsentativen Gesichtsfeldern wurden anschließend die Oligodendrozyten gezählt und der Mittelwert angegeben.

3.6.7 SSW-Färbung und MBP-Immunhistochemie

Diese beiden Färbungen dienen in erster Linie der Bewertung der Myelinstruktur. Die Sudanschwarz-Färbung ist eine Standardmyelinfärbung, in der das lipophile Myelin schwarzviolett dargestellt wird. Aufgrund des hohen Kontrasts wurde diese Färbung eingesetzt, um intrazelluläre Myelinbestandteile in Makrophagen darzustellen. MBP ist ein Hauptvertreter in der Gruppe der Myelinproteine. Die MBP-Immunhistochemie gilt daher als sensitives Verfahren, mit dem sowohl die Feinstruktur der Myelinfasern als auch die Quantität der Myelinsubstanz anhand der Farbintensität bewertet werden kann (HASEGAWA *et al.*, 1992). Grundlage für die Auswertungskriterien in der vorliegenden Arbeit waren unter anderem die im etablierten Modell der entorhinalen Cortexläsion beschriebenen Veränderungen der Myelinarchitektur, die eine Unterscheidung zwischen pathologischem und physiologischem Myelin ermöglicht (MEIER *et al.*, 2004; MEIER, 2006). Die Beurteilung der Feinstruktur einzelner myelinisierter Fasern ist in Gehirnregionen mit einer hohen Dichte myelinisierter Fasern lichtmikroskopisch nicht möglich. Der Myelinisierungsgrad in Kleinhirnmark und Corpus callosum kann jedoch anhand der Farbintensität nach MBP-Immunhistochemie quantifiziert werden (HAMANO *et al.*, 1996).

Der Bewertungsschlüssel zur Charakterisierung der Myelinisierung wurde auf der Basis dieser Studien erstellt. Hierbei wurden sowohl die Kontinuität der myelinisierten Axone, die

Dicke der einzelnen Fasern als auch Kennzeichen für pathologisches Myelin wie perlschnurartige Auftreibungen der Axone berücksichtigt (MEIER *et al.*, 2004; MEIER, 2006). In Regionen mit hohem Myelingeht, zu denen das Corpus callosum sowie das Kleinhirnmark zählen, wurde die Myelinisierung semiquantitativ anhand der Farbintensität kategorisiert. Der Bewertungsschlüssel für die MBP-Immunhistochemie kann **Tabelle 4-18** entnommen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Daten

Die Daten zu Infektionsdosis, Infektionsmodus, Alter und Geschlecht der Tiere sowie klinische Befunde, BDV-PCR-Ergebnisse und -Antikörpertiter wurden vom Friedrich-Loeffler-Institut zur Verfügung gestellt.

Die klinischen Daten beinhalten im Einzelnen neurologische Symptome, Verhaltensauffälligkeiten sowie den körperlichen Entwicklungszustand (Allgemeinzustand, Körpergröße) der infizierten Tiere und – sofern vorhanden – nicht infizierter Wurfgeschwister (Sentinels). Zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. wurden Blutproben entnommen zum Nachweis von p24-RNA in PBMC's mittels PCR sowie zum Nachweis von BDV-spezifischen Antikörpern mittels ELISA.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in **Tabelle 4-1** sortiert nach Wurf aufgeführt. In dieser Tabelle wurden klinisch unauffällige Befunde und negative Laborergebnisse (negative PCR, negative Antikörpertiter) **grün** markiert. Gering- bis mittelgradige klinische Auffälligkeiten und Antikörpertiter zwischen 40 und 640 wurden **gelb** gekennzeichnet, schwerwiegende klinische Befunde bzw. positive Laborergebnisse (positive PCR, Antikörpertiter > 640) wurden **rot** markiert. Tiere, die in der Immunhistochemie auf Bornaspezifische Antigene (**Kapitel 4-4**) negativ reagierten, wurden **grün** hervorgehoben.

Tabelle 4-1: Klinische Daten

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Geschlecht	Klinische Befunde	PCR	AK 1	AK 2
0 Mutter	-	105	w	50 Tage nach Infektion der Jungtiere verstorben	n.d.	160	n.d.
0 NBAE.1	500	310	m	verhaltensauffällig	pos	40/80	< 40
0 NBAE.2	500	310	w	schwer geschädigt, mager, ataktisch	pos	1280	1280
0 NBAE.3	500	310	w	verhaltensauffällig, leichte Ataxie, leichte Kopfschiefhaltung	pos	2500	1280

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-1: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Geschlecht	Klinische Befunde	PCR	AK 1	AK 2
0 NBAE.4	500	690	m	o.b.B.	pos	< 40	< 40
0 NBAE.6	500	310	w	verhaltensauffällig	pos	2500	2500
VI NBAE.1	200	110	m	leichte Kopfschiefhaltung	pos	2500	2500
VI NBAE.2	200	110	m	o.b.B.	pos	1280	2500
VI NBAE.3	200	110	w	reduzierte Körpergröße	n.d.	1280	2500
VI NBAE.4	200	110	w	n.d.	pos	< 40	< 40
VII NBAE.1	200	110	w	reduzierte Körpergröße.	pos	< 40	< 40
VII NBAE.2	200	110	w	o.b.B.	neg	< 40	< 40
VII NBAE.3	200	110	w	reduzierte Körpergröße.	pos	1280	1280
VII NBAE.4	200	110	w	verhaltensauffällig, leichter Opisthotonus	neg	160	160
VII NBAE.5	200	110	m	o.b.B.	pos	< 40	< 40
VII NBAE.6	200	110	m	mager, schlechter Allgemeinzustand	pos	160-320	80
VII NBAE.7	200	110	m	mäßiger Allgemeinzustand	neg	< 40	< 40
VII S.8	-	110	m	o.b.B.	pos	< 40	< 40
VII S.9	-	110	m	o.b.B.	pos	< 40	< 40
VIII NBAE.3	400	450	m	o.b.B.	pos	< 40	n.d.
VIII NBAE.7	400	90	w	verhaltensauffällig	pos	160	160
IX NBAE.3	400	90	w	verhaltensauffällig	pos	2500-5000	5000
IX NBAE.4	400	740	w	verhaltensauffällig, leichte Kopfschiefhaltung	n.d.	320	< 40
X NBAE.1	400	90	w	o.b.B.	pos	< 40	< 40
X NBAE.4	400	90	w	reduzierte Körpergröße	pos	2500	2500

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-1: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Geschlecht	Klinische Befunde	PCR	AK 1	AK 2
X S.5	-	90	w	n.d.	pos	n.d.	n.d.
11 Mutter	-	270	w	viereinhalb Monate nach Infektion der Jungtiere verstorben	neg	640	n.d.
11 NBAE.1	500	11	w	n.d.	pos	n.d.	n.d.
11 NBAE.11	500	640	m	verhaltensauffällig	n.d.	< 40	< 40
12 NBAE.1	500	7	m	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19 NBAE.1	1000	28	m	o.b.B.	n.d.	n.d.	n.d.
19 NBAE.2	1000	28	m	o.b.B.	n.d.	n.d.	n.d.
19 NBAE.3	1000	28	w	o.b.B.	n.d.	n.d.	n.d.
19 NBAE.4	1000	28	w	o.b.B.	n.d.	n.d.	n.d.
19 NBAE.5	1000	28	w	o.b.B.	n.d.	n.d.	n.d.

Dosis in µl (10^6 ffu/ml); d = Tage; w = weiblich; m = männlich; o.b.B. = ohne besonderen Befund; n.d. = nicht durchgeführt; pos = positiv; neg = negativ

grün = BDV-negative Tiere / keine klinischen Symptome / negative PCR / AK-Titer < 40

gelb = leichte bis mittelgradige klinische Symptome / AK-Titer zwischen 40 und 640

rot = schwere Krankheitssymptome / positive PCR / AK-Titer > 640

Klinische Befunde:

Von den 30 NBAE-Tieren wurden 27 Tiere klinisch untersucht. Zwei der 27 untersuchten NBAE-Tiere erwiesen sich hinterher als BDV-negativ (d.h. sie zeigten in der BDV-Immunhistochemie keine angefärbten Zellen, **Kapitel 4-4**), daher wurden diese Tiere nicht in die Bewertung einbezogen, um das Gesamtbild nicht zu verfälschen (X NBAE.1, 19 NBAE.4). Diese Tiere waren beide klinisch unauffällig.

Neun BDV-positive Tiere (9/25) waren klinisch unauffällig (0 NBAE.4, VI NBAE.2, VII NBAE.2, VII NBAE.5, VIII NBAE.3, 19 NBAE.1, 19 NBAE.2, 19 NBAE.3, 19 NBAE.5).

Zehn NBAE-Tiere (10/25) hatten neurologische Symptome (*0 NBAE.1, 0 NBAE.2; 0 NBAE.3, 0 NBAE.6, VI NBAE.1, VII NBAE.4, VIII NBAE.7, IX NBAE.3, IX NBAE.4, 11 NBAE.11*). Die Antikörper-Titer waren bei diesen Tieren größtenteils positiv (9/10).

Sechs NBAE-Tiere (6/25) waren kleiner als ihre Wurfgeschwister (*VI NBAE.3, VII NBAE.1, VII NBAE.3, VII NBAE.6, VII NBAE.7, X NBAE.4*).

Die zwei untersuchten Sentinels aus der Wurfgruppe VII (*VII S.8, VII S.9*) waren klinisch unauffällig und seronegativ. Bei beiden Tieren fiel die PCR positiv aus.

PCR-Ergebnisse:

Von den 30 NBAE-Tieren wurde bei 21 Tieren eine BDV-PCR durchgeführt (21/30). Zu den getesteten NBAE-Tieren gehörten wiederum zwei Tiere, bei denen kein BDV-Antigen im Gehirn nachgewiesen werden konnte. Sie wurden daher aus der Bewertung ausgeschlossen (*VI NBAE.4, X NBAE.1*). Das Ergebnis der Blut-PCR war bei beiden Tieren positiv.

Ein negatives PCR-Ergebnis hatten drei BDV-positive NBAE-Tiere (3/19). Alle drei NBAE-Tiere mit negativem PCR-Befund stammten aus der Wurfgruppe VII (*VII NBAE.2, VII NBAE.4, VII NBAE.7*). Zwei NBAE-Tiere mit negativem PCR-Ergebnis hatten außerdem keine klinischen Symptome und keine BDV-spezifischen Antikörper.

Alle 16 weiteren getesteten NBAE-Tiere (16/19) sowie die zwei getesteten Sentinels aus der Wurfgruppe VII (*VII S.8, VII S.9*) hatten eine positive PCR.

Antikörper-Titer:

Serologisch hinsichtlich BDV getestet wurden 23 NBAE-Tiere (23/30), zwei Sentinels sowie zwei Mütter.

Sieben NBAE-Tiere (7/21) waren serologisch negativ (*0 NBAE.4, VII NBAE.1, VII NBAE.2, VII NBAE.5, VII NBAE.7, VIII NBAE.3, 11 NBAE.11*).

Zwei Tiere (2/21) zeigten eine Serokonversion von mittelgradig erhöhten Titern zu negativen Titern in der zweiten Testung (*0 NBAE.1, IX NBAE.4*).

Zwölf NBAE-Tiere (12/21) reagierten seropositiv (*0 NBAE.2, 0 NBAE.3, 0 NBAE.6, VI NBAE.1, VI NBAE.2, VI NBAE.3, VII NBAE.3, VII NBAE.4, VII NBAE.6, VIII NBAE.7, IX*

4 - Ergebnisse

NBAE.3, X NBAE.4). Hiervon hatten neun Tiere (9/21) Titer mit Werten von 1280 oder höher. Acht Tiere (8/21) zeigten gleichzeitig ein positives PCR-Ergebnis, das neunte Tier wurde nicht getestet.

Die zwei getesteten Sentinels (VII S.8, VII S.9) waren serologisch negativ. Die Mütter hatten Antikörper-Titer von 160 (0 Mutter) bzw. 640 (11 Mutter).

Tabelle 4-2: Korrelation zwischen klinischen und Laborbefunden bei NBAE-Tieren

Klinik	Anzahl	AK neg	AK pos	PCR neg	PCR pos
o.b.B.	9 (9/25)	4 (4/5)	1 (1/5)	1 (1/5)	4 (4/5)
verhaltensauffällig	10 (10/25)	1 (1/10)	9 (9/10)	1 (1/8)	7 (7/8)
Körpergröße ↓	6 (6/25)	2 (2/6)	4 (4/6)	1 (1/5)	4 (4/5)

neg = negativ; pos = positiv; o.b.B. = ohne besonderen Befund

Tabelle 4-3: Kontrolltiere

Tier	Dosis	Alter (d)	Geschlecht	Klinische Befunde	PCR	AK 1	AK 2
Lewis NL-1	-	30	w	o.b.B.	neg	< 40	n.d.
Lewis NL-2	-	30	w	o.b.B.	neg	< 40	n.d.
Lewis NL-3	-	30	w	o.b.B.	neg	< 40	n.d.
Lewis NL-4	-	30	m	o.b.B.	neg	< 40	n.d.
BDV neg 4 Wo	-	28	m	o.b.B.	neg	< 40	n.d.
BDV neg 6 Wo	-	42	w	o.b.B.	neg	< 40	n.d.
BDV neg 8 Wo	-	56	m	o.b.B.	neg	< 40	n.d.

d = Tage; w = weiblich; m = männlich; o.b.B. = ohne besonderen Befund; neg = negativ; n.d. = nicht durchgeführt

grün = keine Krankheitssymptome / negative PCR / AK-Titer < 40

Die Kontrolltiere waren in allen drei Kriterien unauffällig (**Tabelle 4-3**).

4.2 HE-Färbung

Die HE-Färbung erlaubt einen guten Überblick über pathomorphologische Veränderungen des Hirngewebes. Sie diene in erster Linie zur Erkennung von Entzündungszeichen.

Unspezifische histologische Veränderungen, die im Rahmen der Aufarbeitung des Gewebes oder tötungsbedingt entstanden sind, fanden sich sowohl bei den BDV infizierten als auch bei den nicht infizierten Kontrolltieren (nicht dargestellt). Typisch war eine generalisierte Hyperämie mit weiten Gefäßen und intraluminalen Erythrozytenansammlungen. Zum Teil fand sich auch eine Vakuolisierung in der weißen Hirnsubstanz im Kleinhirn, Stammhirn und Corpus callosum. Diese Veränderungen wurden anschließend mithilfe der SSW-Färbung sowie der MBP-Immunhistochemie genauer untersucht (**Kapitel 4.8**).

Perivaskuläre Infiltrate sowie Meningitiden fanden sich bei sieben NBAE-Tieren (*VII NBAE.4, VII NBAE.7, X NBAE.4, 19 NBAE.1, 19 NBAE.2, 19 NBAE.3, 19 NBAE.5*) sowie bei beiden Muttertieren (*0 Mutter, 11 Mutter*). Der Entzündungsgrad wurde anhand der Beschaffenheit der Infiltrate (Anzahl, Größe, Anzahl der Zellschichten) als auch anhand der meningealen zellulären Reaktion bewertet. Die Gradeinteilung der Meningoenzephalitis erfolgte nach den in **Tabelle 4-4** aufgezeigten Kriterien.

Tabelle 4-4: Gradeinteilung der Meningoenzephalitis in der HE-Färbung

Grad	Kriterien
–	keine Infiltrate
+	ein bis drei perivaskuläre Infiltrate im gesamten Hirnschnitt bestehend aus ein bis zwei Zellschichten, vereinzelt mononukleäre Zellen in den Meningen
++	vier bis sieben perivaskuläre Infiltrate im gesamten Hirnschnitt, vorwiegend mehrschichtig, mittelgradige Meningitis
+++	mehr als sieben mehrschichtige perivaskuläre Infiltrate im gesamten Hirnschnitt, hochgradige Infiltration der Meningen mit mononukleären Zellen

Anhand der Gradeinteilung ergab sich folgendes Bild: Beide Mütter zeigten eine hochgradige Meningoenzephalitis (*0 Mutter, 11 Mutter*). Vier der fünf 28 Tage alten NBAE-Tiere sowie

4 - Ergebnisse

zwei 110 Tage alte NBAE-Tiere aus der Wurfgruppe VII, die mit einer Dosis von 200 µl infiziert wurden, zeigten ebenfalls deutliche Entzündungszeichen (*19 NBAE.1, 19 NBAE.2, 19 NBAE.3, 19 NBAE.5, VII NBAE.4, VII NBAE.7*). Ein Tier aus der Wurfgruppe X zeigte nur sehr kleine Infiltrate in eng umschriebenen Lokalisationen in Bulbus olfactorius, Cortex und Mittelhirn (*X NBAE.4*). Insgesamt fiel auf, dass das Kleinhirn bei den Tieren mit Meningoenzephalitis häufig frei von Infiltraten war. Alle Daten sind in **Tabelle 4-5** zusammengefasst. Alle nicht genannten Tiere zeigten in der HE-Färbung keine Entzündungszeichen.

Tabelle 4-5: Tiere mit Meningoenzephalitis (HE-Färbung)

Tier	Dosis	Alter	Bemerkungen	Grad
0 Mutter	–	105	–	+++
11 Mutter	–	270	<u>keine</u> Infiltrate im Kleinhirn	+++
VII NBAE.4	200	110	<u>keine</u> Infiltrate in Stammhirn und Kleinhirn	+++
VII NBAE.7	200	110	<u>keine</u> Infiltrate im Kleinhirn	+++
X NBAE.4	400	90	wenige ein- bis zweischichtige Infiltrate in Bulbus olfactorius, Cortex und Mittelhirn	+
19 NBAE.1	1000	28	<u>keine</u> Infiltrate im Kleinhirn	+++
19 NBAE.2	1000	28	–	+++
19 NBAE.3	1000	28	–	+++
19 NBAE.5	1000	28	<u>keine</u> Infiltrate im Kleinhirn	+++

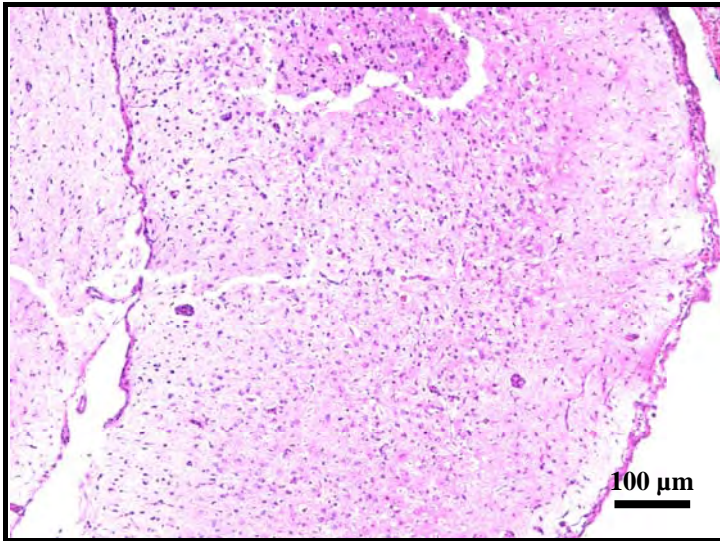


Abbildung 4-1:

Meningoenzephalitis bei einer Mutter, Cortex mit zellulären meningealen Reaktionen sowie perivaskulären Infiltraten
(0 Mutter)

HE-Färbung

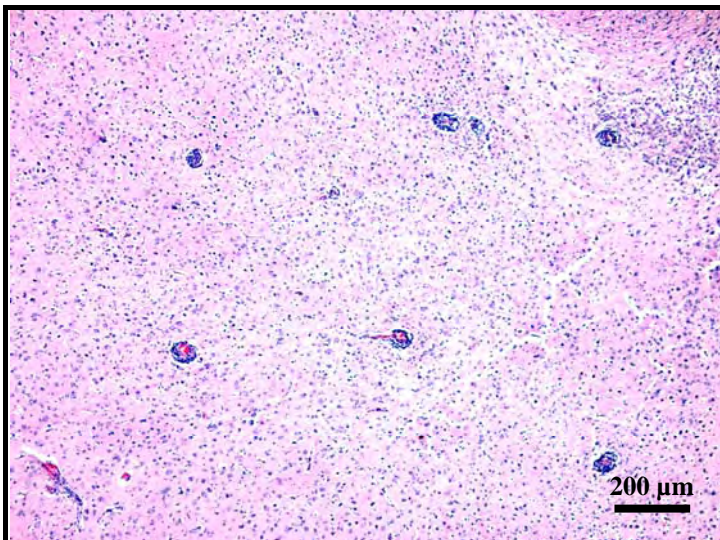


Abbildung 4-2:

Multiple perivaskuläre Infiltrate im Cortex eines NBAE-Tieres
(VII NBAE.7)

HE-Färbung

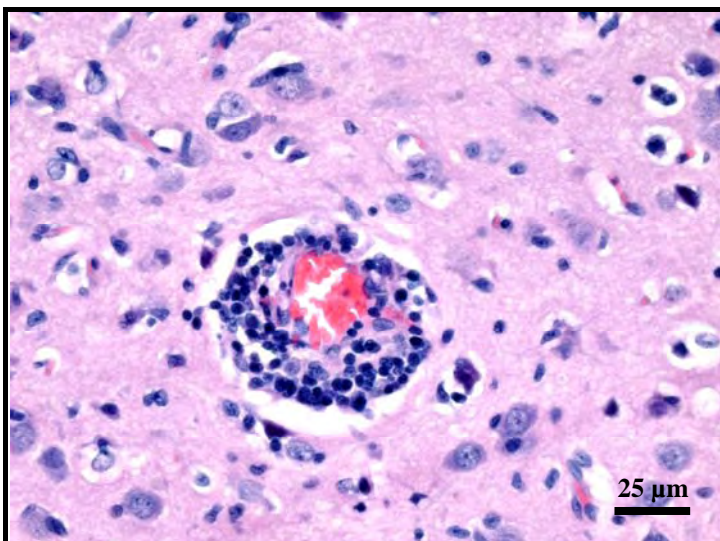


Abbildung 4-3:

Mehrschichtiges mononukleäres perivaskuläres Infiltrat im Cortex eines NBAE-Tieres
(VII NBAE.7)

HE-Färbung

4.3 KV-Färbung

Kresylviolett (KV) färbt endoplasmatisches Retikulum dunkelblau-violett an. Neuronenzellen stellen sich in dieser Färbung aufgrund des hohen Gehalts an Nissl-Substanz kontrastreich dar. Die KV-Färbung diente daher zur Einschätzung der Purkinje-Zelldichte. Bei den sieben bzw. elf Tage alten infizierten Tieren (*11 NBAE.1, 12 NBAE.1*) konnte die Purkinje-Zelldichte nicht bewertet werden, da die Ontogenese des Kleinhirns in diesem Alter noch nicht abgeschlossen ist. Alle 28 Tage alten neonatal aerogen infizierten Lewis Ratten (*19 NBAE.1 - 19 NBAE.5*) hatten verglichen mit den 28 Tage alten Kontrolltieren keine abweichenden Befunde der Purkinje-Zellpopulation. Alle älteren infizierten Tiere bis auf vier Ausnahmen zeigten verglichen mit den Kontrolltieren eine Dezimierung der Purkinje-Zellen (*VI NBAE.4, VII NBAE.2, VII NBAE.7, X NBAE.1*: Purkinje-Zelldichte normal).

Kontrolltiere, Sentinels und Mütter zeigten in der KV-Färbung eine physiologische Purkinje-Zelldichte. Ergebnisse bezüglich der Purkinje-Zelldichte können **Tabelle 4-23** (Gesamtübersicht) entnommen werden.

Abbildungen zur Purkinje-Zelldichte finden sich auf den folgenden Seiten (**Abbildungen 4-4 bis 4-6**).

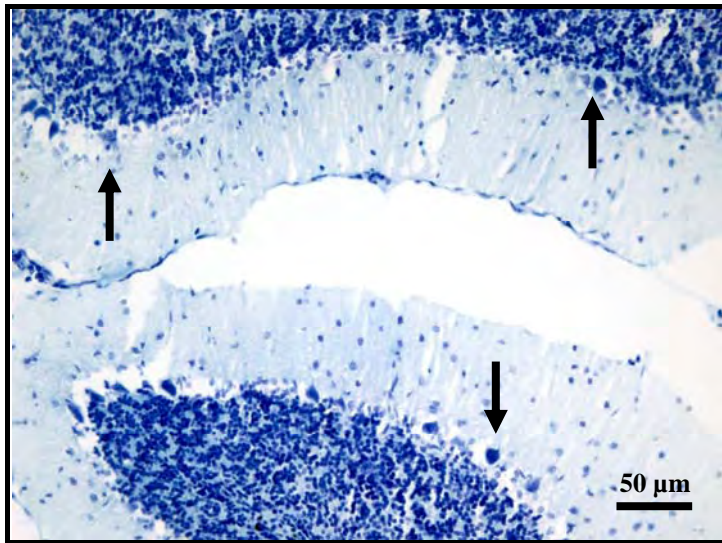


Abbildung 4-4:

Bei diesem NBAE-Tier fanden sich nur ganz vereinzelt Purkinje-Zellen (Pfeile)
(0 NBAE.2)

KV-Färbung

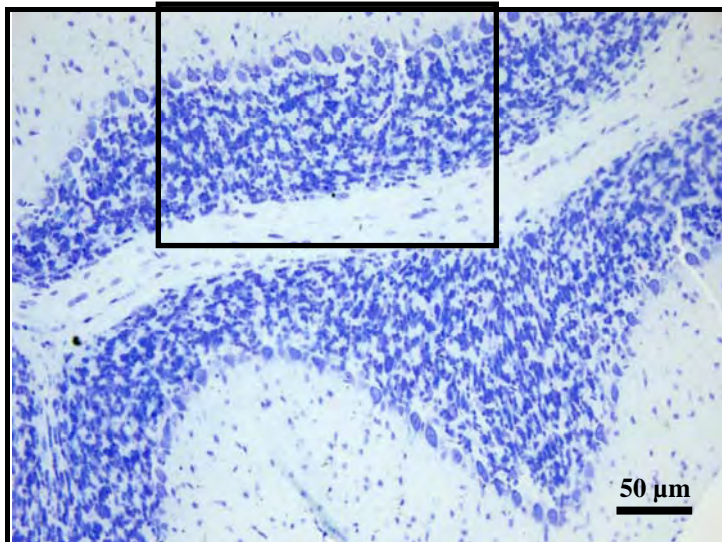


Abbildung 4-5:

Physiologische Purkinje-Zelldichte bei einem Kontrolltier
(BDV neg 6 Wo.)

KV-Färbung

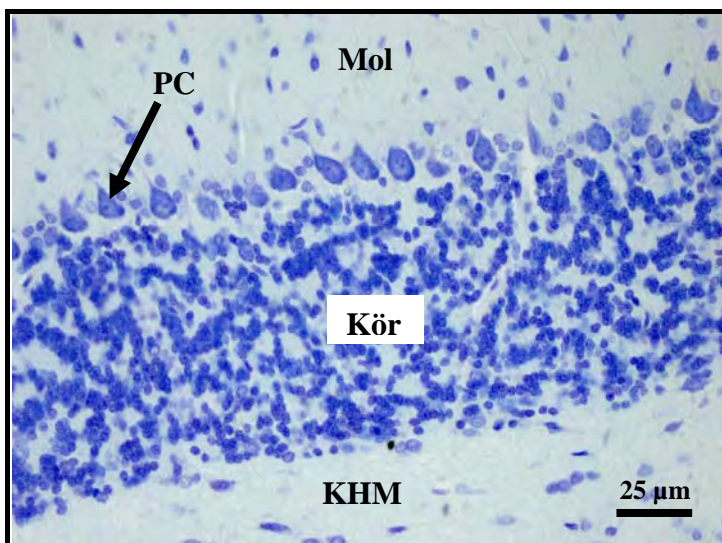


Abbildung 4-6:

Ausschnittvergrößerung aus
Abbildung 4-5
Purkinje-Zellen liegen dicht
aneinander

Mol = Molekularschicht; PC =
Purkinje-Zelle; Kör = Körnerzell-
schicht; KHM = Kleinhirnmark
KV-Färbung

4.4 BDV-Verteilung

Die BDV-Verteilung wurde basierend auf dem immunhistochemischen Nachweis der Proteine p38 (Nukleoprotein N) und p24 (Phosphoprotein P) ausgewertet. Da es in dieser Arbeit schwerpunktmäßig um den Nachweis des BDV in Oligodendrozyten ging, wurde eine Unterteilung des Gehirns in Kompartimente gewählt, die Regionen mit besonders hoher Oligodendrozytendichte wie Corpus callosum und Kleinhirnmark umfassen (**Abbildung 3-2**). In jeder der gewählten Zonen wurden zwei bis drei repräsentative Gesichtsfelder bei einer 400fachen Vergrößerung beurteilt. Der Prozentsatz p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl wurde durch Auszählung ermittelt. Für jede Region wurde der Mittelwert der Prozentsätze aus den untersuchten Gesichtsfeldern angegeben.

Die Tabellen zur BDV-Verteilung wurden in Abhängigkeit von der Infektionsdosis erstellt, um eine mögliche Korrelation der Befunde zur Virusdosis erkennen zu können. Innerhalb der Tabellen wurden die Tiere nach ihrem Alter sortiert. In der oberen Spalte wurden für jedes Tier die Ergebnisse der p38-Immunhistochemie aufgeführt (rosa), in der unteren Spalte die Ergebnisse der p24-Immunhistochemie (grün), wobei die Stärke der Expressionen mit unterschiedlichen Schattierungen dargestellt wurde.

Abschließend wurden die Ergebnisse für jedes Tier nach folgendem Bewertungsschlüssel zusammengefasst.

Tabelle 4-6: Gradeinteilung der p38- und p24-Immunhistochemie

Grad	Kriterien
–	in keiner Lokalisation p38 ⁺ bzw. p24 ⁺ Zellen
+	in allen Lokalisationen weniger als 10 % p38 ⁺ bzw. p24 ⁺ Zellen
++	in allen Lokalisationen weniger als 60 % p38 ⁺ bzw. p24 ⁺ Zellen, in mindestens einer Region mehr als 10 % p38 ⁺ bzw. p24 ⁺ Zellen
+++	in mindestens einer Lokalisation 60 % oder mehr als 60 % p38 ⁺ bzw. p24 ⁺ Zellen

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-7: Ergebnisse der BDV-Immunhistochemie (Infektionsdosis: 200 µl)

Tier		B	C	Cc	Hc	CA	MH	StH	KHM	Kör	PC	Mol	Grad
VI NBAE.1 Alter: 110d	p38	1	22	15	10	60	12	8	8	6	10	3	+++
	p24	10	32	12	10	50	25	25	12	5	17	6	++
VI NBAE.2 Alter: 110d	p38	3	23	2	10	80	4	2	1	3	20	5	+++
	p24	15	28	17	10	60	10	8	4	7	10	4	+++
VI NBAE.3 Alter: 110d	p38	1	15	1	5	45	30	10	2	3	10	2	++
	p24	5	20	8	8	55	32	35	12	3	15	8	++
VI NBAE.4 Alter: 110d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
VII NBAE.1 Alter: 110d	p38	6	20	7	n.v.	n.v.	30	20	15	15	60	5	+++
	p24	4	17	7	n.v.	n.v.	15	20	12	5	35	2	++
VII NBAE.2 Alter: 110d	p38	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
	p24	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	+
VII NBAE.3 Alter: 110d	p38	10	25	20	10	65	35	40	50	40	20	20	+++
	p24	17	30	30	25	60	35	37	42	22	20	25	+++
VII NBAE.4 Alter: 110d	p38	20	30	10	5	50	10	30	5	3	25	5	++
	p24	26	25	5	5	45	27	29	37	15	50	8	++
VII NBAE.5 Alter: 110d	p38	n.v.	40	30	30	70	15	20	35	15	50	10	+++
	p24	n.v.	22	28	10	30	12	40	28	18	40	18	++
VII NBAE.6 Alter: 110d	p38	15	30	10	15	65	10	15	25	5	10	5	+++
	p24	28	36	12	8	55	21	28	40	6	10	5	++
VII NBAE.7 Alter: 110d	p38	14	25	1	40	80	3	10	5	1	4	1	+++
	p24	29	25	22	40	55	15	30	10	5	4	2	++

4 - Ergebnisse

B = Bulbus; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; CA = CA-Felder und Gyrus dentatus (Neuronen) des Hippocampus; Hc = restliches Hippocampusgewebe; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KHM = Kleinhirnmantel; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; PC = Purkinje-Zellschicht; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; rosa = p38; grün = p24 (Schattierung entsprechend der Stärke der Expression); Angabe in Prozent p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen unabhängig vom Zelltyp; n.v. = nicht vorhanden

Tabelle 4-8: Ergebnisse der BDV-Immunhistochemie (Infektionsdosis: 400 µl)

Tier		B	C	Cc	CA	Hc	MH	StH	KHM	Kör	PC	Mol	Grad
VIII NBAE.7 Alter: 90d	p38	3	25	15	85	50	30	30	10	4	10	5	+++
	p24	4	10	12	15	50	8	22	5	18	2	4	++
IX NBAE.3 Alter: 90d	p38	6	50	35	60	40	25	5	6	15	5	5	+++
	p24	6	35	8	n.v.	n.v.	8	15	6	2	1	1	++
X NBAE.1 Alter: 90d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
X NBAE.4 Alter: 90d	p38	10	38	20	43	10	20	15	32	10	20	4	++
	p24	4	15	15	75	5	18	15	30	4	8	6	+++
VIII NBAE.3 Alter: 450d	p38	5	65	30	60	25	25	15	5	10	15	30	+++
	p24	7	10	3	20	2	15	5	5	8	8	5	++
IX NBAE.4 Alter: 740d	p38	5	35	35	78	30	33	25	20	7	50	40	+++
	p24	5	22	22	75	25	30	15	32	6	20	10	+++

B = Bulbus; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; CA = CA-Felder und Gyrus dentatus (Neuronen) des Hippocampus; Hc = restliches Hippocampusgewebe; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KHM = Kleinhirnmantel; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; PC = Purkinje-Zellschicht; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; rosa = p38; grün = p24 (Schattierung entsprechend der Stärke der Expression); Angabe in Prozent p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen unabhängig vom Zelltyp; n.v. = nicht vorhanden

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-9: Ergebnisse der BDV-Immunhistochemie (Infektionsdosis: 500µl)

Tier		B	C	Cc	CA	Hc	MH	StH	KHM	Kör	PC	Mol	Grad
12 NBAE.1 Alter: 7d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
11 NBAE.1 Alter: 11d	p38	0	0	0	n.v.	n.v.	<1	<1	0	0	0	0	+
	p24	0	0	<1*	n.v.	n.v.	<1	<1	<1	0	0	0	+
0 NBAE.1 Alter: 310d	p38	n.v.	25	10	45	20	30	10	10	27	17	12	++
	p24	n.v.	50	25	60	50	18	18	4	25	3	6	+++
0 NBAE.2 Alter: 310d	p38	1	25	13	27	15	8	5	18	45	10	7	++
	p24	16	50	46	40	35	35	40	27	15	2	7	++
0 NBAE.3 Alter: 310d	p38	5	28	5	50	5	17	18	8	40	8	10	++
	p24	19	35	4	40	30	15	18	8	13	1	2	++
0 NBAE.6 Alter: 310d	p38	9	55	48	70	25	45	40	20	16	15	25	+++
	p24	27	45	65	65	25	28	38	20	16	10	30	+++
11 NBAE.11 Alter: 640d	p38	2	35	10	75	37	20	5	4	2	35	6	+++
	p24	12	20	15	n.v.	n.v.	15	20	15	3	35	10	++
0 NBAE.4 Alter: 690d	p38	6	40	3	50	15	25	20	4	25	35	35	++
	p24	7	15	5	70	8	15	12	4	15	1	3	+++

B = Bulbus; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; CA = CA-Felder und Gyrus dentatus (Neuronen) des Hippocampus; Hc = restliches Hippocampusgewebe; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KHM = Kleinhirnmantel; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; PC = Purkinje-Zellschicht; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; rosa = p38; grün = p24; Angabe in Prozent p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen unabhängig vom Zelltyp; n.v. = nicht vorhanden; * im Randbereich des Cc vereinzelt p24⁺ Neuronen

Tabelle 4-10: Ergebnisse der BDV-Immunhistochemie (Infektionsdosis: 1000 µl)

Tier		B	C	Cc	Hc	CA	MH	StH	KHM	Kör	PC	Mol	Grad
19 NBAE.1 Alter: 28d	p38	4	60	35	n.v.	n.v.	40	45	48	9	35	20	+++
	p24	5	45	30	n.v.	n.v.	40	40	15	3	50	30	++
19 NBAE.2 Alter: 28d	p38	7	27	55	15	65	38	20	25	4	25	3	+++
	p24	4	25	40	15	45	28	25	10	12	30	8	++
19 NBAE.3 Alter: 28d	p38	13	42	33	25	75	23	26	30	4	33	20	+++
	p24	4	32	30	12	55	20	35	10	3	35	15	++
19 NBAE.4 Alter: 28d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
19 NBAE.5 Alter: 28d	p38	13	20	35	10	52	37	18	30	4	7	2	++
	p24	10	15	30	20	60	6	8	10	1	10	1	+++

B = Bulbus; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; Hc = Hippocampus außer Neuronen; CA = CA-Felder und Gyrus dentatus (Neuronen) des Hippocampus; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KHM = Kleinhirnmark; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; PC = Purkinje-Zellschicht; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; rosa = p38; grün = p24; Angabe in Prozent p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen unabhängig vom Zelltyp; n.v. = nicht vorhanden

Insgesamt ließ sich bei 24 NBAE-Tieren eine generalisierte Ausbreitung virusspezifischer Proteine im ZNS nachweisen. Bei diesen Tieren fanden sich in allen Regionen p38⁺ und p24⁺ Zellen. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen Nukleoprotein und Phosphoprotein festgestellt werden. In den meisten Fällen wiesen die Neuronen der Hippocampusformation (Neuronen der CA-Felder und des Gyrus dentatus) die stärksten Expressionen der virusspezifischen Proteine auf. Die Prozentsätze betragen in dieser Region beim Nukleoprotein 27–85 % (\bar{x} = 61,36 %), beim Phosphoprotein 15–75 % (\bar{x} = 51,5 %). Größere Schwankungen ergaben sich bei den Purkinje-Zellen. Es konnten Prozentsätze von 4–60 % (\bar{x} = 22,04 %) p38⁺ Purkinje-Zellen sowie 1–50 % (\bar{x} = 17,38 %) p24⁺ Purkinje-Zellen ermittelt werden. Im Corpus callosum färbten sich Zellen mit Oligodendrozyten-Morphologie an (**Abbildungen 4-13 und 4-14**). Mit Hilfe einer Doppelfärbung mit Olig2 konnten die BDV-positiven Zellen eindeutig als Oligodendrozyten identifiziert werden

(**Abbildung 4-15**). Die Prozentsätze BDV-positiver Zellen im Corpus callosum betragen für das Nukleoprotein 1–55 % ($\bar{x} = 19,92$ %) und für das Phosphoprotein 3–65% ($\bar{x} = 20,46$ %). Das Verteilungsmuster BDV-infizierter Zellen sowie der Gesamt-Grad war unabhängig von der verwendeten Infektionsdosis. Auch bei den Tieren, die mit der niedrigsten Viruskonzentration von 200 μ l infiziert wurden, kam es zu einer generalisierten Ausbreitung BDV-positiver Zellen im Gehirn. Außerdem konnte keine Altersabhängigkeit festgestellt werden. Ab der Altersgruppe von 28 Tagen war das Verteilungsmuster BDV-positiver Zellen vergleichbar mit den ältesten untersuchten Tieren.

Innerhalb der Zellkompartimente kamen bei beiden Proteinen sowohl eine ausschließlich nukleäre, eine ausschließlich zytoplasmatische als auch die gesamtzelluläre Verteilung der virusspezifischen Antigene vor (**Abbildungen 4-10 bis 4-12**). Auch die Fortsätze der Neuronen sowie die Axone im Corpus callosum zeigten eine Anfärbung.

Zellen perivaskulärer Infiltrate mit Lymphozyten-Morphologie waren immer BDV-negativ (**Abbildung 4-9**).

Zwei NBAE-Tiere zeigten nur wenige BDV-positive Zellen in einzelnen Regionen. Das elf Tage alte Tier *II NBAE.1* zeigte einzelne $p38^+$ Zellen im Mittelhirn und Stammhirn sowie einzelne $p24^+$ Zellen in Bulbus, Mittelhirn, Stammhirn und Kleinhirnmark (in beiden Färbungen war der Hippocampus nicht vorhanden). Überwiegend handelte es sich bei den infizierten Zellen um Zellen mit Neuronenmorphologie. Das zweite Tier mit nur minimalen Expressionen virusspezifischer Proteine war das 110 Tage alte Tier *VII NBAE.2*. Hier fanden sich in Bulbus und Cortex vereinzelt $p38^+$ und $p24^+$ Neuronen. Fokal konnten bei diesem Tier auch $p24^+$ Neuronen im Stammhirn detektiert werden. In allen anderen Hirnregionen einschließlich Hippocampus fanden sich bei diesem Tier keine BDV-positiven Zellen.

Vier aerogen infizierte Ratten zeigten keine Expressionen der Proteine $p38$ und $p24$ (*VI NBAE.4, X NBAE.1, 12 NBAE.1, 19 NBAE.4*). Das Vorkommen BDV-negativer Tiere war unabhängig von der verwendeten Infektionsdosis. In jeder Dosisgruppe gab es ein BDV-negatives Tier.

Von den beiden Müttern war nur eine Mutter BDV-positiv (*0 Mutter*). Die zweite Mutter sowie die drei Sentinels waren BDV-negativ (*11 Mutter, VII S.8, VII S.9, X S.5*). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-11** aufgeführt.

Tabelle 4-11: Ergebnisse der BDV-Immunhistochemie (Mütter und Sentinels)

Tier		B	C	Cc	Hc	CA	MH	StH	KHM	Kör	PC	Mol	Grad
0 Mutter 105d	p38	4	35	30	10	10	6	23	3	0	3	1	++
	p24	3	25	12	10	38	30	15	2	1	3	1	++
11 Mutter 270d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
VII S.8 110d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
VII S.9 110d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
X S.5 90d	p38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–
	p24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	–

B = Bulbus; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; Hc = Hippocampus; CA = CA-Felder (Neuronen) des Hippocampus; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KHM = Kleinhirnmantel; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; PC = Purkinje-Zellschicht; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; rosa = p38; grün = p24; Angabe in Prozent BDV-positiver Zellen unabhängig vom Zelltyp

Bei keinem Kontrolltier konnte BDV-Antigen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

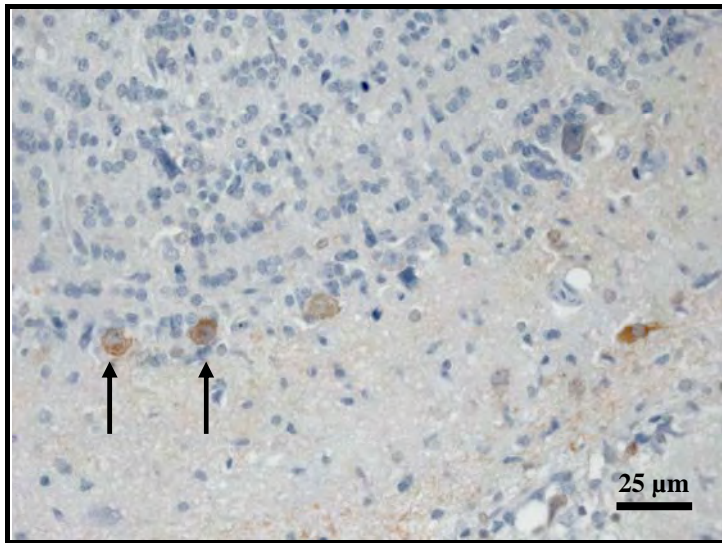


Abbildung 4-7:

p24⁺ Mitralzellen im Bulbus olfactorius einer Mutter (Pfeile)
(0 Mutter)

p24-IHC (DAB)



Abbildung 4-8:

Verteilungsmuster p38⁺ Zellen im Hippocampus einer Mutter
(0 Mutter)

p38-IHC (DAB)

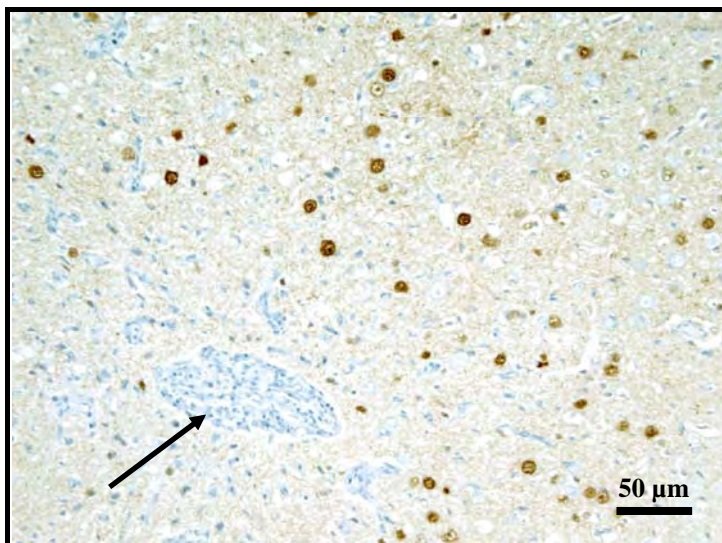


Abbildung 4-9:

p38⁺ Zellen im Cortex einer Mutter;
das perivaskuläre Infiltrat enthält
keine p38⁺ Zellen (Pfeil)
(0 Mutter)

p38-IHC (DAB)

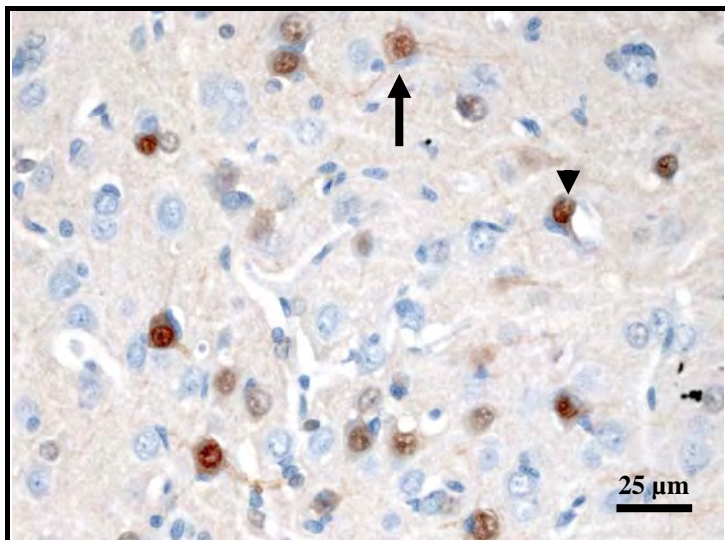


Abbildung 4-10:

p38⁺ Neuronen im Cortex eines NBAE-Tieres; nukleäre Lokalisation überwiegt
25 % p38⁺ Zellen
(VII NBAE.7)
zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung (Pfeil), hauptsächlich nukleäre Anfärbung (Dreieck)
p38-IHC (DAB)

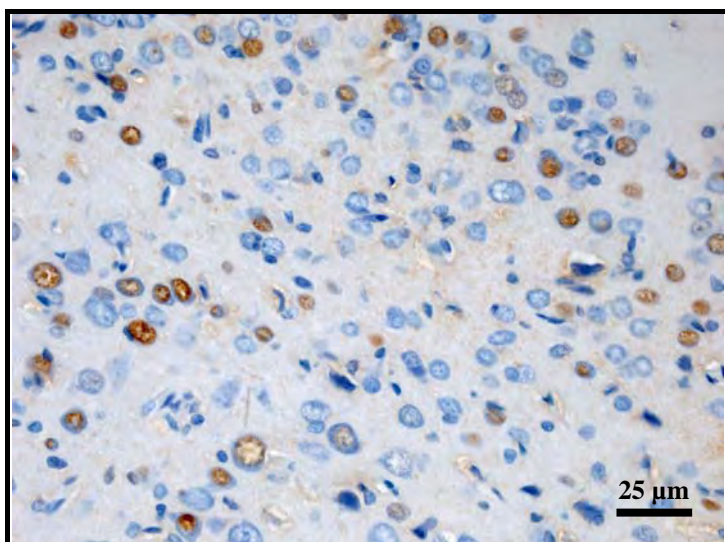


Abbildung 4-11:

p38⁺ Zellen im Cortex eines NBAE-Tieres, es sind vorwiegend Neuronen infiziert
25 % BDVp38⁺ Zellen
(0 NBAE.1)

p38-IHC (DAB)

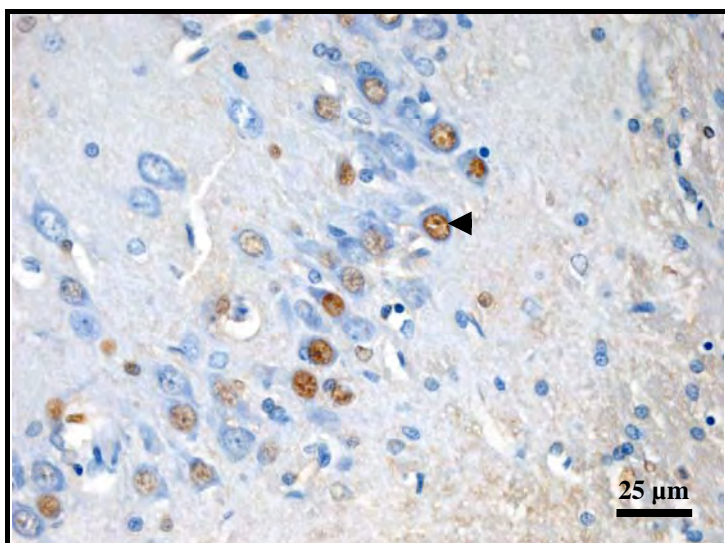


Abbildung 4-12:

p38⁺ Neuronen im Hippocampus eines NBAE-Tieres; nukleäre Lokalisation überwiegt
45 % p38⁺ Zellen im CA-Feld
25 % p38⁺ Zellen im restlichen Hippocampusgewebe
(0 NBAE.1)
nukleäre Lokalisation (Dreieck)
p38-IHC (DAB)

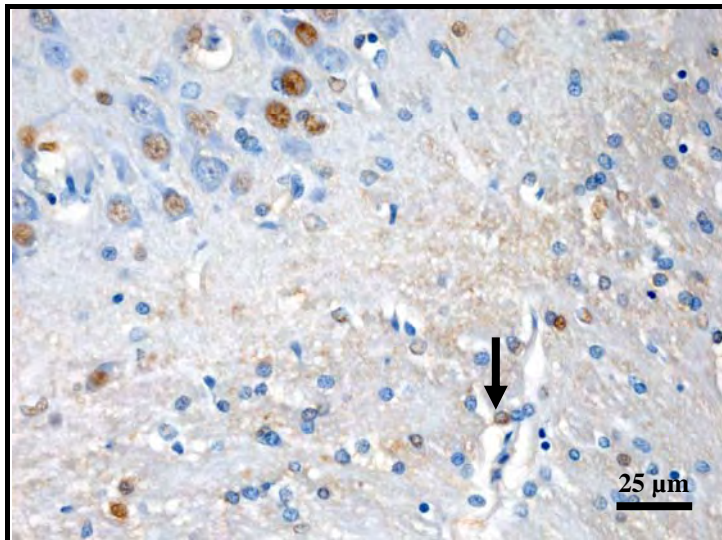


Abbildung 4-13:

Übergangsbereich zwischen Hippocampus und Corpus callosum; im Corpus callosum 10 % p38⁺ Zellen, bei denen es sich phänotypisch um Oligodendrozyten handelt (Pfeil)
(0 NBAE.1)

p38-IHC (DAB)

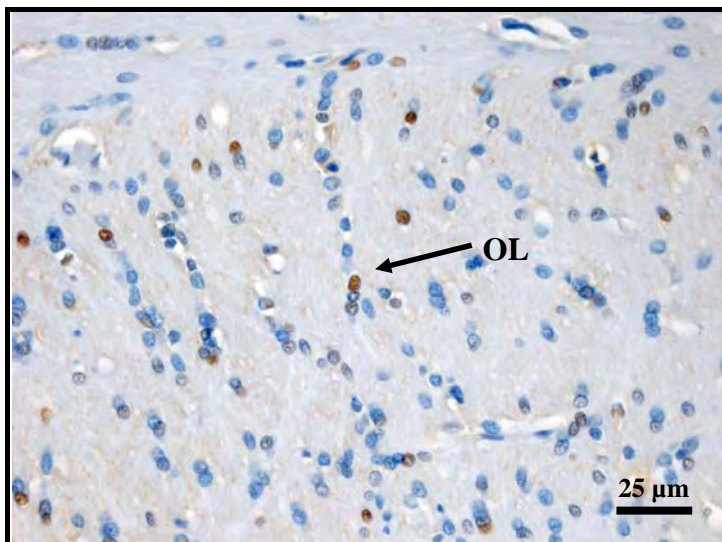


Abbildung 4-14:

p38⁺ Zellen im Corpus callosum eines NBAE-Tieres, phänotypisch handelt es sich um infizierte Oligodendrozyten (Pfeil)
10 % p38⁺ Zellen
(0 NBAE.1)

OL = Oligodendrozyt
p38-IHC (DAB)

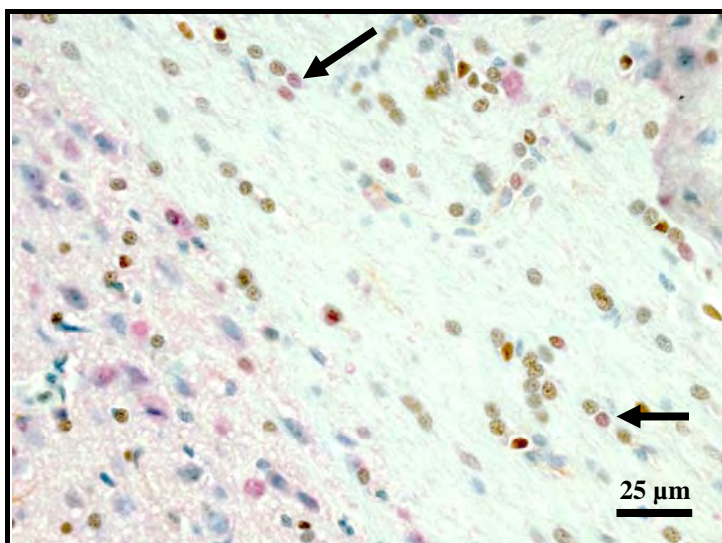


Abbildung 4-15:

p38⁺ Oligodendrozyten sind durch eine braun-rote Mischfarbe gekennzeichnet (Pfeile)
(VII NBAE.3)

Doppelfärbung:
Olig2 (DAB) + p38 (Fast Red)

4.5 Mikroglia / Makrophagen

Die Darstellung von Makrophagen und phagozytisch aktivierter Mikroglia erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers ED1 (DIJKSTRA *et al.*, 1985; FLARIS *et al.*, 1993). Da ED1 als phagolysosomales Antigen von beiden Zelltypen gleichermaßen exprimiert wird, ist eine Unterscheidung dieser beiden Zelltypen immunhistochemisch nicht möglich. Kennzeichen einer Aktivierung von Mikrogliazellen sind neben der Expression von Aktivierungsmarkern wie ED1 auch die Proliferation und Größenzunahme sowie die Änderung der Zellform. Ruhende Mikroglia weist eine ramifizierte verzweigte Zellform auf, nach Aktivierung entsteht eine amöboid-rundliche Form (DAVIS *et al.*, 1994). OVANESOV *et al.* konnten demonstrieren, dass ED1 als verlässlicher Marker für BDV-aktivierte Mikroglia einsetzbar ist, da ED1⁺ mikrogliale Zellen sich im Vergleich zu Kontrolltieren überwiegend bei neonatal BDV-infizierten Ratten fanden (2008).

Es wurden ED1⁺ Zellen in folgenden Gehirnregionen gezählt: **Bulbus (B)**, **Cortex (C)**, **Corpus callosum (Cc)**, **Mittelhirn (MH)**, **Stammhirn (StH)**, **Kleinhirn (KH)**. In jeder Region wurden ED1⁺ Zellen in drei repräsentativen Gesichtsfeldern bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Hierbei wurden nur Zellen mit einem eindeutig erkennbaren Zelleib und/oder Zellkern berücksichtigt. Der Mittelwert aus den drei Gesichtsfeldern wurde protokolliert und nach dem Bewertungsschlüssel in **Tabelle 4-12** semiquantitativ für jede Region angegeben.

Tabelle 4-12: Gradeinteilung der ED1-Immunhistochemie

Grad	Kriterien (Auswertung bei 400facher Vergrößerung)
+	< 10 ED1 ⁺ Zellen / Gesichtsfeld
++	10–50 ED1 ⁺ Zellen / Gesichtsfeld
+++	> 50 ED1 ⁺ Zellen / Gesichtsfeld

Es wurde grundsätzlich zwischen einem gleichmäßigen und einem fokalen Verteilungsmuster unterschieden. Bei einem gleichmäßigen Verteilungsmuster waren keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Dichte ED1⁺ Zellen erkennbar. Als Foki wurden Mikroglia/Makrophagen-Knötchen bezeichnet, die sich aufgrund ihrer Dichte ED1⁺ Zellen

4 - Ergebnisse

deutlich von ihrer Umgebung abgrenzten. Fokale Zentren wurden in den Tabellen rot markiert.

Bei den Kontrolltieren fanden sich kaum angefärbte Zellen. In der Regel wurden bei diesen Tieren in jeder untersuchten Hirnregion weniger als drei ED1⁺ Zellen gezählt (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4-13: Ergebnisse der ED1-Immunhistochemie bei den NBAE-Tieren

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	B	C	Cc	Hc	MH	StH	KH	Grad
12 NBAE.1	500	7	n.v.	+	+	+	+	+	+	+
11 NBAE.1	500	11	+	+	+	n.v. *	+	+	++++	+++
19 NBAE.1	1000	28	+	+	+++	n.v.	+	+	+	+++
19 NBAE.2	1000	28	+	+	++	+++	+	+	+	++
19 NBAE.3	1000	28	+	+++	+++	++	+	+	+++	+++
19 NBAE.4	1000	28	+	+	+	+	+	+	+	+
19 NBAE.5	1000	28	+++	+++	+	+	+	+	+	++
VIII NBAE.7	400	90	++	++	++	++	++	+	+	++
IX NBAE.3	400	90	+	++	++	n.a.	+	+++	+++	++
X NBAE.1	400	90	+	+	+	+	+	+	+	+
X NBAE.4	400	90	++	+++	+++	n.v.	++	++	++++	+++
VI NBAE.1	200	110	+	+	++	n.v.	+	+	+	++
VI NBAE.2	200	110	+	+	++	+++	++	+++	+++	++
VI NBAE.3	200	110	++	++	++	+++	++	++	+++	+++
VI NBAE.4	200	110	+	+	+	+	+	+	+	+
VII NBAE.1	200	110	+	+	+	n.v.	+	+	+++	++
VII NBAE.2	200	110	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 4-13: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	B	C	Cc	Hc	MH	StH	KH	Grad
VII NBAE.3	200	110	+	+++	++	++++	+	+	+++	+++
VII NBAE.4	200	110	+++	++++	++	+++	++	++++	+++	+++
VII NBAE.5	200	110	n.v.	+++	+	++	++	+	+++	++
VII NBAE.6	200	110	++	++++	++	n.v.	++	+	+++	+++
VII NBAE.7	200	110	+++	++++	++++	+++	++++	++++	+	+++
0 NBAE.1	500	310	n.v.	+	+	+++	+	+	+	++
0 NBAE.2	500	310	+	+++	++	+	+	+	++	++
0 NBAE.3	500	310	+	+	++	+	+	+	+	++
0 NBAE.6	500	310	+++	+	++	+	++	+++	+	++
VIII NBAE.3	400	450	+	+	++	+	+++	+	+++	++
11 NBAE.11	500	640	+	+	++	+	+	+	+++	++
0 NBAE.4	500	690	+++	+	++	+	+	+	+	++
IX NBAE.4	400	740	+	+	+	n.v. *	+	+++	+++	++

Dosis in µl (10⁶ ffu/ml); d = Tage; B = Bulbus olfactorius; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; Hc = Hippocampus; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KH = Kleinhirn; n.a. = nicht auswertbar; n.v. = nicht vorhanden; * = ventral des Cc; ++

grün = BDV-negative Tiere

orange = Tiere mit Infiltraten

rot = fokale Anhäufungen ED1⁺ Zellen

Auswertung bei 400facher Vergrößerung pro Gesichtsfeld:

+ = < 10 ED1⁺ Zellen; ++ = 10–50 ED1⁺ Zellen; +++ = > 50 ED1⁺ Zellen

Der Gesamtgrad entspricht der Höchstbewertung unter Berücksichtigung aller untersuchten Regionen

Bei den NBAE-Tieren konnten folgende Befunde erhoben werden:

Alle BDV-negativen NBAE-Tiere (in **Tabelle 4-13** grün markiert) zeigten nur ganz vereinzelt angefärbte Zellen im Gehirn (12 NBAE.1, 19 NBAE.4, X NBAE.1, VI NBAE.4). In der Regel wurden hier nur ein bis vier angefärbte Zellen pro Gesichtsfeld gezählt. Diese Befunde

stimmten mit den Befunden bei den Kontrolltieren überein und wurden daher als physiologisch eingestuft. Lediglich bei dem sieben Tage alten Tier *12 NBAE.1* fanden sich kleine fokale Bezirke ED1⁺ Zellen in Kleinhirnmark und Stammhirn. Einschränkend ist zu sagen, dass sich diese Foki nur aus weniger als zehn ED1⁺ Zellen pro Gesichtsfeld zusammensetzten und dementsprechend nur mit + bewertet wurden.

Bei den BDV-positiven NBAE-Tieren ohne Meningoenzephalitis waren die Mikroglia/Makrophagen-Reaktionen im Vergleich zu den Tieren mit Meningoenzephalitis insgesamt etwas milder. Nur bei fünf NBAE-Tieren ohne Meningoenzephalitis wurde die Gesamtreaktion mit +++ bewertet (*11 NBAE.1* und *X NBAE.4* mit jeweils einem fokalen Zentrum im Kleinhirnmark, *VI NBAE.3* mit zwei fokalen Zentren in Cortex und Kleinhirnmark, *VII NBAE.3* mit drei fokalen Zentren in Cortex, Hippocampus und Kleinhirnmark, *VII NBAE.6* ohne fokale Zentren).

Im Hinblick auf das Verteilungsmuster fanden sich die deutlichsten mikroglialen Reaktionen der NBAE-Tiere ohne Entzündung im Corpus callosum (+++ bei einem NBAE-Tier, ++ bei 13 NBAE-Tieren) und im Kleinhirn (+++ bei zwei NBAE-Tieren, ++ bei elf NBAE-Tieren). Etwas geringer waren die Reaktionen im Cortex (+++ bei zwei NBAE-Tieren, ++ bei sechs NBAE-Tieren) und im Hippocampus (+++ bei zwei NBAE-Tieren, ++ bei fünf NBAE-Tieren, einschränkend ist hierzu zu sagen, dass der Hippocampus bei sieben NBAE-Tieren nicht auswertbar bzw. nicht vorhanden war). Die Reaktionen im Bulbus olfactorius fielen vergleichsweise gering aus (++ bei sechs NBAE-Tieren). Typische Verteilungsmuster ED1⁺ Zellen in den drei Prädilektionsstellen Corpus callosum, Hippocampus und Kleinhirn sind in den **Abbildungen 4-16 bis 4-18** dargestellt.

Innerhalb des Kleinhirns war das Kleinhirnmark am stärksten betroffen. Bei sechs NBAE-Tieren fanden sich im Kleinhirnmark wesentlich mehr ED1⁺ Zellen als im restlichen Kleinhirngewebe (*VI NBAE.2*, *VII NBAE.1*, *VII NBAE.5*, *VII NBAE.6*, *IX NBAE.3*, *11 NBAE.1*). Die Unterschiede zwischen Kleinhirnmark und restlichem Kleinhirngewebe umfassten in der Regel eine Bewertungsstufe, d. h. im Kleinhirnmark wurden 10–50 ED1⁺ Zellen (++) pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung gezählt, im restlichen Kleinhirngewebe fanden sich weniger als zehn ED1⁺ Zellen (+) pro Gesichtsfeld. Bei dem elf Tage alten Tier *11 NBAE.1* waren die Unterschiede zwischen Kleinhirnmark und restlichem

4 - Ergebnisse

Kleinhirngewebe sogar noch größer. Hier fanden sich im Kleinhirnmark mehr als 50 ED1⁺ Zellen (+++), im restlichen Kleinhirn nur weniger als zehn ED1⁺ Zellen (+). Fokale Zentren ED1⁺ Zellen gab es ebenfalls am häufigsten im Kleinhirnmark. Diese wurden insgesamt bei fünf NBAE-Tieren nachgewiesen (*11 NBAE.1, X NBAE.4, VI NBAE.3, VII NBAE.3, 0 NBAE.2*).

NBAE-Tiere mit Meningoenzephalitis (in **Tabelle 4-13 orange** markiert) zeigten eine insgesamt deutliche Mikroglia/Makrophagen-Reaktion, wobei die fokalen Bezirke in der Regel infiltrat-assoziiert waren.

Tabelle 4-14: Ergebnisse der ED1-Immunhistochemie bei den Müttern und Sentinels

Tier	Dosis	Alter (d)	B	C	Cc	Hc	MH	StH	KH	Grad
0 Mutter	-	105	+++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	+++
11 Mutter	-	270	+++++	++	+++++	+++	n.a.	+++	+	+++
VII S.8	-	110	+	+	+	+	+	+	+	+
VII S.9	-	110	+	+	+	+	+	+	+	+
X S.5	-	90	+	+	+	+	+	+	+	+

d = Tage; B = Bulbus olfactorius; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; Hc = Hippocampus; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KH = Kleinhirn; n.a. = nicht auswertbar

grün = BDV-negative Tiere

orange = Tiere mit Infiltraten

rot = fokale Anhäufungen ED1⁺ Zellen

Auswertung bei 400facher Vergrößerung:

+ = < 10 ED1⁺ Zellen; ++ = 10–50 ED1⁺ Zellen; +++ = > 50 ED1⁺ Zellen

Der Gesamtgrad entspricht der Höchstbewertung unter Berücksichtigung aller untersuchten Regionen

Beide Mütter wurden in der ED1-Immunhistochemie mit +++ bewertet. Die BDV-positive Mutter *0 Mutter* zeigte in allen Regionen außer im Bulbus olfactorius ED1⁺ infiltrat-assoziierte Foci. Hervorzuheben ist, dass die Mutter der Wurfgruppe 11 BDV-negativ war, d.h. die Bornaproteine N und P konnten in keiner Gehirnregion immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Alle Sentinels waren BDV-negativ. Die Befunde der ED1-Immunhistochemie bei den Sentinels entsprachen den Befunden bei den Kontrolltieren, d.h. pro Gesichtsfeld wurden weniger als zehn ED1⁺ Zellen (+) nachgewiesen. In der Regel fanden sich weniger als zehn ED1⁺ Zellen im gesamten Hirnschnitt.

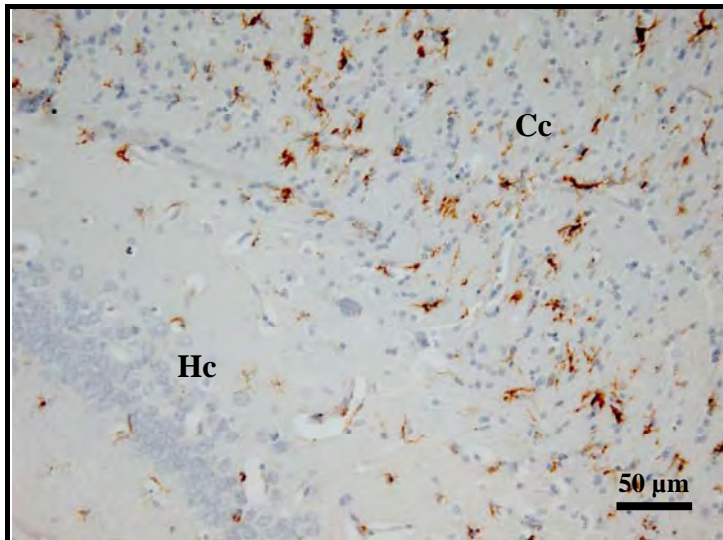


Abbildung 4-16:

Eine häufige Prädilektionsstelle für ED1⁺ Mikroglia war das Corpus callosum; bei diesem NBAE-Tier fanden sich im Corpus callosum (Cc) wesentlich mehr ED1⁺ Zellen als im Hippocampus (Hc)
Grad: Cc: ++, Hc: +
(0 NBAE.6)
ED1-IHC (DAB)

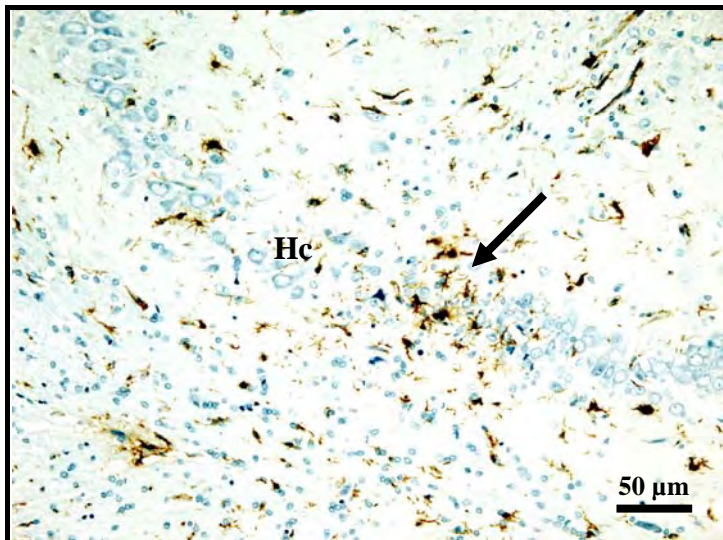


Abbildung 4-17:

Eine weitere Prädilektionsstelle für ED1⁺ Mikroglia war der Hippocampus (Hc); bei diesem NBAE-Tier fand sich ein fokales Zentrum ED1⁺ Zellen im CA-Feld des Hippocampus (Pfeil)
Grad: Hc: + bis ++ (fokal)
(0 NBAE.1)
ED1-IHC (DAB)

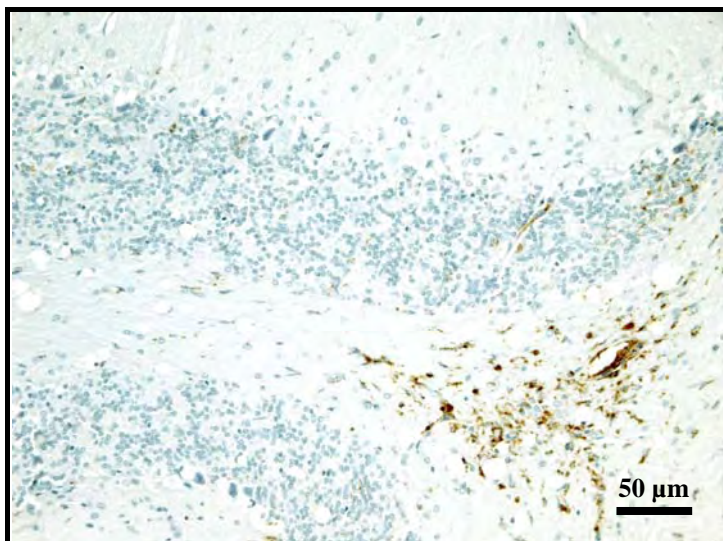


Abbildung 4-18:

Eine dritte Prädilektionstelle ED1⁺ Mikroglia war das Kleinhirnmak (KHM); Anhäufung ED1⁺ Zellen im Kleinhirnmak einer Mutter, im restlichen Kleinhirngewebe fanden sich nur vereinzelt ED1⁺ Zellen
Grad: + bis ++ (fokal im KHM)
(0 Mutter)
ED1-IHC (DAB)

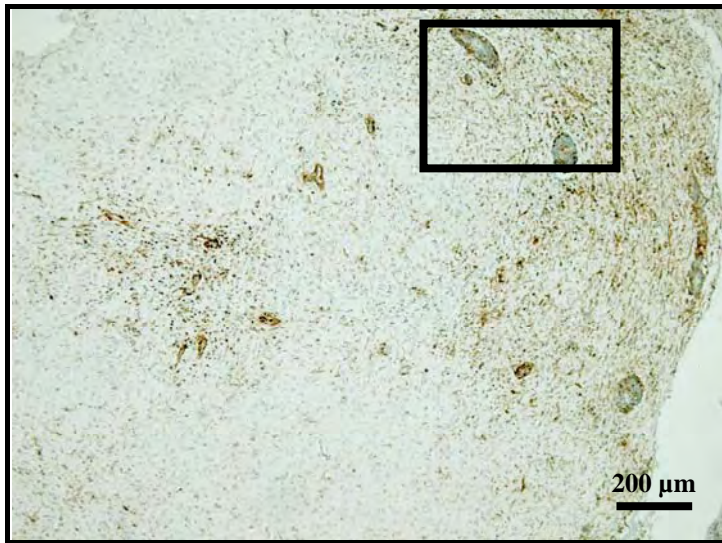


Abbildung 4-19:

Verteilungsmuster ED1⁺ Zellen im Cortex eines NBAE-Tieres mit Meningoenzephalitis; Anhäufung ED1⁺ Zellen in perivaskulären Infiltraten mit Diffusion ins umgebende Hirnparenchym
Grad: ++ bis +++ (fokal)
(VII NBAE.7)
ED1-IHC (DAB)

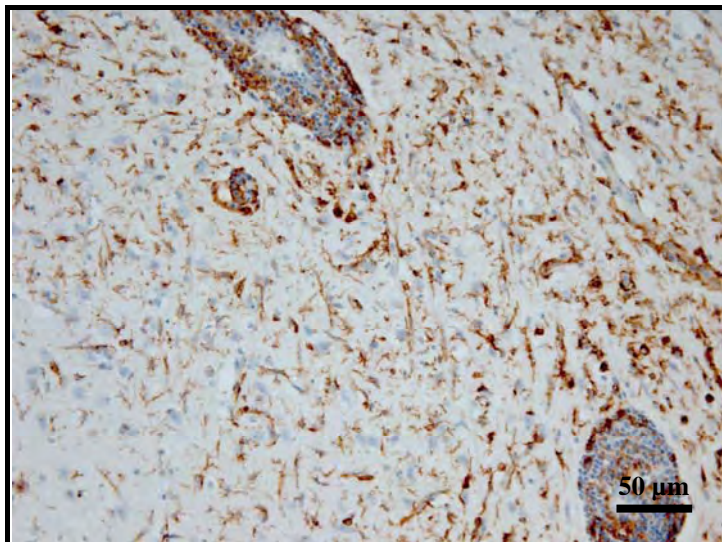


Abbildung 4-20:

Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 4-19:
Infiltrat-assoziierte ED1⁺ Zellen im Cortex eines NBAE-Tieres; außerhalb des Infiltrats ED1⁺ Zellen im Gewebe
Grad: ++ bis +++ (fokal)
(VII NBAE.7)
ED1-IHC (DAB)

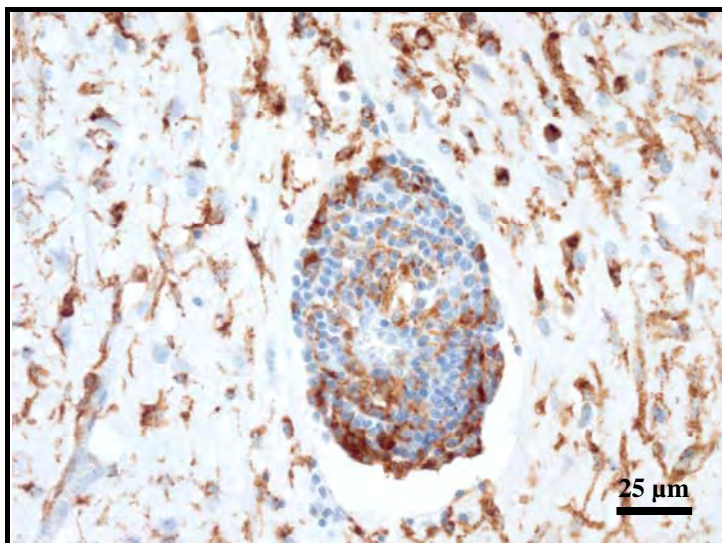


Abbildung 4-21:

ED1⁺ Zellen im Infiltrat;
prozentualer Anteil ca. 25 %
(VII NBAE.7)

ED1-IHC (DAB)

4.6 Immunzellen (CD45RC und CD8)

In der HE-Färbung wurden bereits bei einigen Tieren perivaskuläre mononukleäre Infiltrate im ZNS-Gewebe gefunden. Die Charakterisierung entzündlicher Infiltratzellen erfolgte immunhistochemisch unter Verwendung der Leukozytenmarker CD45RC und CD8. CD45RC wird als Oberflächenmolekül auf allen B-Lymphozyten, allen CD8⁺ T-Lymphozyten sowie auf ca. 2/3 aller CD4⁺ T-Lymphozyten exprimiert (SPICKETT *et al.*, 1983; WOOLLETT *et al.*, 1985). CD8 wird innerhalb der Leukozyten-Population von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert (BRIDEAU *et al.*, 1980). Die Immunreaktivität auf CD45RC und CD8 wurde nach den in **Kapitel 3.6.5** aufgeführten Kriterien ausgewertet. Hierbei wurden die meningeale, die perivaskuläre sowie die parenchymale Infiltration mit CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen beurteilt.

Die in der HE-Färbung unauffälligen Tiere blieben bis auf kleine Abweichungen auch in der CD45RC- und CD8-Immunhistochemie unauffällig. Bei drei NBAE-Tieren ohne Infiltrate fanden sich meningeal vermehrt CD45RC-reaktive Zellen (*0 NBAE.2, VIII NBAE.7, IX NBAE.3*), wovon bei zwei Tieren auch vermehrt CD8⁺ Zellen in den Meningen nachgewiesen werden konnten (*VIII NBAE.7, IX NBAE.3*).

Das Tier *X NBAE.4*, das in der HE-Färbung nur einzelne Knötchen mononukleärer Zellen in Bulbus olfactorius, Cortex und Mittelhirn aufwies, zeigte nur im Bulbus olfactorius vereinzelt CD45RC⁺ Zellen. Die CD8-Immunhistochemie verlief bei diesem Tier negativ.

Die auffälligsten Befunde fanden sich bei sechs NBAE-Tieren sowie bei den beiden Müttern (*VII NBAE.4, VII NBAE.7, 19 NBAE.1, 19 NBAE.2, 19 NBAE.3, 19 NBAE.5, 0 Mutter, 11 Mutter*). Diese Tiere zeigten bereits in der HE-Färbung deutliche Entzündungszeichen.

Die Befunde der CD45RC- und CD8-Immunhistochemie bei diesen Tieren mit Meningoenzephalitis sind in **Tabelle 4-15** aufgelistet.

Tabelle 4-15: Ergebnisse der CD45RC- und CD8-IHC bei Tieren mit Infiltraten

Tier	Infiltrate	Parenchym	Meninx
0 Mutter Dosis: - Alter: 105d	<p>CD45RC: Neun Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 13–180 Zellen 6–39 % CD45RC⁺ Zellen, Gesamtanteil 24 % CD45RC⁺ Zellen (126/528 Zellen) Keine Infiltrate im Kleinhirn</p>	<p>CD45RC: mäßig (++) CD45RC⁺ Zellen im Parenchym, besonders im Bulbus olfactorius und im Hippocampus</p>	<p>CD45RC: +++</p>
	<p>CD8: Sieben Infiltrate ausgezählt bestehend aus 10–35 Zellen 0–33 % CD8⁺ Zellen, Gesamtanteil 12 % (15/131 Zellen) Zwei Infiltrate CD8-negativ</p>	<p>CD8: mäßig (++) CD8⁺ Zellen im Parenchym, besonders im Bulbus olfactorius und im Hippocampus</p>	<p>CD8: +++</p>
11 Mutter Dosis: - Alter: 270d	<p>CD45RC: Sieben Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 20–220 Zellen 10–42 % CD45RC⁺ Zellen, Gesamtanteil 38 % (162/430 Zellen) Keine Infiltrate im Kleinhirn und Stammhirn</p>	<p>CD45RC: mäßig (++) CD45RC⁺ Zellen im Parenchym</p>	<p>CD45RC: +++</p>
	<p>CD8: Vier Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 40–220 Zellen 0–30 % CD8⁺ Zellen, Gesamtanteil 9 % (33/370 Zellen) Ein Infiltrat CD8-negativ</p>	<p>CD8: vereinzelt (+) CD8⁺ Zellen, besonders im Bulbus olfactorius</p>	<p>CD8: ++</p>

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-15: (Fortsetzung)

Tier	Infiltrate	Parenchym	Meninx
VII NBAE.4 Dosis: 200 Alter: 110d	CD45RC: Zehn Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 50–500 Zellen, 1–40 % CD45RC ⁺ Zellen, Gesamtanteil 19 % (301/1610 Zellen)	CD45RC: vereinzelt (+) CD45RC ⁺ Zellen (Zehn Zellen) im Hippocampus	CD45RC: +++
	CD8: Sieben Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 50–500 Zellen 0–12 % CD8 ⁺ Zellen, Gesamtanteil 3 % (40/1230 Zellen) Drei Infiltrate CD8-negativ	CD8: negativ (-): Keine CD8 ⁺ Zellen im Parenchym	CD8: ++
VII NBAE.7 Dosis: 200 Alter: 110d	CD45RC: 19 Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 8–240 Zellen 17–82 % CD45RC ⁺ Zellen, Gesamtanteil 60 % (843/1417 Zellen)	CD45RC: mäßig (++) CD45RC ⁺ Zellen im Parenchym, besonders im Bulbus olfactorius	CD45RC: +++
	CD8: Sechs Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 10–150 Zellen 0–17 % CD8 ⁺ Zellen, Gesamtanteil 5 % (20/435 Zellen) Fünf Infiltrate CD8-negativ	CD8: vereinzelt (+) CD8 ⁺ Zellen im Parenchym, besonders im Hippocampus	CD8: ++
19 NBAE.1 Dosis: 1000 Alter: 28d	CD45RC: Zehn Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 6–30 Zellen 0–75 % CD45RC ⁺ Zellen, Gesamtanteil 47 % (61/130 Zellen) Ein Infiltrat CD45RC-negativ Keine Infiltrate im Kleinhirn	CD45RC: mäßig (++) CD45RC ⁺ Zellen im Parenchym	CD45RC: +++
	CD8: negativ (-): keine CD8 ⁺ Zellen in Infiltraten	CD8: negativ (-): keine CD8 ⁺ Zellen im Parenchym	CD8: ++

Tabelle 4-15: (Fortsetzung)

Tier	Infiltrate	Parenchym	Meninx
19 NBAE.2 Dosis: 1000 Alter: 28d	CD45RC: Drei Infiltrate erkennbar, ein Infiltrat ausgezählt, bestehend aus 65 Zellen 22 % CD45RC ⁺ Zellen (14/65 Zellen)	CD45RC: negativ (-) : Keine CD45RC ⁺ Zellen im Parenchym	CD45RC: ++
	CD8: negativ (-) : Keine CD8 ⁺ Zellen in Infiltraten	CD8: negativ (-) : Keine CD8 ⁺ Zellen im Parenchym	CD8: -
19 NBAE.3 Dosis: 1000 Alter: 28d	CD45RC: Zwölf Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 5–32 Zellen 23–50 % CD45RC ⁺ Zellen, Gesamtanteil 33 % (56/169 Zellen)	CD45RC: negativ (-) : Keine CD45RC ⁺ Zellen im Parenchym	CD45RC: ++
	CD8: negativ (-) : Keine CD8 ⁺ Zellen in Infiltraten	CD8: negativ (-) : Keine CD8 ⁺ Zellen im Parenchym	CD8: -
19 NBAE.5 Dosis: 1000 Alter: 28d	CD45RC: 14 Infiltrate ausgezählt, bestehend aus 20–220 Zellen 16–68 % CD45RC ⁺ Zellen, Gesamtanteil 29 % (262/913 Zellen) keine Infiltrate im Kleinhirn	CD45RC: vermehrt (+++) CD45RC ⁺ Zellen im Parenchym keine CD45RC ⁺ Zellen im Kleinhirn	CD45RC: +++
	CD8: negativ (-) : Keine CD8 ⁺ Zellen in Infiltraten	CD8: vereinzelt (+) CD8 ⁺ Zellen (2 Zellen) im Hippocampus	CD8: ++

Infiltrate: Angabe der Anzahl ausgezählter Infiltrate; Angabe der kleinsten bzw. größten Gesamtzellzahl; Angabe des kleinsten bzw. größten prozentualen Anteils CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl; Summe der ausgezählten Zellen mit Angabe des prozentualen Anteils CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen

Parenchym: semiquantitative Auswertung CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen im Hirnparenchym; negativ (-), vereinzelt (+), mäßig (++), vermehrt (+++)

Meninx: semiquantitative Auswertung CD45RC⁺ bzw. CD8⁺ Zellen außerhalb des Hirngewebes; Angabe des Meningitis-Grades: negativ (-), geringgradig (+), mittelgradig (++), hochgradig (+++)

In der **Tabelle 4-15** sind die Ergebnisse der CD45RC- und CD8-Immunhistochemie bei den acht Tieren mit perivaskulären Infiltraten zusammenfassend dargestellt.

Die Befunde der CD45RC-Immunhistochemie waren insgesamt sehr einheitlich, d.h. es wurden bei allen Tieren mit Entzündungszeichen mittelgradige bis hochgradige CD45RC-positive Reaktionen sowohl in den Infiltraten als auch in den Meningen gefunden. Bis auf zwei Ausnahmen fanden sich bei diesen Tieren auch vermehrt CD45RC⁺ Zellen im Hirnparenchym außerhalb von Infiltraten. Lediglich bei den 28 Tage alten Tieren *19 NBAE.2* und *19 NBAE.3* waren keine CD45RC⁺ Zellen im Parenchym auffindbar.

Die CD8-Immunhistochemie ergab folgende Befunde:

Bei den 28 Tage alten Tieren mit Infiltraten waren sämtliche Infiltrate CD8-negativ. Nur bei einem dieser Tiere fanden sich ganz vereinzelt CD8⁺ Zellen im Hippocampus (*19 NBAE.5*). Eine mittelgradige meningeale Infiltration mit CD8⁺ Zellen konnte bei zwei der 28 Tage alten Tiere festgestellt werden (*19 NBAE.1, 19 NBAE.5*).

CD8⁺ Zellen in perivaskulären Infiltraten konnten nur bei den 110 Tage alten NBAE-Tieren (*VII NBAE.4, VII NBAE.7*) und bei den Müttern (*0 Mutter, 11 Mutter*) nachgewiesen werden. Der Anteil CD8⁺ Zellen in den Infiltraten schwankte hierbei sehr stark. Die Spannbreite reichte von 0-33%. Bei allen Tieren gab es auch CD8-negative Infiltrate. Außerhalb der Infiltrate konnten z.T. CD8⁺ Zellen im Hirnparenchym nachgewiesen werden (*VII NBAE.7, 0 Mutter, 11 Mutter*). Die meningeale Infiltration mit CD8⁺ Zellen wurde bei diesen Tieren mit ++ bis +++ bewertet.

Tabelle 4-16: Übersicht der Ergebnisse der CD45RC- und CD8-Immunhistochemie

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Infiltrate CD45RC	Infiltrate CD8	Gewebe CD45RC	Gewebe CD8	Meninx CD45RC	Meninx CD8	Grad
0 Mutter	-	105	++	++	++	++	+++	+++	+++
11 Mutter	-	270	+++	++	++	+	+++	++	+++
VII NBAE.4	200	110	++	++	+	-	+++	++	+++
VII NBAE.7	200	110	+++	++	++	+	+++	++	+++
19 NBAE.1	1000	28	+++	-	++	-	+++	++	++
19 NBAE.2	1000	28	++	-	-	-	++	-	++
19 NBAE.3	1000	28	+++	-	-	-	++	-	++
19 NBAE.5	1000	28	++	-	+++	+	+++	++	+++

Alle hier nicht genannten NBAE-Tiere, die Sentinels sowie die Kontrolltiere waren in beiden immunhistochemischen Färbungen negativ.

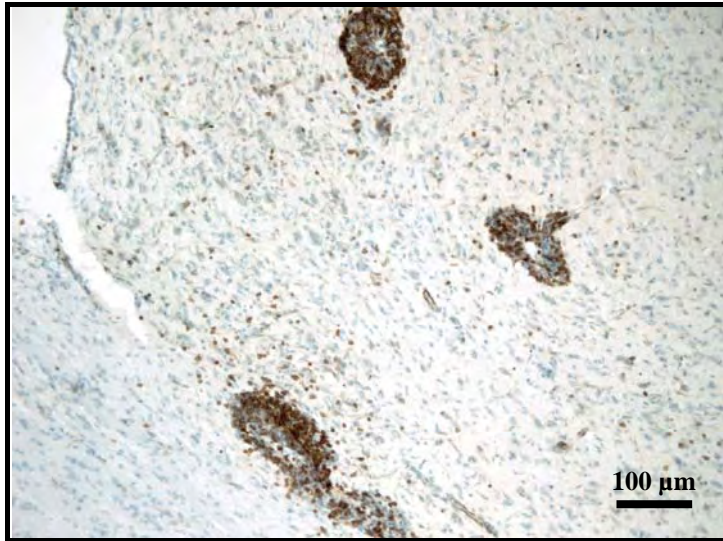


Abbildung 4-22:

CD45RC⁺ Zellen im Cortex eines NBAE-Tieres, drei Infiltrate mit einem hohen Anteil CD45RC⁺ Zellen, im Parenchym ebenfalls CD45RC⁺ Zellen (VII NBAE.7)

CD45RC-IHC (DAB)

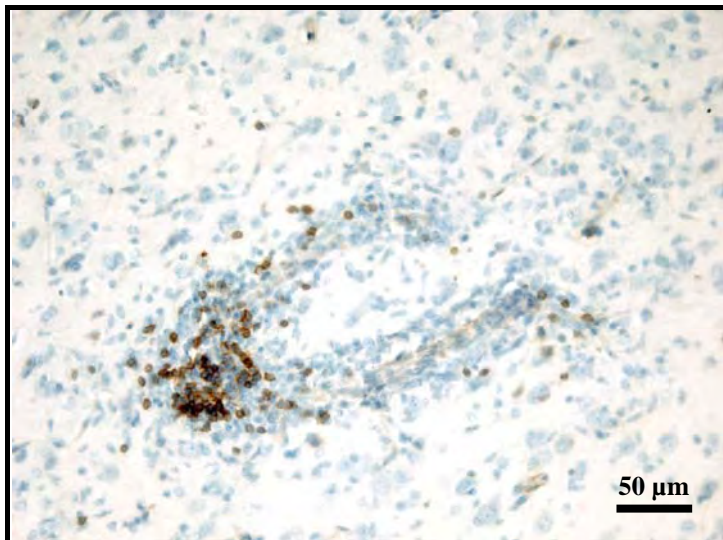


Abbildung 4-23:

CD45RC⁺ Zellen im Infiltrat eines NBAE-Tieres im Cortex (VII NBAE.7)

CD45RC-IHC (DAB)

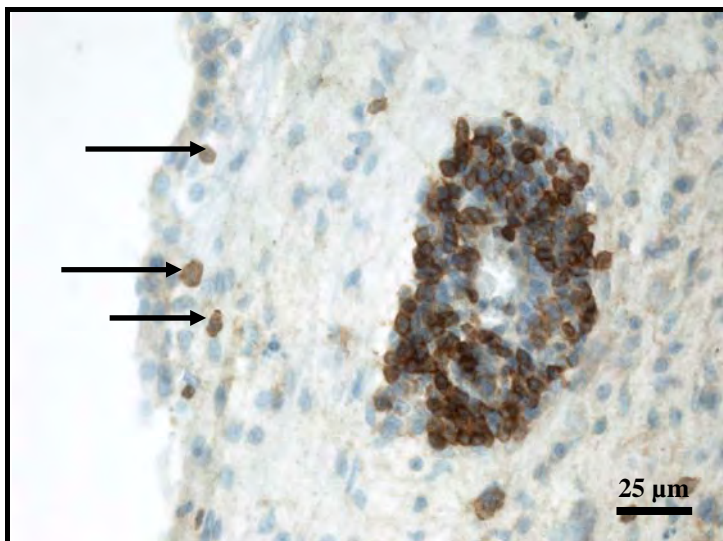


Abbildung 4-24:

CD45RC⁺ Zellen im Infiltrat im Cortex eines NBAE-Tieres, im Meninxbereich ebenfalls CD45RC⁺ Zellen (Pfeile) (VII NBAE.7)

CD45RC-IHC (DAB)

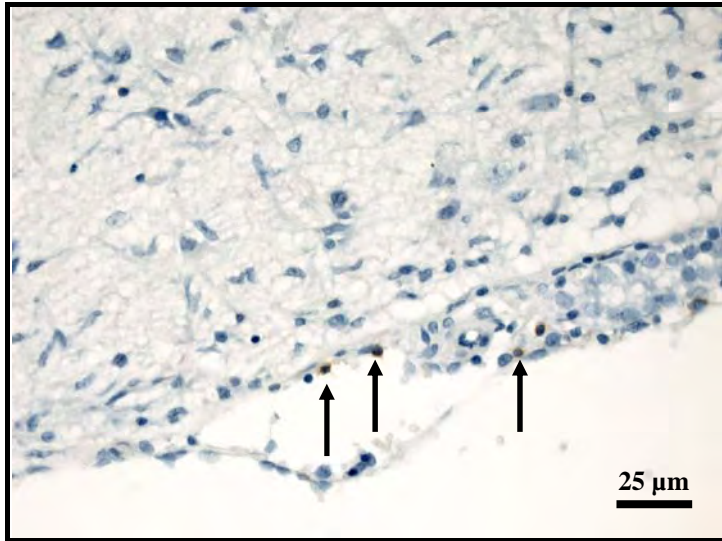


Abbildung 4-25:

Ganz vereinzelt CD8⁺ Zellen im Meninxbereich eines NBAE-Tieres (Pfeile) bei deutlicher Meningitis (VII NBAE.7)

CD8-IHC (DAB)

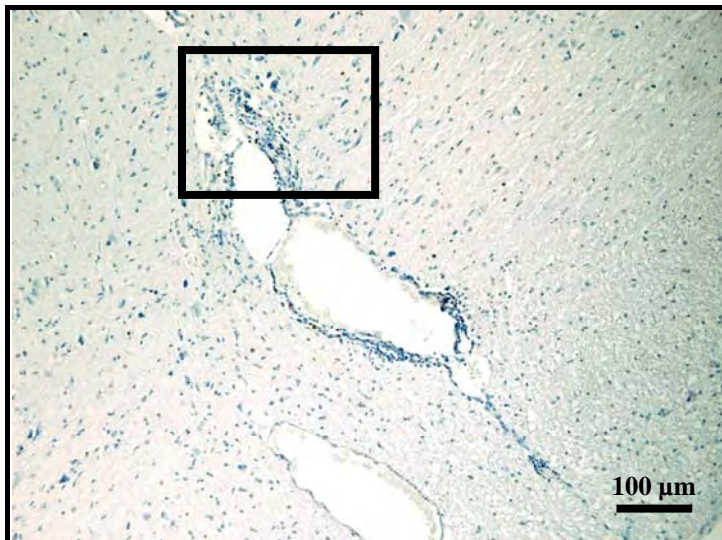


Abbildung 4-26:

CD8⁺ Zellen im Infiltrat eines NBAE-Tieres im Stammhirn (VII NBAE.7)

CD8-IHC (DAB)

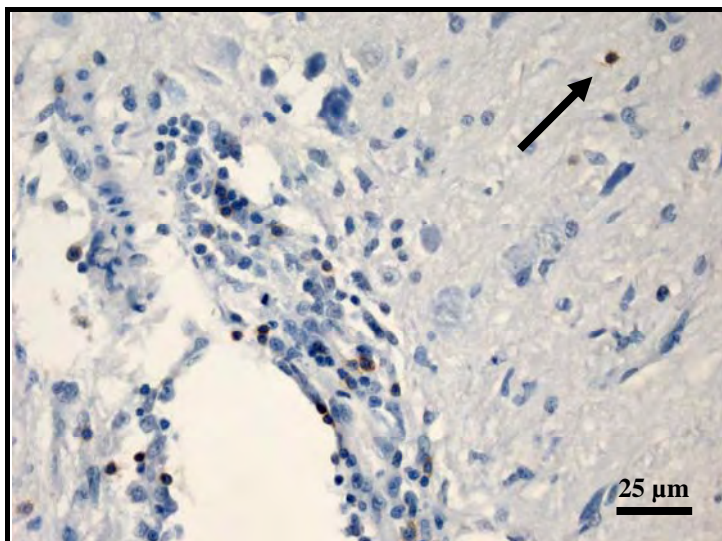


Abbildung 4-27:

Vergrößerung aus Abbildung 4-26, vereinzelt CD8⁺ Zellen im Infiltrat eines NBAE-Tieres im Stammhirn; CD8⁺ Zelle im Gewebe (Pfeil) (VII NBAE.7)

CD8-IHC (DAB)

4.7 Oligodendrozyten

Der Transkriptionsfaktor Olig2, der sowohl in prämaternen als auch in maturen Oligodendrozyten exprimiert wird, wurde als immunhistochemischer Marker für die Bewertung von Zahl, Morphologie und Verteilungsmuster der Oligodendrozyten eingesetzt (LU *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2000; YOKOO *et al.*, 2004). Olig2 gehört zur Gruppe der Basischen Helix-Loop-Helix- (bHLH-) Faktoren. Olig1 und Olig2 repräsentieren in dieser Gruppe oligodendrozytenspezifische Transkriptionsfaktoren, die ausschließlich die Spezifizierung der Oligodendrozyten steuern (LU *et al.*, 2000; TAKEBAYASHI *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2000; TEKKE-KESSARIS *et al.*, 2001). Mit den konventionellen myelinspezifischen Markern, wie beispielsweise MBP, ist eine Unterscheidung der Oligodendrozyten-Zellkörper von den direkt entspringenden Myelinscheiden nicht möglich (SZUCHET, 1995). Der Olig2-Antikörper markiert Zellkerne von maturen und immaturnen Oligodendrozyten und ermöglicht dadurch eine genaue morphologische Beurteilung von Zellzahl, Zellanordnung und Zellform der Oligodendrozyten. Die Intensität der Färbung korreliert mit dem Gehalt an Olig2.

Im Corpus callosum war es möglich, aufgrund der hohen Oligodendrozytenzahlen eine morphologische Beurteilung der Zellen vorzunehmen. Lichtmikroskopisch wurde auf Form und Größe der Zellkerne, Veränderungen der Kernstruktur, Kondensation der Zellkerne und Zellpyknose geachtet. Im Corpus callosum wurden Verteilungsmuster und Anordnung der Oligodendrozyten überprüft. Ergänzt wurde die Untersuchung durch eine Zählung der Oligodendrozyten in einem definierten Gesichtsfeld. Die Ergebnisse der Olig2-Immunhistochemie sind in **Tabelle 4-17** aufgeführt. Aufgrund der Altersabhängigkeit der Myelinisierung wurde die Tabelle nach dem Lebensalter der untersuchten Tiere sortiert.

Tabelle 4-17: Ergebnisse der Olig2-Immunhistochemie

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Anzahl Olig2 ⁺ Zellen	Olig2 ⁺ dunkel	Anzahl Cluster	Morphologie	Grad
12 NBAE.1	500	7	n.d.	n.d.	0	o.b.B.	-
11 NBAE.1	500	11	113	33	0	o.b.B.	-

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-17: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Anzahl Olig2 ⁺ Zellen	Olig2 ⁺ dunkel	Anzahl Cluster	Morphologie	Grad
19 NBAE.1	1000	28	245	5	5	o.b.B.	+
19 NBAE.2	1000	28	n.d.	n.d.	6	längliche, vergrößerte Zellen	++
19 NBAE.3	1000	28	215	42	7	vergrößerte Zellen	++
19 NBAE.4	1000	28	n.d.	n.d.	0	o.b.B.	-
19 NBAE.5	1000	28	n.d.	n.d.	11	bizarre Zellformen, kleine Cluster	+++
BDV neg 4 Wo	-	28	n.d.	n.d.	2	o.b.B.	-
Lewis NL-1	-	30	182	17	0	o.b.B.	-
Lewis NL-2	-	30	n.d.	n.d.	2	o.b.B.	-
Lewis NL-3	-	30	183	22	3	o.b.B.	-
Lewis NL-4	-	30	131	13	0	o.b.B.	-
BDV neg 6 Wo	-	42	n.d.	n.d.	0	o.b.B.	-
BDV neg 8 Wo	-	56	n.d.	n.d.	1	o.b.B.	-
VIII NBAE.7	400	90	n.d.	n.d.	2	o.b.B.	-
IX NBAE.3	400	90	n.d.	n.d.	4	o.b.B.	-
X NBAE.1	400	90	n.d.	n.d.	0	o.b.B.	-
X NBAE.4	400	90	n.d.	n.d.	10	innerhalb der Cluster vermehrt abgeflachte Zellformen und Olig2 ⁺ Zellen mit markanter Anfärbung	++
X S.5	-	90	n.d.	n.d.	0	o.b.B.	-
0 Mutter	-	105	n.d.	n.d.	6	innerhalb der Cluster abgeflachte Zellformen	++
VI NBAE.1	200	110	199	10	0	o.b.B.	-

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-17: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Anzahl Olig2 ⁺ Zellen	Olig2 ⁺ dunkel	Anzahl Cluster	Morphologie	Grad
VI NBAE.2	200	110	199	14	5	innerhalb der Cluster große Zellen mit spongiformem Zellkern	++
VI NBAE.3	200	110	294	16	2	innerhalb der Cluster Zellkerne dunkelbraun und Zellen morphologisch verändert	+
VI NBAE.4	200	110	145	8	0	o.b.B.	-
VII NBAE.1	200	110	182	18	3	morphologisch auffällige Zellen	+
VII NBAE.2	200	110	142	7	1	o.b.B.	-
VII NBAE.3	200	110	206	14	0	o.b.B.	-
VII NBAE.4	200	110	195	15	7	innerhalb der Cluster längliche Zellformen	++
VII NBAE.5	200	110	228	9	1	o.b.B.	-
VII NBAE.6	200	110	213	8	7	o.b.B.	+
VII NBAE.7	200	110	212	9	11	vergrößerte Zellkerne, zum Teil spongiforme Kernstruktur	+++
VII S.8	-	110	119	9	0	o.b.B.	-
VII S.9	-	110	156	12	2	o.b.B.	-
II Mutter	-	270	n.d.	n.d.	3	o.b.B.	-
0 NBAE.1	500	310	221	9	1	o.b.B.	-
0 NBAE.2	500	310	231	24	9	innerhalb der Cluster vergrößerte Zellen sowie abgeflachte Zellformen	++
0 NBAE.3	500	310	258	29	3	Zellformen atypisch (länglich, fast keine runden Zellen)	+
0 NBAE.6	500	310	330	12	5	o.b.B.	+

Tabelle 4-17: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Anzahl Olig2 ⁺ Zellen	Olig2 ⁺ dunkel	Anzahl Cluster	Morphologie	Grad
VIII NBAE.3	400	450	178	76	8	innerhalb der Cluster vermehrt Olig2 ⁺ Zellen mit markanter Anfärbung, längliche Zellformen	++
11 NBAE.11	500	640	n.d.	n.d.	6	innerhalb der Cluster vermehrt Olig2 ⁺ Zellen mit markanter Anfärbung	++
0 NBAE.4	500	690	309	64	15	spongiforme Kernstruktur, längliche Zellformen	+++
IX NBAE.4	400	740	n.d.	n.d.	12	bizarre Zellformen, kleine Cluster	+++

d = Tage; n.d. = nicht durchgeführt

grün = BDV-negative Tiere

orange = Tiere mit Infiltraten

+ = morphologische Abweichungen; + = 5-10 Cluster; ++ = 11-15 Cluster

Der Gesamtgrad ergibt sich durch Addition der Einzelbewertungen

Da sich die Oligodendrozytenzahlen im Corpus callosum altersabhängig im Rahmen des Myelinisierungsprozesses verändern, können die Oligodendrozytenzahlen nur bei Tieren gleichen Alters verglichen werden. Bei 110 Tage alten Tieren konnten folgende Befunde ermittelt werden: Bei neun BDV-positiven Tieren ergab sich ein Mittelwert von 214 Oligodendrozyten ($\bar{x} = 214$, $s = 30,73$). Bei drei 110 Tage alten BDV-negativen Tieren wurde ein Mittelwert von 140 Oligodendrozyten errechnet ($\bar{x} = 140$, $s = 15,51$). Somit zeigt sich eine Tendenz für erhöhte Oligodendrozytenzahlen im Corpus callosum bei den BDV-positiven Tieren. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen an untersuchten Tieren gleichen Lebensalters kann hier keine Aussage zur statistischen Signifikanz gemacht werden. Morphologisch veränderte Oligodendrozyten wurden nur bei den NBAE-Tieren nachgewiesen.

Ein gleichmäßiges Verteilungsmuster der Oligodendrozyten mit gleichmäßig großen runden Olig2⁺ Oligodendrozyten fand sich bei folgenden Tieren: *VI NBAE.1*, *VI NBAE.4*, *VII NBAE.2*, *VII NBAE.3*.

Bei folgenden BDV-positiven NBAE-Tieren wurden Zellcluster mit Anhäufungen unterschiedlich großer, zum Teil morphologisch auffälliger Olig2⁺ Oligodendrozyten nachgewiesen (In Klammern wird die Anzahl der Zellcluster im Corpus callosum angegeben):
0 NBAE.1 (1), *0 NBAE.2* (9), *0 NBAE.3* (3), *0 NBAE.4* (15), *0 NBAE.6* (5), *VI NBAE.2* (5), *VI NBAE.3* (2), *VII NBAE.1* (3), *VII NBAE.2* (1), *VII NBAE.4* (7), *VII NBAE.5* (1), *VII NBAE.6* (7), *VII NBAE.7* (11), *VIII NBAE.3* (8).

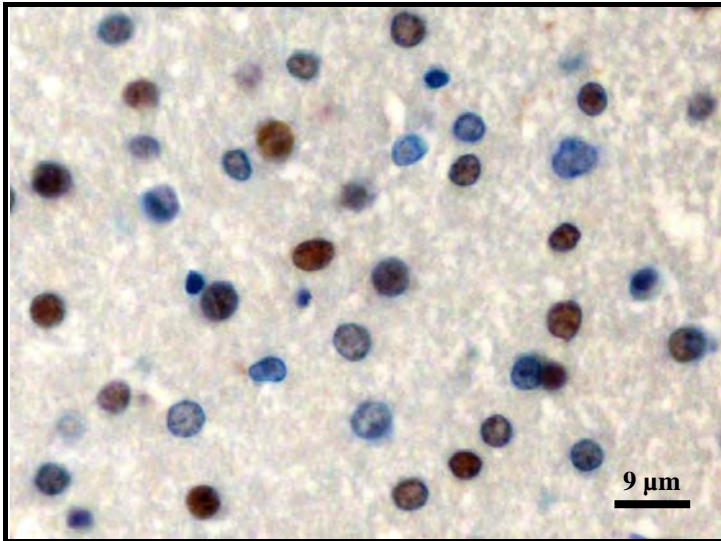


Abbildung 4-28:

Gleichmäßiges Verteilungsmuster
Olig2⁺ Oligodendrozyten im Corpus
callosum eines Kontrolltieres
(*Lewis NL-3*)

Olig2-IHC (DAB)

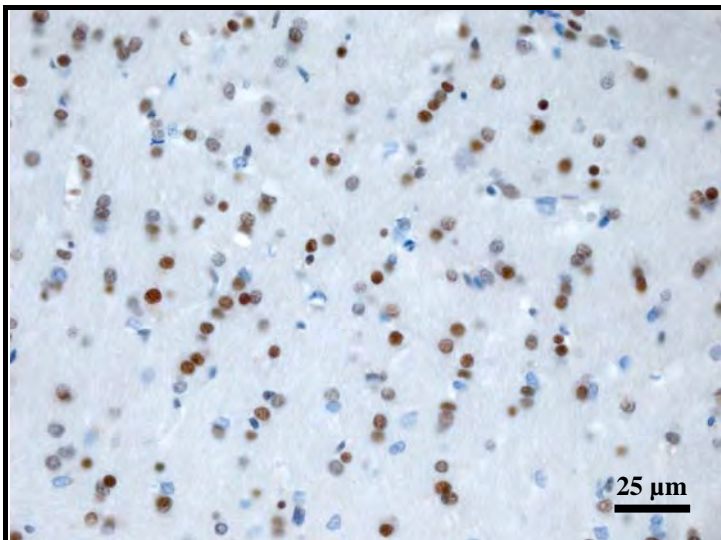


Abbildung 4-29:

Gleichmäßiges Verteilungsmuster
Olig2⁺ Oligodendrozyten im Corpus
callosum eines Kontrolltieres
(*Lewis NL-1*)

Olig2-IHC (DAB)

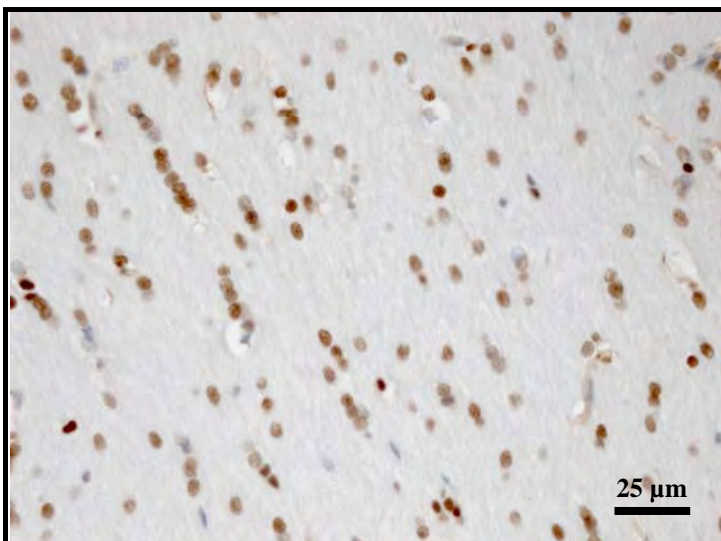


Abbildung 4-30:

Gleichmäßiges Verteilungsmuster
Olig2⁺ Oligodendrozyten im Corpus
callosum eines Sentinels
(*VII S.9*)

Olig2-IHC (DAB)

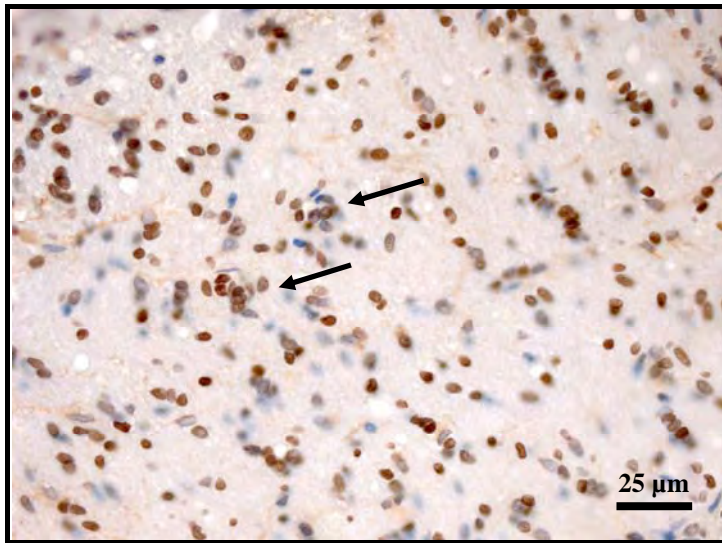


Abbildung 4-31:

Unregelmäßiges Verteilungsmuster Olig2⁺ Oligodendrozyten bei einem NBAE-Tier im Corpus callosum; Oligodendrozyten liegen z.T. in Clustern (Pfeile)
(0 NBAE.4)

Olig2-IHC (DAB)

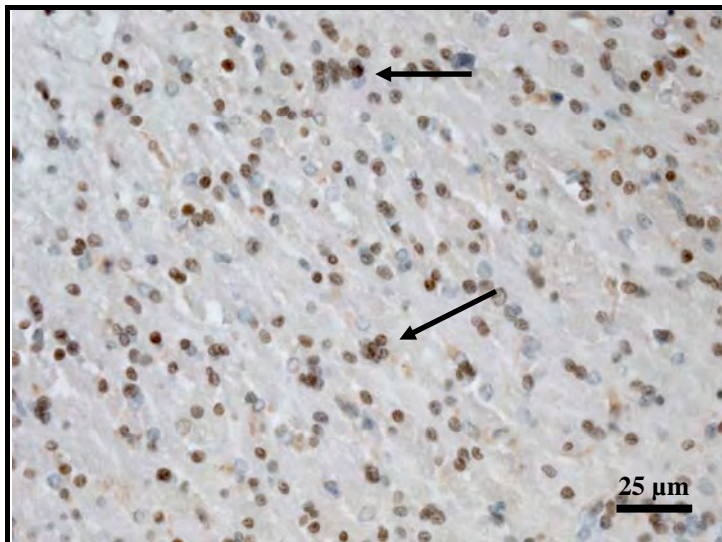


Abbildung 4-32:

Unregelmäßiges Verteilungsmuster Olig2⁺ Oligodendrozyten bei einem NBAE-Tier im Corpus callosum; Oligodendrozyten liegen z.T. in Clustern (Pfeile)
(0 NBAE.6)

Olig2-IHC (DAB)

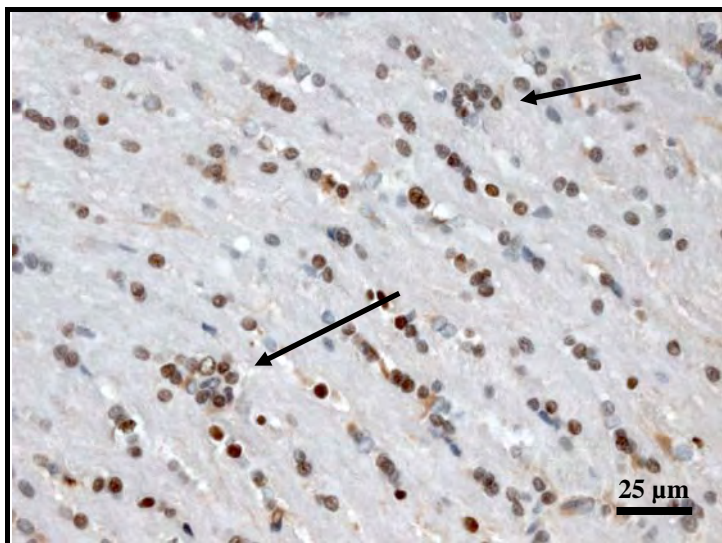


Abbildung 4-33:

Unregelmäßiges Verteilungsmuster bei einem NBAE-Tier im Corpus callosum; Oligodendrozyten liegen z.T. in Clustern (Pfeile); ungleiche Zellgröße und -form der Oligodendrozyten
(VI NBAE.2)

Olig2-IHC (DAB)

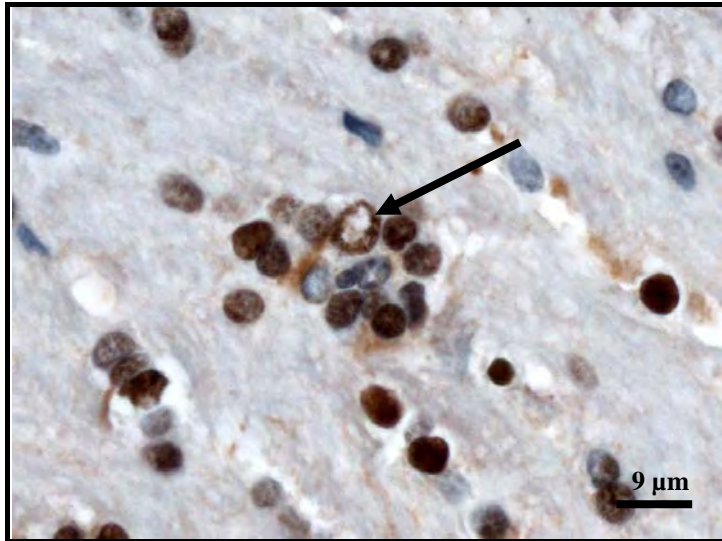


Abbildung 4-34:

Zellschwellung und vakuoläre Kernstruktur eines Oligodendrozyten im Corpus callosum eines NBAE-Tieres (Pfeil); Oligodendrozyten liegen in Zellhaufen (VI NBAE.2)

Olig2-IHC (DAB)

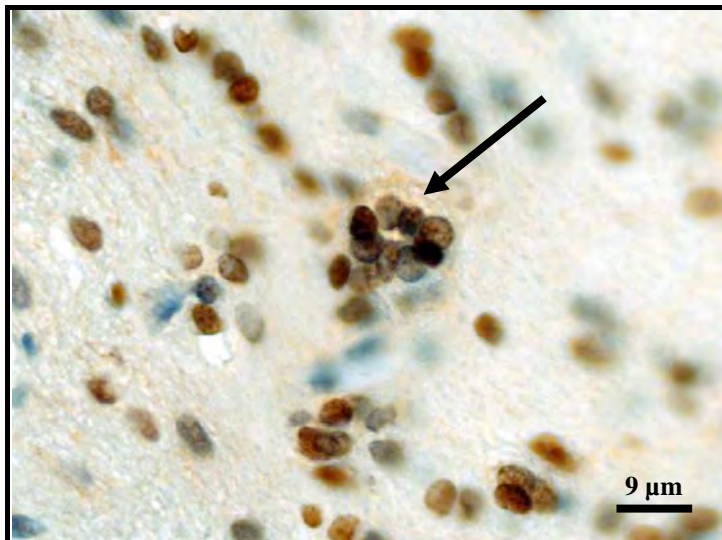


Abbildung 4-35:

Cluster-Bildung im Corpus callosum eines NBAE-Tieres; z.T. abgeflachte Zellkörper; innerhalb des Clusters befinden sich drei Zellen mit markanter Anfärbung (0 NBAE.4)

Olig2-IHC (DAB)

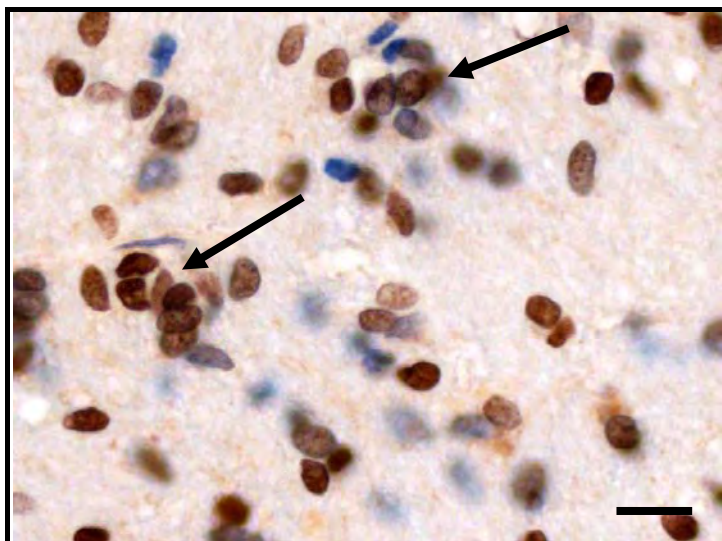


Abbildung 4-36:

Cluster-Bildung im Corpus callosum eines NBAE-Tieres (Pfeile) (0 NBAE.4)

Olig2-IHC (DAB)

4.8 Charakterisierung der Myelinisierung

Die Myelinisierung wurde anhand der SSW-Färbung sowie der immunhistochemischen Reaktionen mit dem MBP-Antikörper ausgewertet. Die SSW-Färbung diente in erster Linie zum Nachweis von intrazellulären Myelinfragmenten. Bei Abbauprozessen von Myelinbestandteilen stellen sich diese in Makrophagen als lipophile kontrastreiche Inhalte dar.

Die Myelinisierung im ZNS findet hauptsächlich postnatal in kaudocranialer Richtung statt. Während der postnatalen Hirnentwicklung ist MBP zunächst im Zytoplasma der Oligodendrozyten angereichert, bevor es im Myelin nachweisbar ist (STERNBERGER *et al.*, 1978). MBP ist ein Hauptvertreter in der Gruppe der Myelinproteine. MBP und das Protolipidprotein (PLP) repräsentieren gemeinsam 60-80% der Myelinproteine. Die MBP-Immunhistochemie gilt daher als sensitives Verfahren, mit dem sowohl die Feinstruktur der Myelinfasern als auch die Quantität der Myelinsubstanz anhand der Farbintensität bewertet werden kann (HASEGAWA *et al.*, 1992). Grundlage für die Auswertungskriterien in der vorliegenden Arbeit waren unter anderem die im etablierten Modell der entorhinalen Cortexläsion beschriebenen Veränderungen der Myelinarchitektur, die eine Unterscheidung zwischen pathologischem und physiologischem Myelin ermöglicht. Die Durchtrennung des Tractus perforans führte in diesem Modell zu einer Denervation des Hippocampus mit Demyelinisierung und anschließender Remyelinisierung. Die einzelnen Stadien von Demyelinisierung und Remyelinisierung wurden lichtmikroskopisch anhand der Dicke und Beschaffenheit der myelinisierten Axone beschrieben. In dieser Studie wurde eine Black-Gold-Färbung eingesetzt, die ebenfalls als sensitive Myelinfärbung gilt (MEIER *et al.*, 2004; MEIER, 2006). Die Beurteilung der Feinstruktur einzelner myelinisierter Fasern ist in Gehirnregionen mit einer hohen Dichte myelinisierter Fasern lichtmikroskopisch nicht möglich. Der Myelinisierungsgrad in Kleinhirnmark und Corpus callosum kann jedoch quantitativ anhand der Farbintensität nach MBP-Immunhistochemie kategorisiert werden (HAMANO *et al.*, 1996).

Auf der Grundlage dieser Studien wurde ein Bewertungsschema zur Charakterisierung der Myelinisierung erstellt. Hierbei wurden sowohl die Kontinuität der myelinisierten Axone, die Dicke der einzelnen Fasern als auch Kennzeichen für pathologisches Myelin wie

perlschnurartige Auftreibungen der Axone berücksichtigt. In Regionen mit hohem Myelingehalt, zu denen das Corpus callosum sowie das Kleinhirnmarch zählen, wurde die Myelinisierung semiquantitativ anhand der Farbintensität kategorisiert. Der Bewertungsschlüssel für die MBP-Immunhistochemie kann **Tabelle 4-18** entnommen werden.

Tabelle 4-18: Auswertungskriterien der MBP-Immunhistochemie

Grad	Kriterien
3	scharf mit Myelin umgrenzte Axone; Myelinscheiden gleichmäßig dick und ohne Unterbrechungen; dunkle und kontrastreiche Anfärbung der Gesamtregion (Corpus callosum, Kleinhirnmarch)
2	geringgradiger Verlust der Kontinuität; myelinisierte Axone dünn und nicht gut abgrenzbar
1	fragmentierte Myelinstruktur; Myelin umgibt das Axon perlschnurartig; verwaschenes Gesamtbild mit nur schwacher Anfärbung des Myelins (Corpus callosum, Kleinhirnmarch)
0	kein Myelin erkennbar in Regionen, die normalerweise myelinisiert sind

Die Myelinisierung wurde nach diesem Bewertungsschlüssel in sieben gewählten ZNS-Regionen getrennt beurteilt. Abschließend wurde der Myelinisierungsgrad für jedes Tier unter Berücksichtigung aller Befunde in den sieben ZNS-Regionen zusammenfassend klassifiziert. Tiere, die beispielsweise geringgradige Abweichungen der Myelinstruktur in maximal zwei Lokalisationen zeigten, wurden mit + bewertet. Erst, wenn perlschnurartige Veränderungen der myelinisierten Axone in mindestens drei Lokalisationen detektiert wurden, ergab dies eine Bewertung mit ++. Die Kriterien für die MBP-Immunhistochemie unter Berücksichtigung aller untersuchten Regionen finden sich in **Tabelle 4-19**.

Tabelle 4-19: Bewertung der MBP-Immunhistochemie bezogen auf alle Regionen

Grad	Kriterien
-	In allen Lokalisationen Bewertung der Myelinisierung mit 3
+	In mindestens einer Region Bewertung der Myelinisierung mit 1 oder 2, in maximal zwei Regionen Bewertung der Myelinisierung mit 1
++	In mindestens drei Regionen Bewertung der Myelinisierung mit 1, in keiner Lokalisation Bewertung der Myelinisierung mit 0
+++	In mindestens einer Lokalisation Bewertung der Myelinisierung mit 0

Die Ergebnisse der MBP-Immunhistochemie bei den BDV-positiven NBAE-Tieren werden in **Tabelle 4-20** aufgeführt.

Tabelle 4-20: Ergebnisse der MBP-Immunhistochemie bei den NBAE-Tieren

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	B	C	Cc	Hc	MH	StH	KHM	Grad
12 NBAE.1*	500	7	0	0	1	0	0	1	1	+++
11 NBAE.1*	500	11	0	0	1	0	0	1	1	+++
19 NBAE.1	1000	28	2	1	1	0	2	3	3	+++
19 NBAE.2	1000	28	n.v.	1	1	1	2	2	1	++
19 NBAE.3	1000	28	1	1	1	1	2	1	1	++
19 NBAE.4	1000	28	n.v.	3	3	2	n.v.	3	3	+
19 NBAE.5	1000	28	2	1	1	2	2	2	1	++
VIII NBAE.7	400	90	2	3	3	3	3	3	1	+
IX NBAE.3	400	90	1	2	1	1	2	1	1	++
X NBAE.1	400	90	3	2	1	3	3	3	3	+
X NBAE.4	400	90	3	2	3	2	3	3	3	+

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-20: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	B	C	Cc	Hc	MH	StH	KHM	Grad
VI NBAE.1	200	110	2	2	1	2	3	1	1	++
VI NBAE.2	200	110	2	2	3	2	3	3	3	+
VI NBAE.3	200	110	3	1	1	2	3	2	3	+
VI NBAE.4	200	110	2	2	1	2	3	3	1	+
VII NBAE.1	200	110	n.a.	2	1	2	2	3	1	+
VII NBAE.2	200	110	3	3	3	3	3	3	n.v.	-
VII NBAE.3	200	110	2	2	1	2	3	3	3	+
VII NBAE.4	200	110	1	2	1	2	2	2	1	++
VII NBAE.5	200	110	n.a.	2	1	2	3	3	1	+
VII NBAE.6	200	110	2	1	1	1	2	1	1	++
VII NBAE.7	200	110	1	1	1	2	1	1	1	++
0 NBAE.1	500	310	n.v.	1	1	2	2	1	1	++
0 NBAE.2	500	310	3	2	1	0	1	1	1	+++
0 NBAE.3	500	310	2	1	1	1	2	2	1	++
0 NBAE.6	500	310	1	1	1	1	1	1	1	++
VIII NBAE.3	400	450	2	1	3	2	2	3	3	+
11 NBAE.11	500	640	2	2	3	2	2	3	1	+
0 NBAE.4	500	690	3	2	1	2	2	1	3	+
IX NBAE.4	400	740	3	2	1	2	2	1	1	++

Dosis in µl (10⁶ ffu/ml); d = Tage; B = Bulbus olfactorius; C = Cortex; Cc = Corpus callosum; Hc = Hippocampus; MH = Mittelhirn; StH = Stammhirn; KH = Kleinhirnm; n.a. = nicht auswertbar; n.v. = nicht vorhanden; * Tiere mit noch nicht abgeschlossener Myelinisierung

 = BDV-negative Tiere

 = Tiere mit Infiltraten

Auswertung der MBP-Immunhistochemie nach den Kriterien in Tabelle 4-18:

4 - Ergebnisse

- 0** = kein Nachweis von MBP
- 1** = schwache Anfärbung, fragmentierte Struktur
- 2** = ggr. Kontinuitätsverlust, myelinisierte Axone dünn
- 3** = gleichmäßige dunkle Anfärbung

In Regionen mit einem hohen Myelinanteil wurden die deutlichsten Abweichungen gefunden. Im Corpus callosum fand sich bei 15 der untersuchten BDV-positiven NBAE-Tiere eine deutlich verminderte Anfärbbarkeit mit dem MBP-Antikörper im Vergleich zu den Negativ-Kontrolltieren.

Tabelle 4-21: Ergebnisse der MBP-Immunhistochemie bei Müttern, Sentinels und Kontrolltieren

Tier	Alter	B	C	Cc	Hc	MH	StH	KHM	Grad
0 Mutter	105	2	2	1	2	3	3	3	+
11 Mutter	270	2	2	1	2	2	1	1	++
VII S.8	110	3	3	3	3	3	3	3	-
VII S.9	110	3	3	3	3	3	3	3	-
X S.5	90	3	3	3	2	3	3	3	+
BDV neg 4 Wo	28	3	3	3	3	3	3	3	-
BDV neg 6 Wo	42	3	3	3	3	3	3	3	-
BDV neg 8 Wo	56	3	3	3	3	3	3	3	-
Lewis NL-1	30	3	3	3	3	3	3	3	-
Lewis NL-2	30	3	3	3	3	3	3	3	-
Lewis NL-3	30	3	3	3	3	3	3	1	+
Lewis NL-4	30	3	3	3	3	3	3	3	-

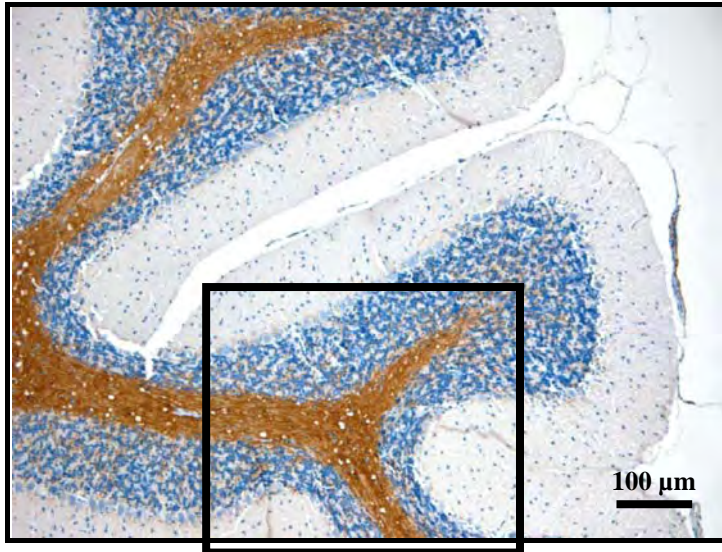


Abbildung 4-37:

MBP-Immunhistochemie im Kleinhirn eines Sentinels; das Kleinhirnmark ist gleichmäßig dunkel angefärbt
Bewertung: 3
(X S.5)

MBP-IHC (DAB)

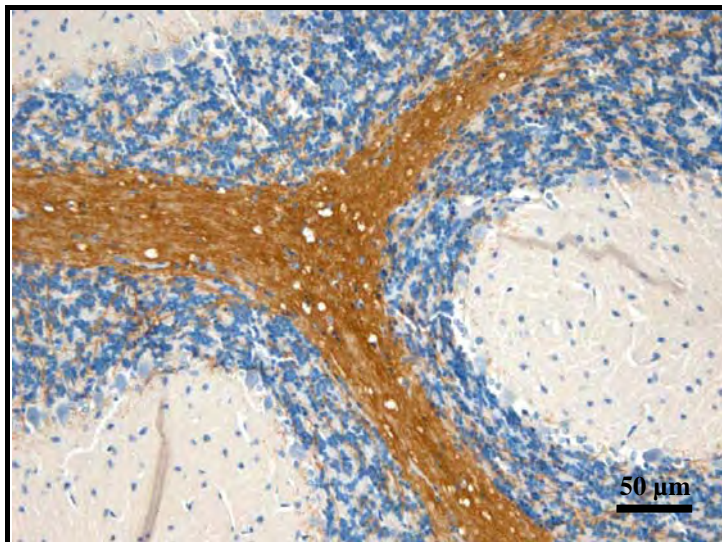


Abbildung 4-38:

Vergrößerung aus Abbildung 4-37
(X S.5)

MBP-IHC (DAB)

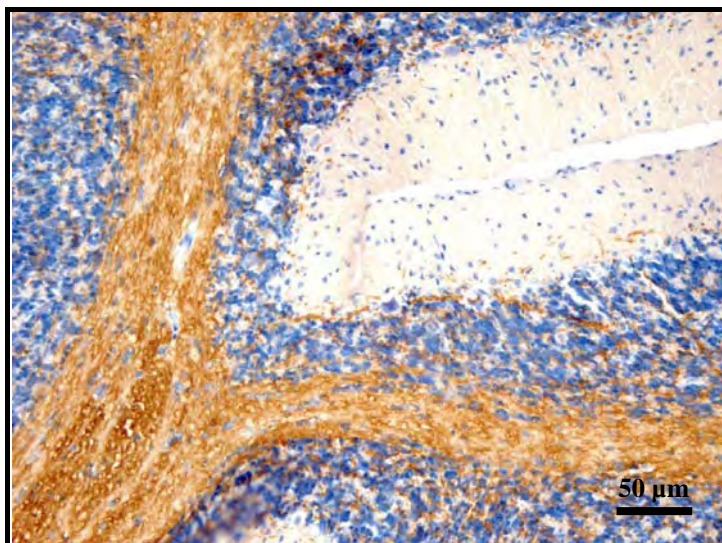


Abbildung 4-39:

Generalisierte Demyelinisierung im Kleinhirnmark eines NBAE-Tieres; Gewebestruktur erscheint aufgelockert
Bewertung: 1
(0 NBAE.1)

MBP-IHC (DAB)

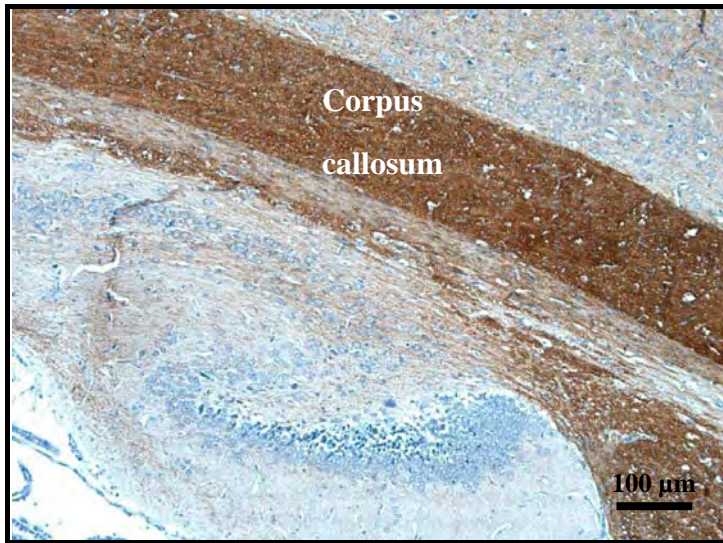


Abbildung 4-40:

Corpus callosum eines Kontrolltieres, Gewebe erscheint dicht myelinisiert
Bewertung: 3
(*BDV neg 8 Wo*)

MBP-IHC (DAB)

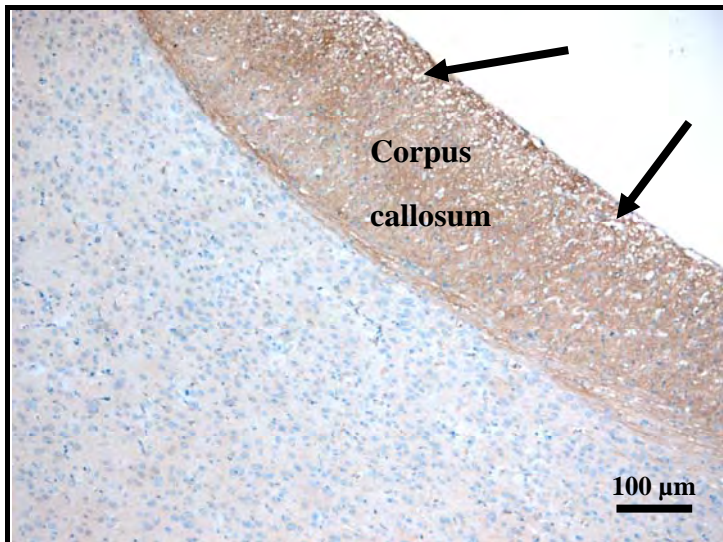


Abbildung 4-41:

Corpus callosum eines NBAE-Tieres, schwache Anfärbung mit dem MBB-AK, vakuoläre Struktur besonders in den Randbezirken (Pfeile)
Bewertung: 1
(*0 NBAE.1*)

MBP-IHC (DAB)

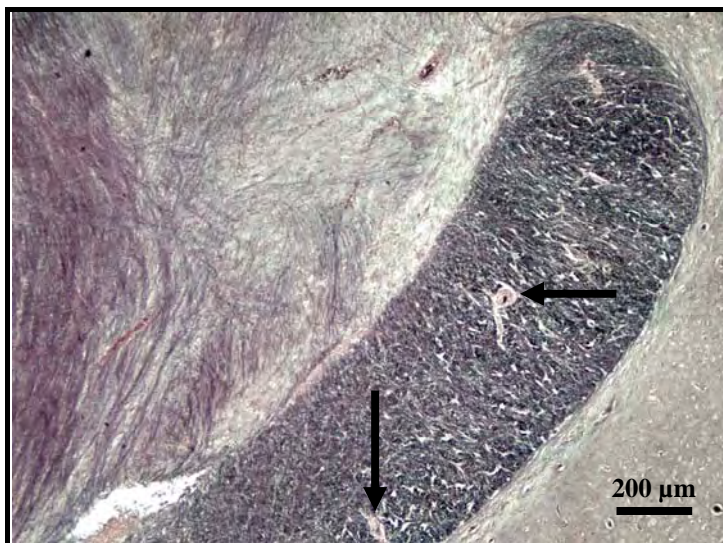


Abbildung 4-42:

Corpus callosum eines NBAE-Tieres mit Meningoenzephalitis; Infiltrate im Corpus callosum (Pfeile)
(*VII NBAE.7*)

SSW-Färbung

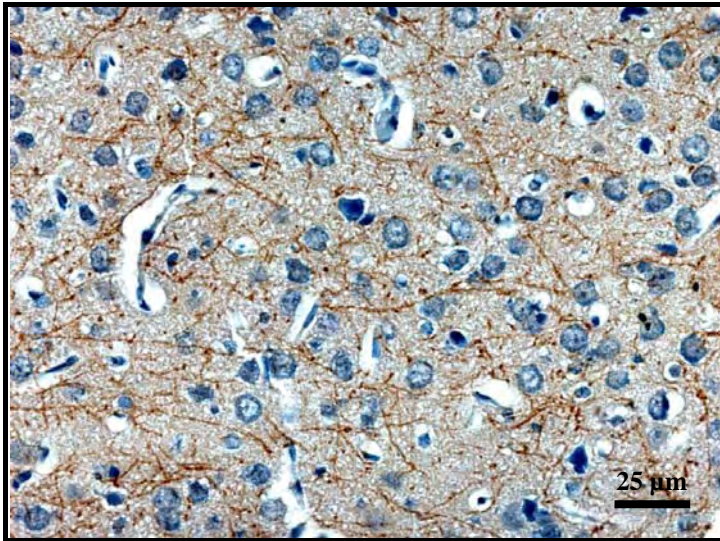


Abbildung 4-43:

Myelinisierte Axone im Cortex eines Kontrolltieres, myelinisierte Axone lassen sich über weite Strecken verfolgen, sie sind gleichmäßig dick und ohne Unterbrechungen
Bewertung: 3
(BDV neg 8Wo)
MBP-IHC (DAB)

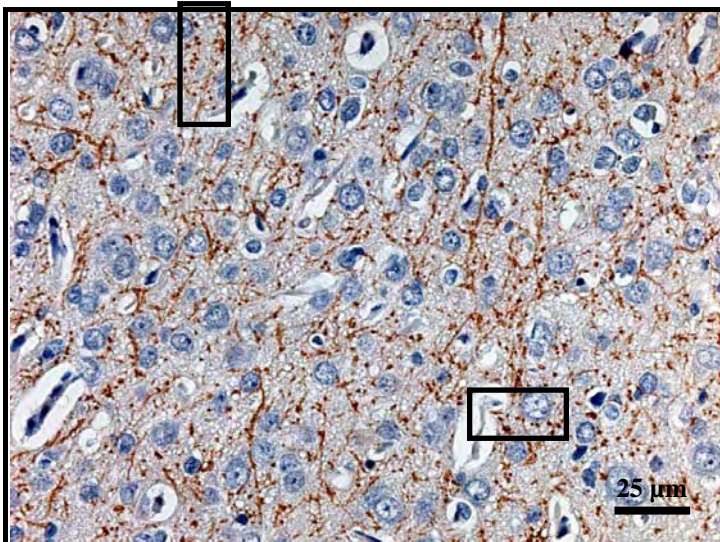


Abbildung 4-44:

Myelinisierte Axone im Cortex eines NBAE-Tieres; Axone mit perlstrungetartigen Auftreibungen sind in den Kästchen eingerahmt
Bewertung: 1
(0 NBAE.3)

MBP-IHC (DAB)

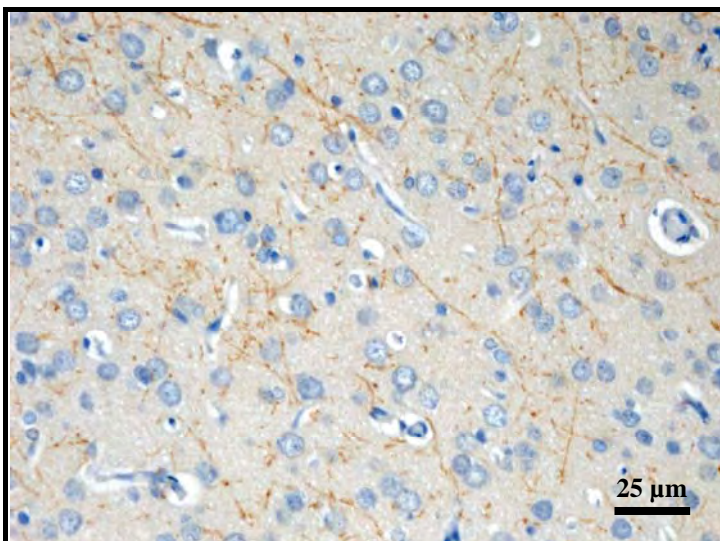


Abbildung 4-45:

Myelinisierte Axone im Cortex eines NBAE-Tieres; streckenweise Verlust der Myelinsubstanz; perlstrungetartige Auftreibungen
Bewertung: 1
(0 NBAE.1)

MBP-IHC (DAB)

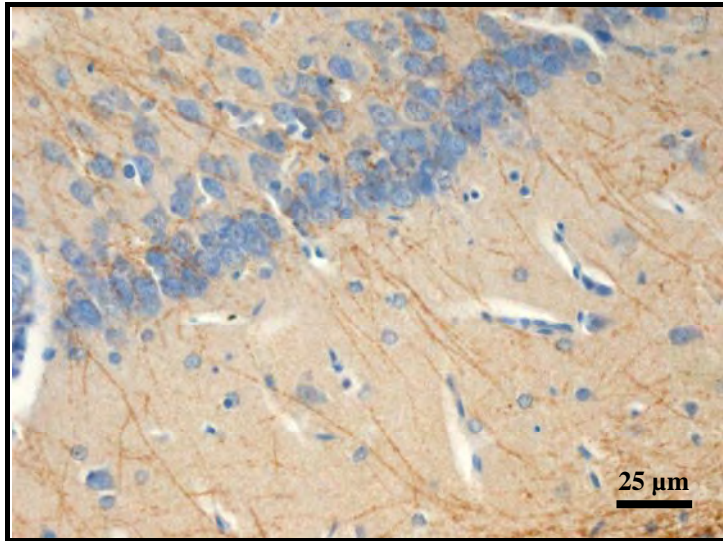


Abbildung 4-46:

Hippocampus eines Kontrolltieres; Neuronen erscheinen morphologisch intakt; die Markfasern sind braun angefärbt und durchziehen dicht liegend und gleichmäßig das CA-Feld (*Lewis NL-2*)

MBP-IHC (DAB)

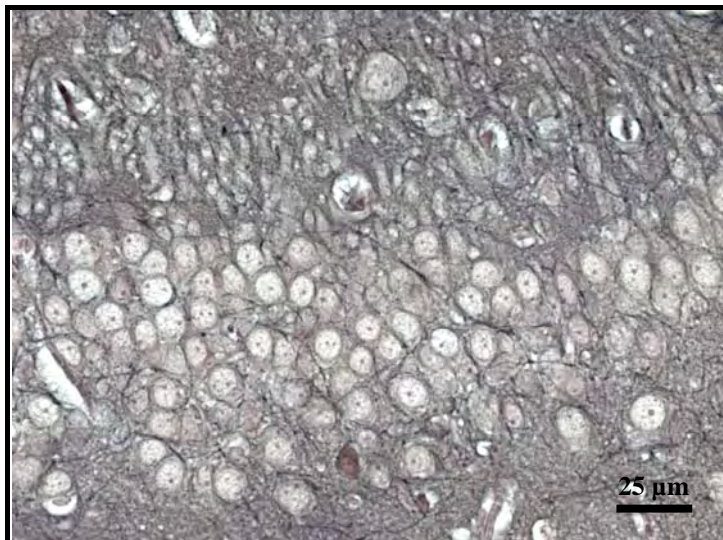


Abbildung 4-47:

Hippocampus eines BDV-negativen NBAE-Tieres; Neuronen erscheinen morphologisch intakt; die Markfasern sind schwarz angefärbt und durchziehen dicht liegend und gleichmäßig das CA-Feld (*X NBAE.1*)

SSW-Färbung

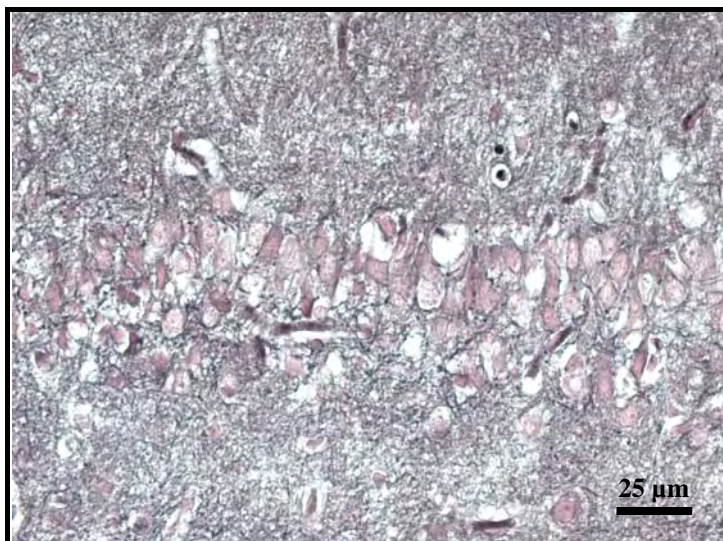


Abbildung 4-48:

Hippocampus eines NBAE-Tieres; deutlicher Texturverlust der Neuronenschicht, myelinisierte Axone sind schlecht abgrenzbar (*X NBAE.4*)

SSW-Färbung

4.9 Gesamtübersicht

Das Corpus callosum wurde aufgrund der ausgesprochen hohen Oligodendrozytenzahl sowie aufgrund der Nähe zum Hippocampus als Struktur besonders bewertet.

Tabelle 4-22: Übersicht über Veränderungen im Corpus callosum

Tier	Dosis	Alter	p38 (%)	p24 (%)	ED1	IZ	Olig2	MBP
12 NBAE.1	500	7	0	0	+	-	-	1
11 NBAE.1	500	11	0	0	+	-	-	1
19 NBAE.1	1000	28	35	30	+++	+++	+	1
19 NBAE.2	1000	28	55	40	++	++	++	1
19 NBAE.3	1000	28	33	30	+++	++	++	1
19 NBAE.4	1000	28	0	0	+	-	-	3
19 NBAE.5	1000	28	35	30	+	+++	+++	1
BDV neg 4 Wo	-	28	0	0	+	-	-	3
Lewis NL-1	-	30	0	0	+	-	-	3
Lewis NL-2	-	30	0	0	+	-	-	3
Lewis NL-3	-	30	0	0	+	-	-	3
Lewis NL-4	-	30	0	0	+	-	-	3
BDV neg 6 Wo	-	42	0	0	+	-	-	3
BDV neg 8 Wo	-	56	0	0	+	-	-	3
VIII NBAE.7	400	90	15	12	++	-	-	3
IX NBAE.3	400	90	35	8	++	-	-	1
X NBAE.1	400	90	0	0	+	-	-	1
X NBAE.4	400	90	20	15	+++	-	++	3
X S.5	-	90	0	0	+	-	-	3

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-22: (Fortsetzung)

Tier	Dosis	Alter	p38 (%)	p24 (%)	ED1	IZ	Olig2	MBP
0 Mutter	-	105	30	12	+++ fk	+++	++	1
VI NBAE.1	200	110	15	12	++	-	-	1
VI NBAE.2	200	110	2	17	++	-	++	3
VI NBAE.3	200	110	1	8	++	-	+	1
VI NBAE.4	200	110	0	0	+	-	-	1
VII NBAE.1	200	110	7	7	+	-	+	1
VII NBAE.2	200	110	0	0	+	-	-	3
VII NBAE.3	200	110	20	30	++	-	-	1
VII NBAE.4	200	110	10	5	++	+++	++	1
VII NBAE.5	200	110	30	28	+	-	-	1
VII NBAE.6	200	110	10	12	++	-	+	1
VII NBAE.7	200	110	1	22	+++++ fk	+++	+++	1
VII S.8	-	110	0	0	+	-	-	3
VII S.9	-	110	0	0	+	-	-	3
11 Mutter	-	270	0	0	+++++	+++	-	1
0 NBAE.1	500	310	10	25	+	-	-	1
0 NBAE.2	500	310	13	46	++ fk	-	++	1
0 NBAE.3	500	310	5	4	++	-	+	1
0 NBAE.6	500	310	48	65	++	-	+	1
VIII NBAE.3	400	450	30	3	++	-	++	3
11 NBAE.11	500	640	10	15	++	-	++	3
0 NBAE.4	500	690	3	5	++	-	+++	1
IX NBAE.4	400	740	35	22	+	-	+++	1

4 - Ergebnisse

Zur anschaulichen Überprüfung einer Korrelation der erhobenen Befunde werden die Ergebnisse in der **Tabelle 4-23** zusammenfassend dargestellt. Negative Befunde sind grün hervorgehoben, pathologische Befunde geringen Grades sind gelb markiert, deutlich pathologische Befunde sind rot dargestellt.

Tabelle 4-23: Gesamtübersicht

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Klinik	PCR	AK	PC	p38	p24	ED1	IZ	Olig	MBP
12 NBAE.1	500	7	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	-	-	+	-	-	+++*
11 NBAE.1	500	11	n.d.	pos	n.d.	n.a.	+	+	+++	-	-	+++*
19 NBAE.1	1000	28	-	n.d.	n.d.	o.b.B.	+++	++	+++	++	+	+++
19 NBAE.2	1000	28	-	n.d.	n.d.	o.b.B.	+++	++	++	++	++	++
19 NBAE.3	1000	28	-	n.d.	n.d.	o.b.B.	+++	++	+++	++	++	++
19 NBAE.4	1000	28	-	n.d.	n.d.	o.b.B.	-	-	+	-	-	+
19 NBAE.5	1000	28	-	n.d.	n.d.	o.b.B.	++	+++	++	+++	+++	++
BDVneg4Wo	-	28	-	neg	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
Lewis NL-1	-	30	-	neg	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
Lewis NL-2	-	30	-	neg	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
Lewis NL-3	-	30	-	neg	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	+
Lewis NL-4	-	30	-	neg	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
BDVneg6Wo	-	42	-	neg	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
BDVneg8Wo	-	56	-	neg	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
VIII NBAE.7	400	90	+	pos	160	↓	+++	++	++	-	-	+
IX NBAE.3	400	90	+	pos	5000	↓	+++	++	++	-	-	++
X NBAE.1	400	90	-	pos	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	+
X NBAE.4	400	90	+	pos	2500	↓	++	+++	+++	-	++	+

4 - Ergebnisse

Tabelle 4-23: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Klinik	PCR	AK	PC	p38	p24	ED1	IZ	Olig	MBP
X S.5	-	90	n.d.	pos	n.d.	o.b.B.	-	-	+	-	-	+
0 Mutter	-	105	+	n.d.	160	o.b.B.	++	++	+++	+++	++	+
VI NBAE.1	200	110	+	pos	2500	↓	+++	++	++	-	-	++
VI NBAE.2	200	110	-	pos	2500	↓	+++	+++	++	-	++	+
VI NBAE.3	200	110	+	n.d.	2500	↓	++	++	+++	-	+	+
VI NBAE.4	200	110	n.d.	pos	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	+
VII NBAE.1	200	110	+	pos	<40	↓	+++	++	++	-	+	+
VII NBAE.2	200	110	-	neg	<40	o.b.B.	+	+	+	-	-	-
VII NBAE.3	200	110	+	pos	1280	↓	+++	+++	+++	-	-	+
VII NBAE.4	200	110	+	neg	160	↓	++	++	+++	+++	++	++
VII NBAE.5	200	110	-	pos	<40	↓	+++	++	++	-	-	+
VII NBAE.6	200	110	+	pos	320	↓	+++	++	+++	-	+	++
VII NBAE.7	200	110	+	neg	<40	o.b.B.	+++	++	+++	+++	+++	++
VII S.8	-	110	-	pos	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
VII S.9	-	110	-	pos	<40	o.b.B.	-	-	+	-	-	-
11 Mutter	-	270	+	neg	640	o.b.B.	-	-	+++	+++	-	++
0 NBAE.1	500	310	+	pos	<40	↓	++	+++	++	-	-	++
0 NBAE.2	500	310	+++	pos	1280	↓	++	++	++	-	++	+++
0 NBAE.3	500	310	+	pos	2500	↓	++	++	++	-	+	++
0 NBAE.6	500	310	+	pos	2500	↓	+++	+++	++	-	+	++
VIII NBAE.3	400	455	-	pos	<40	↓	+++	++	++	-	++	+
11 NBAE.11	500	640	+	n.d.	<40	↓	+++	++	++	-	++	+

Tabelle 4-23: (Fortsetzung)

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Klinik	PCR	AK	PC	p38	p24	ED1	IZ	Olig	MBP
0 NBAE.4	500	700	-	pos	<40	↓	++	+++	++	-	+++	+
IX NBAE.4	400	740	+	n.d.	<40	↓	+++	+++	++	-	+++	++

Dosis in µl (10⁶ ffu/ml); d = Tage; n.a. = nicht auswertbar; n.d. = nicht durchgeführt; * = Tiere mit noch nicht abgeschlossener Myelinisierung

Klinik:

- = keine klinischen Symptome
- + = leichte bis mittelgradige klinische Symptome
- +++ = schwere Krankheitssymptome

PCR:

- neg = negative PCR
- pos = positive PCR

AK:

- grün = AK-Titer < 40
- gelb = AK-Titer zwischen 40 und 640
- rot = AK-Titer > 640

PC (Purkinje-Zelldichte):

- o.b.B. = ohne besonderen Befund
- ↓ = deutlich weniger Purkinje-Zellen als bei den Kontrolltieren

p38 / p24:

- = in keiner Lokalisation p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen
- + = in allen Lokalisationen weniger als 10% p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen
- ++ = in allen Lokalisationen weniger als 60% p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen, in mindestens einer Region mehr als 10% p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen
- +++ = in mindestens einer Lokalisation 60% oder mehr als 60% p38⁺ bzw. p24⁺ Zellen

ED1:

+ = < 10 ED1⁺ Zellen; ++ = 10-50 ED1⁺ Zellen; +++ = > 50 ED1⁺ Zellen

Der Gesamtgrad entspricht der Höchstbewertung unter Berücksichtigung aller untersuchten Regionen

fk = fokal

IZ (Immunzellen: CD45RC und CD8):

Auswertung nach den Kriterien in Kapitel 4-6


Olig (Oligodendrozyten):


Auswertung im Corpus callosum:


+ = morphologische Abweichungen; + = 5-10 Cluster; ++ = 11-15 Cluster


Der Gesamtgrad ergibt sich durch Addition der Einzelbewertungen

MBP:

 = in allen Lokalisationen Bewertung der Myelinisierung mit 3

 = in mindestens einer Region Bewertung der Myelinisierung mit 1 oder 2, in maximal zwei Regionen Bewertung der Myelinisierung mit 1

 = in mindestens drei Regionen Bewertung der Myelinisierung mit 1, in keiner Lokalisation Bewertung der Myelinisierung mit 0

 = in mindestens einer Lokalisation Bewertung der Myelinisierung mit 0

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte das Modell der neonatal aerogen BDV infizierten Lewis Ratte unter besonderer Berücksichtigung der Oligodendrozyten und ihrer Hauptfunktion, der Myelinisierung des ZNS, charakterisiert werden.

Oligodendrozyten spielen bei der klassischen BD nur eine untergeordnete Rolle. Daher ist den Oligodendrozyten bisher nur wenig Beachtung geschenkt worden. Bei neugeborenen BDV infizierten Ratten breitet sich das Virus jedoch generalisiert im ZNS aus, neben Neuronen sind bei diesen Tieren auch Oligodendrozyten, Astrozyten, Schwannzellen und Ependymzellen involviert (NARAYAN *et al.*, 1983b; HERZOG *et al.*, 1984; CARBONE *et al.*, 1989, 1991a; DESCHL *et al.*, 1990; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; STITZ *et al.*, 1998). In Zellkultur sind Oligodendrozyten ebenfalls sehr gut für die Replikation des BDV geeignet, so dass diese Zellpopulation häufig in der Bornavirusforschung eingesetzt wird (PAULI und LUDWIG, 1985; PLANZ *et al.*, 2001b; IBRAHIM *et al.*, 2002; SAUDER *et al.*, 2004). Da das Virus allgemein als nicht-zytopathogen eingestuft wird, werden die Effekte, die durch das Virus ausgelöst werden, auf eine funktionelle Beeinflussung infizierter Zellen zurückgeführt (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 1997b, 2000; HANS *et al.*, 2004; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2005).

Stoffwechselprozesse infizierter Zellen können durch Expression eines einzigen Virusproteins beeinträchtigt werden. Einflüsse des BDV-Proteins P konnten beispielsweise am Modell transgener Mäuse, die das Phosphoprotein in Astrozyten exprimieren, aufgezeigt werden. Eine alleinige Expression von P führte über eine kompetitive Störung von Phosphorylierungsprozessen zu einer hirnorganischen Erkrankung mit einer Manifestation von Verhaltensauffälligkeiten (KAMITANI *et al.*, 2003). Insofern scheint es interessant, Wechselwirkungen zwischen Borna-Proteinen und spezialisierten Funktionsabläufen in einzelnen Zellpopulationen zu erforschen, um die Charakteristika und Auswirkungen dieses Virus zu beleuchten.

Funktionelle Störungen der Oligodendrozyten können am besten anhand deren Hauptfunktion im ZNS, der Myelinisierung der Axone, untersucht werden. Da die Myelinisierung zeitgleich mit der Infektion abläuft, können Auswirkungen auf den Myelinisierungsprozess in der Zeit der postnatalen Hirnontogenese am besten erforscht werden. Pathogenetische

Zusammenhänge von Oligodendrozyten-Infektion und Myelinisierungsstörungen sollen in der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

Die Bewertung der Rolle der Oligodendrozyten bei der persistierenden BDV-Infektion von NBAE-Ratten erfolgte in dieser Arbeit wie folgt: Zunächst wurde der Anteil BDV-infizierter Oligodendrozyten durch immunhistochemischen Nachweis der Bornaproteine N und P und Doppelmarkierungstechnik mit dem oligodendrozytenspezifischen Marker Olig2 ermittelt. Zusätzlich wurden die Oligodendrozyten lichtmikroskopisch hinsichtlich Anzahl, Verteilungsmuster und Veränderungen der Zellmorphologie analysiert. Anschließend erfolgte eine Prüfung der Hauptfunktion der Oligodendrozyten, der Myelinisierung, durch Standardmyelinfärbung mit Sudanschwarz sowie durch immunhistochemische Darstellung des Basischen Myelinproteins. Zur Untersuchung einer Korrelation der erhobenen Befunde zu anderen morphologischen Veränderungen des Hirngewebes wurden zusätzlich folgende Färbungen eingesetzt: HE als Standardfärbung, KV als Neuronenfärbung, ED1 zum Nachweis von aktivierter Mikroglia und Makrophagen, CD45RC und CD8 zur Charakterisierung und Differenzierung von Immunzellen.

5.1 Infektionsverlauf und Klinik

Zur experimentellen Infektion sind bisher verschiedene Methoden angewandt worden. Eine häufig eingesetzte Methode ist die intrazerebrale Infektion. Ein schlecht einschätzbares Risiko der intrazerebralen Infektion besteht jedoch aufgrund der Verletzung des Hirngewebes durch die Depositionsnadel sowie durch das inokulierte Injektionsvolumen. Derartige Manipulationen können bereits zu einer lokalen Aktivierung und Migration von T-Zellen in das ZNS-Gewebe führen (LING *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu besteht kein derartiges Risiko bei der intranasalen Infektion, die bei verschiedenen Untersuchern eingesetzt wurde (CARBONE *et al.*, 1987; SHANKAR *et al.*, 1992; HOOPER *et al.*, 2001). Die intranasale Infektion wird auch aufgrund der Tatsache, dass sie dem vermuteten natürlichen Übertragungsweg entspricht, bevorzugt. Bei natürlicher Infektion wird eine nasale Virusaufnahme, eine zentripetale Ausbreitung bis ins Gehirn über intraaxonalen Transport ausgehend vom N. olfactorius postuliert (MORALES *et al.*, 1988). CARBONE *et al.* konnten außerdem demonstrieren, dass der Infektionsverlauf nach intranasaler Infektion aufgrund von geringen Schwankungen der Inkubationszeit sehr gut reproduzierbar ist (1987). In der

vorliegenden Studie wurden die Versuchstiere aerogen infiziert. Da neugeborene Tiere verwendet werden sollten, um eine immunologische Toleranz zu erzielen, wurde die Aerosol-Methode notwendig, weil bei der herkömmlichen intranasalen Infektion durch die relativ große notwendige Menge an Injektionsvolumen erhebliche Erstickungsgefahr besteht. Die Tiere wurden in einer Begasungskammer einer virushaltigen Suspension ausgesetzt. Die mit dem Verdampfer erzeugten Partikel gelangen aufgrund ihrer Partikelgröße bis in die tieferen Atemwege. Bei vier Tieren (4/30) scheint diese Methode nicht zur Infektion geführt zu haben (*VI NBAE.4, X NBAE.1, 12 NBAE.1, 19 NBAE.4*). Diese Tiere wiesen keine histopathologischen Veränderungen des ZNS-Gewebes auf, und die immunhistochemischen Untersuchungen zur Detektion von p24 und p38 verliefen negativ. Da diese Tiere mit unterschiedlich hohen Viruskonzentrationen behandelt worden waren (200 µl bis 1000 µl), ließ sich zunächst keine Korrelation zur Virusdosis herstellen. Das BDV-negative Tier *12 NBAE.1* war erst sieben Tage alt. CARBONE *et al.* fanden geringe Konzentrationen an Borna-Antigenen erst ab Tag neun p.i. in einzelnen Zellen (1987), daher kann bei diesem Tier nicht ausgeschlossen werden, dass es sich noch in der Inkubationszeit befand. Ein möglicher Hinweis für eine beginnende BDV-Infektion bei dem sieben Tage alten Tier *12 NBAE.1* waren kleine Foci reaktiver ED1⁺ Mikroglia im Stammhirn und Kleinhirnmark. Die drei älteren BDV-negativen Tiere (*VI NBAE.4, X NBAE.1, 19 NBAE.4*) zeigten verglichen mit den Kontrolltieren keine abweichenden Befunde. Eine Virusclearance nach vorangegangener Infektion erscheint allein deshalb sehr unwahrscheinlich, weil es in der Literatur keine Beschreibungen von Viruselimination bei neonatal BDV-infizierten Ratten gibt. Die Tiere sind in der Regel persistent infiziert (MORALES *et al.*, 1988; RUBIN *et al.*, 1999a,b; PLETNIKOV *et al.*, 1999a,b, 2000, 2002a,b).

In der Wurfgruppe VII, in der die Tiere mit einer sehr niedrigen Virusdosis (200 µl) infiziert wurden, bestand eine große Variabilität an erhobenen Befunden (Übersicht in **Tabelle 5-1**). Bei zwei Tieren aus dieser Gruppe zeigten sich im Alter von 110 Tagen deutliche Entzündungszeichen bei hohen Virusproteinkonzentrationen (*VII NBAE.4, VII NBAE.7*). Die Befunde bei diesen beiden Tieren entsprechen den Befunden bei adult infizierten Ratten. Es ist daher denkbar, dass sich diese Tiere nach erfolgloser neonataler experimenteller Infektion zu einem späteren Zeitpunkt bei den Wurfgeschwistern angesteckt haben. Bei einem weiteren Tier aus der Wurfgruppe VII konnte immunhistochemisch nur eine geringgradige Expression

der virusspezifischen Proteine p24 und p38 nachgewiesen werden, die sich auf einzelne Zellen in Bulbus olfactorius und Cortex beschränkte (VII NBAE.2). Dieses Tier war klinisch unauffällig.

Tabelle 5-1: Ergebnisse aus Wurfgruppe VII

Tier	Dosis (µl)	Alter (d)	Klinik	PCR	AK	PC	p38	p24	ED1	IZ	Olig	MBP
VII NBAE.1	200	110	+	pos	<40	↓	+++	++	++	-	+	+
VII NBAE.2	200	110	-	neg	<40	o.b.B.	+	+	+	-	-	-
VII NBAE.3	200	110	+	pos	1280	↓	+++	+++	+++	-	-	+
VII NBAE.4	200	110	+	neg	160	↓	++	++	+++	+++	++	++
VII NBAE.5	200	110	-	pos	<40	↓	+++	++	++	-	-	+
VII NBAE.6	200	110	+	pos	320	↓	+++	++	+++	-	+	++
VII NBAE.7	200	110	+	neg	<40	o.b.B.	+++	++	+++	+++	+++	++

Die uneinheitlichen Ergebnisse innerhalb der Wurfgruppe VII deuten darauf hin, dass die Viruskonzentration von 200 µl Viruskonzentrat möglicherweise zu gering für eine zuverlässige experimentelle Infektion war. In Experimenten von CARBONE *et al.* konnten ebenfalls Abhängigkeiten zwischen verwendeter Viruskonzentration und Infektionsverlauf gezeigt werden. Bei Verwendung sehr niedriger Viruskonzentrationen konnte nach intranasaler Infektion keine Erkrankung ausgelöst werden. Außerdem bestanden Korrelationen zwischen der Virusdosis und der Inkubationszeit. Je niedriger die verwendete Infektionsdosis war, desto länger war die Inkubationszeit bis zum Auftreten klinischer Symptome (1987). Weitere Hinweise auf abgeschwächte Krankheitsverläufe bei Verwendung sehr geringer Virusdosen finden sich bei LEE *et al.* (2003). Ratten, die an Tag sieben bzw. Tag 14 postnatal intrazerebral mit einer vergleichsweise geringen Virusdosis von 200 ffu infiziert worden waren, zeigten bis zum Tag 85 keine klinischen Symptome. Dies steht im Widerspruch zur Literatur, wonach alle Tiere, die nach Tag zwei postnatal infiziert werden,

klinisch schwer erkranken (HIRANO *et al.*, 1983; NARAYAN *et al.*, 1983a; CARBONE *et al.*, 1987; RUBIN *et al.*, 1999a; HERDEN *et al.*, 2000; FURRER *et al.*, 2001b).

Bei infizierten Tieren fiel im Vergleich zu nicht infizierten Tieren eine Reduktion der Körpergröße auf (*VI NBAE.3, VII NBAE.1, VII NBAE.3, X NBAE.4*). Außerdem zeigten sich Entwicklungsverzögerungen, schlechter Allgemeinzustand und Abmagerung (*VII NBAE.6, VII NBAE.7*). Diese Befunde decken sich mit der Literatur, wonach neonatal infizierte Ratten kleiner sind als gleichaltrige nicht infizierte Tiere (CARBONE *et al.*, 1991b; BAUTISTA *et al.*, 1994; HORNIG *et al.*, 1999; PLETNIKOV *et al.*, 2002a). Die ätiologische Grundlage für die Größenreduktion ist weitgehend unklar, zumal keine Unterschiede des Glukose-, STH- und IGF-1-Spiegels bestehen (BAUTISTA *et al.*, 1994).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere hatten neurologische Symptome wie Opisthotonus und Ataxien und zeigten Verhaltensauffälligkeiten. Die Symptome neonatal infizierter Ratten werden häufig mit solchen, die bei Autismus vorkommen, in Verbindung gebracht (HORNIG *et al.*, 1999; PLETNIKOV *et al.*, 1999b). Charakteristische Befunde neonatal infizierter Ratten sind Hyperaktivität (BAUTISTA *et al.*, 1994; HORNIG *et al.*, 1999), Lerndefizite und Gedächtnisstörungen (DITTRICH *et al.*, 1989; RUBIN *et al.*, 1999b), abnormale soziale Interaktionen, z.B. gestörtes Spielverhalten (PLETNIKOV *et al.*, 1999b), stereotype Bewegungsmuster, gesteigerte Lokomotions-Aktivität und gestörte Orientierungsreflexe (HORNIG *et al.*, 1999; DIETZ *et al.*, 2004). BAUTISTA *et al.* vergleichen die allgemeine Hyperaktivität mit Symptomen bei hypoxämischen Hirnschäden (1994). Die neonatale BDV-Infektion ist definiert als Hirnentwicklungskrankheit und verläuft zeitgleich mit der postnatalen Hirnontogenese. Das BDV verursacht selektive Schäden an Strukturen, die sich postnatal weiter differenzieren. Hierzu gehören Hippocampus, Cerebellum und Cortex (CARBONE *et al.*, 1991b; BAUTISTA *et al.*, 1995; EISENMAN *et al.*, 1999; HORNIG *et al.*, 1999; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2000; WEISSENBÖCK *et al.*, 2000; PLETNIKOV *et al.*, 2002a). Die BDV-induzierten klinischen Symptome hängen also wesentlich mit dem Entwicklungszustand des Gehirns zum Zeitpunkt der Infektion zusammen (RUBIN *et al.*, 1999a).

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit deuten auf einen weiteren Effekt der neonatalen BDV-Infektion hin. Bei den NBAE-Tieren gab es Hinweise auf eine Myelinisierungsstörung wie pathologische Veränderungen der Myelinstruktur sowie eine verminderte Anfärbbarkeit mit dem MBP-Antikörper (**Kapitel 5.5**). Da diese Befunde in der Reifungsphase der Myelinisierung auftreten, ist anzunehmen, dass es bei den neonatal infizierten Ratten zu einer Verzögerung bzw. Störung der hauptsächlich postnatal ablaufenden Myelinisierung kommt. Anhand der MBP-Immunhistochemie kann der Zeitrahmen der Myelinisierung bei der Ratte von Tag sieben bis Tag 42 postnatal eingegrenzt werden (HAMANO *et al.*, 1996). Quantitative Messungen des Myelingehalts im Corpus callosum haben ergeben, dass der Myelinisierungsprozess bei der Ratte bis mindestens zum 120. Lebenstag andauert (NUNEZ *et al.*, 2000).

Erkrankungen, die mit einer gestörten Myelinisierung einhergehen, können je nach Schweregrad und Entstehungszeitpunkt komplexe Symptombilder hervorrufen. Als Bestandteil der neuronalen bzw. synaptischen Plastizität wird die Myelinisierung insbesondere mit der kognitiven Leistungsfähigkeit in Verbindung gebracht (FLYNN *et al.*, 2003; CHAMBERS und PERRONE-BIZZOZERO, 2004). Dies hängt damit zusammen, dass Myelin essentiell ist für die Erhöhung der axonalen Leitungsgeschwindigkeit sowie die Senkung der Refraktärzeit und Synchronisierung der Hirnfunktion (*Übersichten bei* BARTZOKIS, 2002, 2005). Daher könnten die bei den NBAE-Tieren beobachteten Symptome auf einem Zusammenspiel verschiedener Pathogenitätsmechanismen beruhen, die auch eine Dysmyelinisierung mit einschließen.

Die Verhaltensauffälligkeiten bei neonatal infizierten Lewis Ratten führten aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu menschlichen neuropsychiatrischen Erkrankungen zu ersten Spekulationen bezüglich einer Beteiligung des BDV an diesen Krankheitsbildern. Unabhängig vom tatsächlichen nach wie vor kontrovers betrachteten Zoonosecharakter des Erregers wurde die Modellfunktion der experimentellen neonatalen BDV-Infektion der Lewis Ratte genutzt, um Pathogenitätsmuster neuropsychiatrischer Erkrankungen des Menschen wie Schizophrenie und Autismus zu erforschen (DITTRICH *et al.*, 1989; PLETNIKOV *et al.*, 1999b; RUBIN *et al.*, 1999a; HORNIG *et al.*, 2001). Im Vordergrund der Forschung in diesem Modell standen bisher neuronale Funktionsstörungen. Da in der vorliegenden Arbeit Störungen der

Myelinisierung gefunden werden konnten, könnte dieses Modell ausgeweitet werden auf die Erforschung pathogenetischer Zusammenhänge bei Dysmyelinisierung, zumal bei Autismus (REISS *et al.*, 1986; DONG und GREENOUGH, 2004), Schizophrenie (AGARTZ *et al.*, 2001; BARTZOKIS, 2002; BARTZOKIS *et al.*, 2003; ASTON *et al.*, 2004; KUBICKI *et al.*, 2005) und depressiven Erkrankungen (STEINGARD *et al.*, 2002) Myelinisierungsstörungen pathogenetisch involviert sind.

Im Rahmen dieser Studie wurden zusätzlich zu den NBAE-Tieren zwei Ratten-Mütter untersucht, die lebenslänglich mit den experimentell infizierten Tieren zusammen gehalten wurden (*0 Mutter, 11 Mutter*). Grundsätzlich sind Übertragungen des Virus von neonatal infizierten Ratten auf nicht infizierte adulte Ratten möglich (NITZSCHKE, 1963; MORALES *et al.*, 1988; SAUDER und STAEHELI, 2003). Die Tiere infizieren sich wahrscheinlich transnasal über Urin oder Speichel infizierter Tiere. Diese Hypothese stützt sich auf die Tatsache, dass in diesen Sekreten hohe infektiöse Viruskonzentrationen gefunden wurden. Beide in dieser Studie untersuchten Mütter zeigten schwerwiegende Symptome. Aus der Literatur ist bekannt, dass angesteckte Mütter erste Symptome zeigen, wenn die Nachkommen drei bis fünf Monate alt sind (MORALES *et al.*, 1988). Die Mutter aus der Wurfgruppe 0 starb bereits 50 Tage nach Infektion der Jungtiere. BDV-Antigen konnte im gesamten Gehirn nachgewiesen werden. Daneben fanden sich ausgeprägte Entzündungszeichen. Ein ungewöhnliches Bild zeigte sich bei der Mutter aus der Wurfgruppe 11. Zwar verstarb die Mutter viereinhalb Monate nach Infektion der Jungtiere und entsprach hiermit dem von MORALES *et al.* beschriebenen Zeitverlauf (1988). Jedoch konnte bei diesem Tier kein BDV-Antigen im Gehirn nachgewiesen werden. Ausgeprägte Entzündungszeichen deuten jedoch auf eine immunologische Reaktion hin.

Der hohe Prozentsatz positiver PCR-Nachweise in PBMC's bei den NBAE-Tieren deckt sich mit der Literatur (SIERRA-HONIGMANN *et al.*, 1993; SAUDER und DE LA TORRE, 1998). Ein negatives PCR-Ergebnis hatten interessanterweise die drei Tiere aus der Wurfgruppe VII, die sich wahrscheinlich adult infiziert haben (*VII NBAE.2, VII NBAE.4, VII NBAE.7*). Bei adult infizierten Ratten beschränkt sich das BDV typischerweise auf das ZNS, so dass das negative PCR-Ergebnis im peripheren Blut ein weiterer Hinweis für den vermuteten späten Infektionszeitpunkt ist. Die drei Sentinels hatten hingegen ein positives

PCR-Ergebnis bei ansonsten unauffälligen Befunden. Bei einem Tier aus der Wurfgruppe 19 (19 NBAE.4) konnte kein Bornavirus-Antigen im ZNS nachgewiesen werden. Lediglich die BDV-PCR fiel bei diesem Tier positiv aus. Da das BDV bei diesen Tieren offensichtlich eine Virämiephase durchläuft, wäre aus epidemiologischen Gesichtspunkten interessant, ob diese Tiere auch BDV in Nasensekret oder Urin ausscheiden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die klinischen Erscheinungen neonatal BDV-infizierter Ratten auf einem komplexen Pathogenitätsmechanismus beruhen. Lerndefizite und Gedächtnisstörungen (DITTRICH *et al.*, 1989; RUBIN *et al.*, 1999b) sowie abnormale soziale Interaktionen (PLETNIKOV *et al.*, 1999b) sind assoziiert mit Neuronenverlust in Cerebellum, Cortex und Hippocampus. Im Hinblick auf die Befunde der Myelin- und Oligodendrozytenpathologie in dieser Arbeit sollten weitere mögliche Erklärungsansätze berücksichtigt werden. Gestörte Reflexreaktionen, kognitive Funktionsdefizite sowie komplexe Verhaltensstörungen werden auch bei Hypomyelinisierung beobachtet, unter anderem bei Eisenmangel-induzierter Hypomyelinisierung der Ratte (WU *et al.*, 2008). Die in diesem Modell beschriebenen Verhaltensstörungen sind vergleichbar mit den Symptomen bei neonatal BDV-infizierten Ratten.

Im Hinblick auf die Aerosoldosis ist abschließend festzustellen, dass für reproduzierbare Ergebnisse eine Mindestmenge von 400 µl gewählt werden sollte.

5.2 Histomorphologische Veränderungen des Hirngewebes

Strukturell bestehen deutliche Unterschiede zwischen adult infizierten und neonatal infizierten Ratten. Grundsätzlich sind die mittels HE-Färbung nachweisbaren Veränderungen bei neonatal infizierten Tieren ausgeprägter als bei adult infizierten Tieren. Bei neugeborenen infizierten Ratten vollzieht sich zwischen Tag 21 und Tag 47 p.i. eine Involution des Gyrus dentatus. Auch im Kleinhirn lassen sich deutliche strukturelle Veränderungen nachweisen, die gekennzeichnet sind durch Dysorganisation bis hin zur Kleinhirnhypotrophie (CARBONE *et al.*, 1991b).

Bei den hier untersuchten neonatal aerogen infizierten Lewis Ratten konnten im Hippocampus deutliche Neuronenverluste und morphologische Veränderungen der Neuronen nachgewiesen werden. Insbesondere ließ sich eine deutliche Reduktion der Purkinje-Zellzahl

feststellen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur, wonach es bei neonatal infizierten Ratten zu einem drastischen Verlust von Purkinje-Zellen zwischen Tag 27 und Tag 75 p.i. kommt (BAUTISTA *et al.*, 1995; EISENMAN *et al.*, 1999; ZOCHER *et al.*, 2000). Eine physiologische Purkinje-Zelldichte wiesen Tiere auf, die sich adult infiziert hatten (Mütter), bzw. Kontrolltiere und Sentinels.

5.3 BDV-Verteilung

In der vorliegenden Arbeit wurden BDV-infizierte Zellen basierend auf dem immunhistochemischen Nachweis der Virusproteine p24 und p38 identifiziert. Die Quantifizierung BDV-infizierter Zellen erfolgte für elf gewählte Gehirnregionen. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit waren Regionen mit hoher Oligodendrozytendichte wie das Corpus callosum und das Kleinhirnmark besonders relevant.

Bei den hier verwendeten Lewis Ratten zeigten sich bereits an Tag elf p.i. erste BDV-positive Zellen mit Neuronenmorphologie im Randbereich des Corpus callosum, Mittelhirn, Stammhirn und Kleinhirnmark. Überraschenderweise fanden sich bei dem elf Tage alten Tier keine BDV-positiven Zellen im Bulbus olfactorius (*11 NBAE.1*). Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen bei GOSZTONYI und LUDWIG, wonach sich das Virus nach intranasaler Inokulation in rostrakaudaler Richtung ausbreitet und bereits vier bis sechs Tage p.i. starke Expressionen virusspezifischer Proteine im Bulbus olfactorius erkennbar sind (1995). Der Infektionsmodus könnte eine mögliche Erklärung für das veränderte frühe Verteilungsmuster sein. Nach intranasaler Infektion dringt das Virus über das olfaktorische Epithel in das ZNS ein, so dass bei diesem Infektionsweg die ersten infizierten Zellen im Bulbus olfactorius zu finden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere aerogen infiziert. Viruspartikel gelangen daher bis in die tieferen Atemwege. Bei diesem Infektionsweg könnte das Virus über andere Projektionsbahnen ins ZNS eindringen.

In der Literatur werden ab Tag neun p.i. geringe Mengen an Virusproteinen im CA3-Feld des Hippocampus sowie in den Schichten 4 und 5 des frontalen Cortex beschrieben. Eine generalisierte Ausbreitung vollzieht sich bis zum Tag 23 p.i. (CARBONE *et al.*, 1987). Purkinje-Zellen sind innerhalb der ersten zwei bis drei Wochen p.i. frei von Virusproteinen (LUDWIG *et al.*, 1988). Virusproteine finden sich im Nukleus, im Zytoplasma sowie in

Axonen und Dendriten (CARBONE *et al.*, 1987; DESCHL *et al.*, 1990; SCHNEEMANN *et al.*, 1994; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; HERDEN *et al.*, 2000).

Bei den hier untersuchten Tieren fanden sich sowohl das Nukleoprotein als auch das Phosphoprotein ab Tag 28 p.i. in relativ hohen Konzentrationen disseminiert im ZNS. Es konnten sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma Virusproteine nachgewiesen werden. Hierbei zeigten N und P wie bei THIEDEMANN *et al.* eine vergleichbare Verteilung (1992).

5.4 Oligodendrozyten

5.4.1 BDV-infizierte Oligodendrozyten

Bei dem BDV handelt es sich um ein Virus mit einem ausgeprägten Neurotropismus (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984). In der Literatur wurde bereits die sekundäre Infektion von Astrozyten, Ependymzellen, Schwannzellen und Oligodendrozyten beschrieben (NARAYAN *et al.*, 1983b; HERZOG *et al.*, 1984; CARBONE *et al.*, 1989, 1991a; DESCHL *et al.*, 1990; GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; STITZ *et al.*, 1998). Die Zeitangaben bis zum Auftreten BDV-infizierter Oligodendrozyten sind jedoch unterschiedlich. STITZ *et al.* fanden bei adult i.c. infizierten Ratten erst sechs Wochen p.i. BDV-positive Oligodendrozyten mittels immunhistochemischer als auch in-situ-Hybridierungs-Techniken (1998), während bei Untersuchungen von HERDEN *et al.* bereits 24 Tage p.i. BDV-positive Oligodendrozyten bei adult infizierten Ratten beschrieben wurden (2005). Nach neonataler Infektion wurden BDV-positive Oligodendrozyten erst einige Monate nach Erstinfektion detektiert (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995).

BDV-infizierte Oligodendrozyten wurden in der vorliegenden Arbeit anhand ihrer typischen morphologischen Kennzeichen zusätzlich immunhistochemisch mithilfe des oligodendrozytenspezifischen Transkriptionsfaktors Olig2 identifiziert. Mit Doppelfärbungen konnten BDV-positive Oligodendrozyten eindeutig dargestellt werden.

Bei dem elf Tage alten BDV-positiven Tier konnten nur vereinzelt BDV-positive Neurone detektiert werden. In Oligodendrozyten konnte zu diesem Zeitpunkt weder das Nukleoprotein noch das Phosphoprotein nachgewiesen werden. Bei den 28 Tage alten NBAE-Tieren konnten jedoch bereits BDV-positive Oligodendrozyten in hohen Prozentsätzen im Corpus callosum und im Kleinhirnmantel detektiert werden. In allen anderen untersuchten Gehirnregionen

wurden ebenfalls vereinzelt BDV-positive Oligodendrozyten nachgewiesen. Bei allen älteren NBAE-Tieren wurden ebenfalls in allen untersuchten Gehirnregionen BDV-positive Oligodendrozyten in hohen Prozentsätzen nachgewiesen.

5.4.2 Oligodendrozytenpathologie

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbung der Oligodendrozyten-Zellkörper mit dem Antikörper Olig2 gelang die Darstellung der Oligodendrozyten im ZNS. Die Auswertung der Oligodendrozytenpathologie erfolgte im vorliegenden Modell innerhalb des Corpus callosum. Bei den NBAE-Tieren fanden sich wesentliche Merkmale für eine BDV-induzierte Oligodendrozytenschädigung. Die Oligodendrozyten bei den NBAE-Tieren erschienen teilweise hypertroph und fielen durch eine veränderte Kernstruktur in Form von vakuolären oder spongiformen Degenerationszeichen auf. Zudem wurde bei den NBAE-Tieren eine Clusterbildung mit Ansammlungen von Oligodendrozyten beobachtet. Die Oligodendrozytenzahl der NBAE-Tiere war im Vergleich zu den BDV-negativen Tieren gleichen Alters innerhalb des Corpus callosum erhöht.

Die morphologischen Zellveränderungen sprechen für eine degenerative Affektion der Oligodendrozyten. Die Veränderungen der Zellmorphologie der Oligodendrozyten im vorliegenden Modell sind vergleichbar mit Veränderungen bei der infantilen GM1-Gangliosidose des Menschen (VAN DER VOORN *et al.*, 2004), jedoch kommt es bei den NBAE-Tieren nicht zu einer Dezimierung der Oligodendrozytenzahl. Diese Beobachtungen sind typisch für das BDV, das sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als nicht-zytopathogen erweist. Aus dem Modell einer toxin-induzierten Myelopathie ist bekannt, dass zunächst Myelinbestandteile in distalen Axonsegmenten vermindert sind, bevor es zu Degenerationen der Oligodendrozyten-Zellkörper kommt. Dies wird mit einer verminderten Transportrate der Myelinbestandteile als Resultat einer funktionellen Oligodendrozytenschädigung erklärt und als „dying-back Gliopathie“ bezeichnet (LUDWIN und JOHNSON, 1981). Da bei den hier untersuchten NBAE-Tieren lichtmikroskopisch bereits Deformierungen der Oligodendrozyten-Zellkörper nachgewiesen wurden, lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass es primär bereits zu funktionellen Synthesestörungen der Myelinbestandteile gekommen ist. Bezogen auf die Neuronenzellpopulation sind funktionelle Störungen durch das BDV bereits beschrieben (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995; GONZALEZ-DUNIA *et*

al., 1997b, 2000; HANS *et al.*, 2004; GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2005). Funktionelle Störungen der Oligodendrozyten sind daher ebenfalls denkbar, die im Folgenden diskutiert werden. Zusätzlich zur Myelinisierung sind Funktionen der Oligodendrozyten gegenüber weiteren Zellpopulationen des ZNS beschrieben (*Übersicht bei NDUBAKU und DE BELLARD, 2008*).

Bei den neugeborenen infizierten Tieren lagen die Oligodendrozyten sehr häufig in Zellhaufen angeordnet. Die Gesamtzahl der Oligodendrozyten war im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. Mehrere Hinweise sprechen dafür, dass es sich bei einigen Zellen innerhalb der Cluster um Oligodendrozytenvorläuferzellen handelt. Innerhalb der Cluster fiel ein höherer Anteil von ovalen oder länglichen Zellen auf. Diese ovalen Zellformen sind typische morphologische Kennzeichen von bipolaren Oligodendrozyten-Progenitorzellen (RAFF *et al.*, 1983). Bei den NBAE-Tieren fiel weiterhin ein höherer Anteil Olig2⁺ Zellen mit prominenter nukleärer Anfärbung auf. Es ist bekannt, dass es in fokalen Demyelinisierungsherden zu einer gesteigerten Expression von Olig2 mRNA in Oligodendrozytenvorläuferzellen kommt (FANCY *et al.*, 2004; TALBOTT *et al.*, 2005). Oligodendrozytenvorläuferzellen repräsentieren im gesunden adulten ZNS ca. 5–8 % der Gliazellpopulation (LEVINE *et al.*, 2001). Reaktive Veränderungen der Oligodendrozytenpopulation wie Proliferation, Hypertrophie und Mitosen entstehen im Rahmen pathologischer Prozesse im ZNS und werden wahrscheinlich durch Wachstumsfaktoren und Zytokine induziert (WOODRUFF und FRANKLIN, 1997). Ziel ist die Differenzierung der Oligodendrozytenvorläuferzellen in reife Oligodendrozyten (LEVINE *et al.*, 2001). Die hier beschriebenen Veränderungen der Oligodendrozytenzahl können daher als sekundäre Reaktionen auf eine Gewebeschädigung interpretiert werden und finden sich qualitativ ähnlich auch bei anderen Krankheitsbildern. Bei der Multiplen Sklerose, einer demyelinisierenden Erkrankung des Menschen, finden sich in aktiven Demyelinisierungsherden beispielsweise Hinweise für eine Rekrutierung von Vorläuferzellen sowie eine rasche Proliferation und Differenzierung von Oligodendroglia vorläuferzellen (PRINEAS *et al.*, 1993; SCOLDING *et al.*, 1998; WOLSWIJK, 2000; CHANG *et al.*, 2002; WOLSWIJK, 2002). Diese Zellen übernehmen Aufgaben der Remyelinisierung. Auch aus Nagernmodellen sind solche Beschreibungen von Oligodendrozytenproliferation und Rekrutierung von Vorläuferzellen bekannt (REYNOLDS *et al.*, 2001; WATANABE *et al.*, 2002). Oligodendrozyten zeichnen sich durch eine enorme

Plastizität aus. Es konnte gezeigt werden, dass frühe O4⁺ Oligodendrozytenvorläuferzellen im adulten ZNS der Ratte persistieren (REYNOLDS und HARDY, 1997). Diese Zellen besitzen die Kapazität, in reife myelinisierende Oligodendrozyten zu maturieren. Entzündungsprozesse scheinen bei der EAE die Migration von Oligodendrozyten und die Remyelinisierung anzukurbeln (TOURBAH *et al.*, 1997). Es scheinen aber auch andere Signale die Rekrutierung von Oligodendrozyten im Rahmen von demyelinisierenden Prozessen zu induzieren (VIGNAIS *et al.*, 1993).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass morphologische degenerative Kennzeichen für eine funktionelle Affektion der Oligodendrozyten bei den NBAE-Ratten sprechen. Eine Dezimierung der Oligodendrozytenzahl als Folge von Zytolyse besteht nicht. Stattdessen finden sich bei den NBAE-Ratten im Corpus callosum Anhäufungen von Olig2⁺ Zellen, die aufgrund morphologischer Kriterien als Oligodendrozytenvorläuferzellen angesprochen werden können. Zusätzlich fällt bei den NBAE-Tieren sowie bei den sehr jungen Tieren ein höherer Anteil von Olig2⁺ Zellen mit prominenter nukleärer Anfärbung auf. Dies deutet auf aktive Differenzierungsprozesse in diesen Zellen hin. Proliferation und Migration von Oligodendrozyten sind reaktive Merkmale, die bei dysmyelinisierenden oder demyelinisierenden Erkrankungen zu einer Kompensation und Remyelinisierung führen sollen.

5.5 Myelinstruktur

Eine Bewertung des Myelingehalts wurde lichtmikroskopisch semiquantitativ mithilfe der Myelinstandardfärbung Sudanschwarz sowie immunhistochemischer Darstellung des Basischen Myelinproteins vorgenommen. Da MBP mengenmäßig einen hohen Anteil am gesamten Myelin hat, können auch dezente Veränderungen der Myelinstruktur mit diesem Marker erfasst werden. Aufgrund der Tatsache, dass die Myelinisierung hauptsächlich postpartal abläuft, gilt deren histomorphologische Bewertung außerdem als repräsentativer Parameter für die Einschätzung der ZNS-Ontogenese (DAMBSKA und LAURE-KAMIONOWKSA, 1990).

Eine lichtmikroskopisch erfassbare Reduktion des Myelingehalts konnte bei den NBAE-Tieren nachgewiesen werden. Die Markscheiden erschienen besonders im Cortex und im

Hippocampus verdünnt mit unregelmäßiger blasser Anfärbbarkeit. Bei den Kontrolltieren ließen sich die myelinisierten Axone in diesen Gebieten über größere Strecken verfolgen. Die Strukturveränderungen der myelinisierten Axone umfassten außerdem perlschnurartige Auftreibungen, Kontinuitätsverlust sowie verminderte Dicke der einzelnen Fasern. Stellenweise erschienen nur noch punktförmige Bruchstücke. Diese Veränderungen ähneln den Beschreibungen, die in aktiven Entmarkungszonen der Multiplen Sklerose gefunden werden (MARBURG, 1906).

GOSZTONYI und LUDWIG beschreiben als Zeichen einer massiven Oligodendrozytenschädigung bei neonatal BDV-infizierten Ratten eine Vakuolisierung von Hirnstambbahnen, intrazerebralen Nervenbahnen und Kerngebieten sowie in intrazerebralen Anteilen cranialer Nervenwurzeln. Die auffälligsten Veränderungen fanden sich im Kleinhirn in Form umschriebener spongiformer Läsionen der weißen Substanz begleitet von einer reaktiven fibrillären Gliose. Veränderungen der weißen Substanz im Rückenmark waren eine hochgradige Vakuolisierung der Funiculi ventrolaterales und posterior sowie eine vakuoläre Myelopathie (1995).

Im Prinzip muß zwischen vier Erklärungsansätzen für die veränderte Myelinstruktur nach BDV-Infektion unterschieden werden:

1. direkte zytolytische Schädigung der Oligodendrozyten durch das BDV mit Zelluntergang; ein Verlust von Oligodendrozyten resultiert in einer verminderten Myelinogenese
2. nicht-zytolytische permissive Infektion der Oligodendroglia mit Einbau von Virusantigenen in die Zellmembran oder Beeinflussung der Myelinisierungsprozesse durch Virusbestandteile; hierdurch werden funktionelle Mechanismen der Myelinogenese gestört
3. primäre Affektion der Myelinsubstanz mit sekundärer Degeneration der myelinbildenden Zellen, der Oligodendrozyten
4. sekundäre Veränderung der Myelinstruktur, die infolge einer axonalen Degeneration entsteht im Sinne einer Wallerschen Degeneration; der Myelinzerfall geht in diesem Fall vom Neuron aus, die Myelinhülle wird sekundär abgetragen.

Diese vier verschiedenen pathogenetischen Überlegungen werden im Folgenden diskutiert.

5.5.1 Myelinstruktur nach Zytolyse der Oligodendrozyten

Eine Zytolyse von Oligodendrozyten äußert sich in morphologisch erkennbaren Veränderungen der Oligodendrozyten. Sekundär kommt es zu einer messbaren Dezimierung der Oligodendrozytenpopulation. Ein klassisches Beispiel für Veränderungen der Myelinstruktur nach direkter zytolytischer Oligodendrozytenschädigung ist die Infektion von Mäusen mit dem JHM-Stamm des MHV. Die akute Entmarkung ist eine direkte Konsequenz der virusinduzierten zytopathischen Veränderungen in den myelinbildenden Zellen (VAN BERLO *et al.*, 1989; BARAC-LATAS *et al.*, 1997). Die Oligodendrozyten zeigen zunächst morphologische Auffälligkeiten wie Hypertrophie, bevor sie schließlich degenerieren. Die Myelinsubstanz wird im Verlauf der Infektion durch Makrophagen abgetragen (LAMPERT, 1978). Bei diesem Krankheitsbild sind histopathologische Kennzeichen mottenfraßähnliche Entmarkungszonen als Zeichen eines fokalen Zelluntergangs der Oligodendrozyten-Population. Ein weiteres Beispiel für eine Erkrankung mit Veränderungen der Myelinstruktur infolge eines Zelluntergangs von Oligodendrozyten ist die GM1-Gangliosidose des Menschen (VAN DER VOORN *et al.*, 2004).

Ein entscheidendes Argument gegen diese Theorie im vorliegenden Modell ist die Beobachtung, dass es bei den NBAE-Tieren nicht zu einer Dezimierung der Oligodendrozytenzahlen im Corpus callosum gekommen ist. Stattdessen wurden sogar erhöhte Oligodendrozytenzahlen ermittelt. Ein weiteres Indiz für einen kompletten Zelluntergang der Oligodendrozyten wären die oben beschriebenen charakteristischen mottenfraßähnlichen Entmarkungsherde, die durch Konfluenz der einzelnen Myelinterritorien geschädigter Oligodendrozyten entstehen. Solche Entmarkungszonen konnten in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden.

5.5.2 Funktionelle Beeinträchtigung der Myelinisierungsabläufe

Eine funktionelle Beeinflussung der Myelinisierung steht bei nicht-zytolytischen persistenten Virusinfektionen im Vordergrund. Durch den Einbau von Virusbestandteilen in Oligodendrozytenmembranen kann eine schwere metabolische Dysfunktion infizierter Zellen resultieren. Bei der CDV-Infektion (Staupe) des Hundes werden derartige

Pathogenitätsmechanismen für die akute Entmarkung verantwortlich gemacht. Diese akuten Entmarkungsläsionen entstehen in der Zeit massiver Immunsuppression, daher steht die primäre Oligodendrogliaschädigung im Vordergrund (VANDEVELDE *et al.*, 1985b; ZURBRIGGEN *et al.*, 1993, 1998). Ein ähnlicher Zusammenhang kann für die neonatale BDV-Infektion vermutet werden, die auch ohne wesentliche immunologische Reaktionen verläuft. Bei der Staupe sind vergleichsweise wenig Oligodendrozyten infiziert. Als Hauptzielzellen für das Staupevirus gelten Astrozyten (MUTINELLI *et al.*, 1989). Eine Persistenzstrategie des Virus scheint jedoch eine restriktive Oligodendrozyteninfektion zu sein. Infizierte Oligodendrozyten bilden nur geringe Mengen an Virusproteinen (ZURBRIGGEN *et al.*, 1986, 1987, 1993, 1998). Trotzdem werden deutliche Zeichen einer Oligodendrozytenschädigung durch das CDV beobachtet, die mit einer verminderten Myelintranskription (ZURBRIGGEN *et al.*, 1998), morphologischen Zellveränderungen (SUMMERS und APPEL, 1987; BLAKEMORE *et al.*, 1989) sowie einer metabolischen Dysfunktion (GLAUS *et al.*, 1990) einhergehen. Bei der Staupe-Infektion bestehen ähnlich wie in dem hier vorliegenden Modell der experimentellen BDV-Infektion keine konkreten Hinweise auf Oligodendrozytenuntergang in Form von Apoptose oder Nekrose (SCHOBESBERGER *et al.*, 1999, 2002). Eine restriktive Infektion von Oligodendrozyten mit geringer Expression virusspezifischer Proteine bei hohen Konzentrationen viraler RNA konnte für das BDV *in vitro* belegt werden (IBRAHIM *et al.*, 2002). Der hohe Verwandtschaftsgrad des BDV mit dem CDV lassen daher ähnliche pathogenetische Zusammenhänge vermuten. Denkbar ist dementsprechend eine Affektion der Oligodendrozyten durch das BDV mit resultierender funktioneller Störung. Eine funktionelle Einschränkung der Oligodendrozyten zeigt sich lichtmikroskopisch vermutlich nur bei neugeborenen infizierten Tieren, bei denen die Myelinogenese noch nicht abgeschlossen ist.

5.5.3 Myelinstruktur nach primärer Affektion der Myelinscheiden

Die Myelinsubstanz ist aufgrund ihrer biochemischen Zusammensetzung relativ empfindlich für den Angriff durch proteolytische Enzyme. Außerdem existieren autoimmune Reaktionen gegen Myelinbestandteile.

Das bestuntersuchte und häufigste Krankheitsbild mit diesem pathogenetischen Korrelat ist die Multiple Sklerose des Menschen. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine

entzündliche Entmarkungskrankheit, in deren Verlauf es zur Zerstörung der Myelinscheiden kommt. Autoaggressive Mechanismen gegen die Myelinsubstanz werden diskutiert (*Übersicht bei KORN, 2008*). Bei der Multiplen Sklerose erscheinen die Plaques eher gleichmäßig und scharf von der Umgebung abgegrenzt. Weitere lichtmikroskopische Kennzeichen für einen Myelinabbau sind so genannte Gitterzellen im Zentrum der Läsionen. Dabei handelt es sich um Makrophagen mit sudanophilen Einschlüssen, die Myelinfragmenten entsprechen (*COMPSTON und COLES, 2002; HEMMER et al., 2002*). In der vorliegenden Studie fanden sich bei den neonatal infizierten Lewis Ratten keine Gitterzellen bzw. Zellen mit sudanophilen Einschlüssen wie bei primären Entmarkungskrankheiten. Es fanden sich außerdem keine fleckförmigen Entmarkungszonen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur. Es finden sich in der Literatur Hinweise für eine Infektion der Oligodendrozyten im Verlauf der BDV-Infektion, jedoch werden bis auf wenige Ausnahmen keine Demyelinisierungsherde gefunden. Insgesamt sprechen diese Beobachtungen daher eher gegen eine primäre Affektion der Myelinscheiden in der Pathogenese der BDV-Infektion.

5.5.4 Myelinstruktur nach Wallerscher Degeneration

Bei einer primären Neuronendegeneration kommt es sekundär zu einer axonalen Schädigung. In myelinisierten Gebieten kommt es infolge axonaler Schädigung auch zum Abbau der Myelinhülle. Immunzytochemisch erscheinen die Veränderungen nach Wallerscher Degeneration als grobschollige fokale Myelinolyse. In der vorliegenden Arbeit dominierten jedoch bei den neonatal infizierten Lewis Ratten gleichmäßige pathologische Veränderungen der myelinisierten Bezirke des ZNS, die daher eher dem pathogenetischen Muster einer Myelinbildungsstörung entsprechen. Bevorzugte Lokalisationen, in denen Veränderungen der Myelinsubstanz beobachtet wurden, befanden sich in der weißen Substanz. Bei einer Demyelinisierung infolge Neuronenuntergang würde man die Veränderungen eher in der grauen Substanz erwarten. Axonale Schädigung und Wallersche Degeneration entstehen außerdem erst in einem chronischen Krankheitsstadium, in dem es bereits zu einer deutlichen Reduktion der Neuronenzahl gekommen ist. Im chronischen Stadium adult infizierter Lewis Ratten kommt es im Zuge der Neuronenzellverluste der Dorsalwurzelganglien beispielsweise

zur Wallerschen Degeneration der Axone des Ischias-Nervs und Dorsal-Rückenmarkstrangs (CARBONE *et al.*, 1987).

5.5.5 Abschließende Bewertung der Myelinstrukturveränderung im vorliegenden Modell

Die funktionelle Beeinträchtigung der Myelinisierung erscheint im vorliegenden Modell am wahrscheinlichsten. Es fanden sich keine Hinweise für eine direkte Zytolyse der Oligodendrozyten. Die Oligodendrozyten erschienen lediglich morphologisch verändert. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich bei den NBAE-Tieren eine erhöhte Oligodendrozytenzahl im Vergleich zu nicht infizierten Kontrolltieren fand. Destruktive fleckförmige Entmarkungsherde wurden nicht gefunden. Denkbar wäre daher der permissive Einbau von Virusbestandteilen in die Zellmembran der Oligodendrozyten mit resultierender Myelinbildungsstörung.

5.6 Korrelation der neuropathologischen Befunde

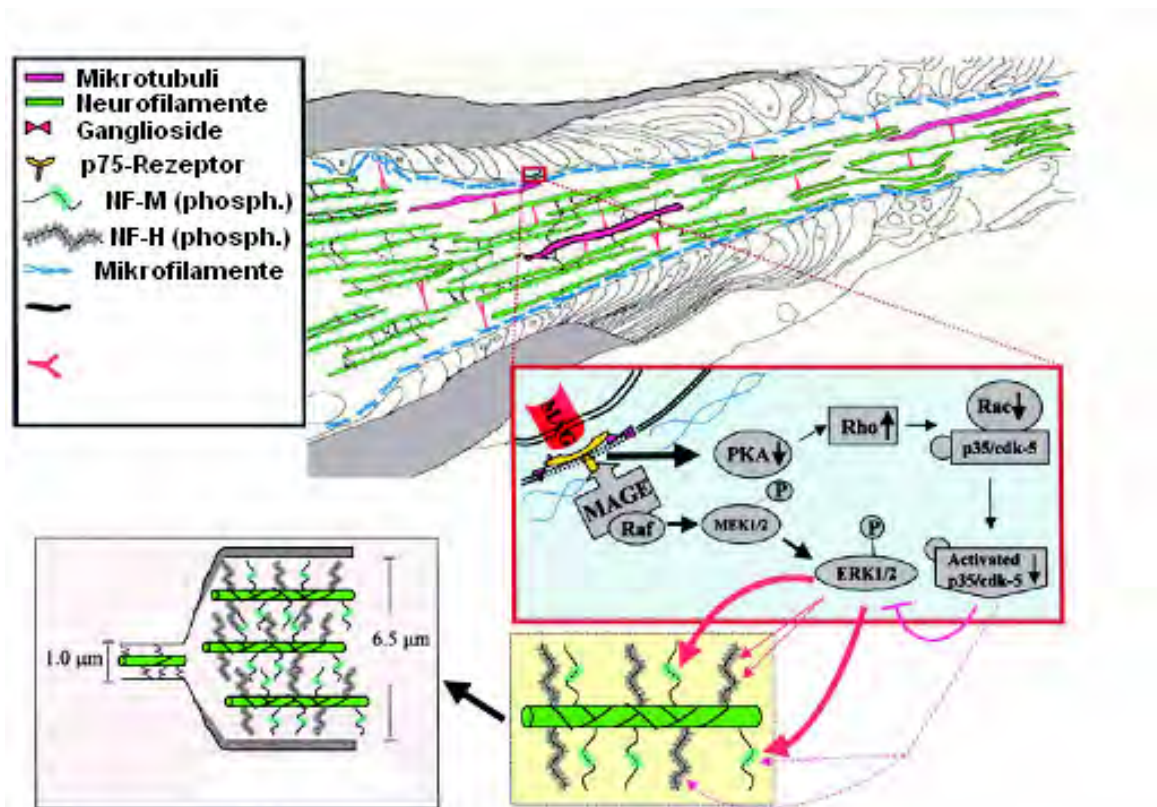
Neben der Myelinisierung der Axone im ZNS existieren zahlreiche weitere funktionelle Einfüsse von Oligodendrozyten auf Neuronen, Mikroglia, Immunzellen und Astrozyten (*Übersicht bei NDUBAKU und DE BELLARD, 2008*). Daher könnten oligodendrozyten-gesteuerte Funktionsprozesse BDV-induziert gestört werden.

5.6.1 Oligodendrozyten-/Myelinpathologie und axonale Schäden

Grundsätzlich existieren wechselseitige Abhängigkeiten zwischen Oligodendrozyt und Axon. Viele Erkenntnisse dieser Wechselwirkungen werden von der MS hergeleitet, da bei dieser Erkrankung Demyelinisierung und axonale Schädigungen vergesellschaftet sind (FERGUSON *et al.*, 1997; TRAPP *et al.*, 1998). Axonale Dysfunktionen wie gestörte neuronale Impulsaktivität können den Myelinisierungsprozess beeinträchtigen (*Übersicht bei ZALC und FIELDS, 2000*). Dieser Zusammenhang resultiert im Wesentlichen aus der Tatsache, dass neuronale bzw. axonale Signale essentiell für die Induktion der Myelinisierung sind (NOTTERPEK und ROME, 1994; DEMERENS *et al.*, 1996; *Übersicht bei ZALC und FIELDS, 2000*).

Umgekehrt existieren jedoch auch Einflüsse der myelinbildenden Zellen auf Axone (LAPPE-SIEFKE *et al.*, 2003). Ein wichtiger trophischer Aspekt ist die myelinabhängige Phosphorylierung von Neurofilamenten, die letztendlich Axonkaliber und Axonreifung bestimmt. Je höher der Phosphorylierungsgrad der Neurofilamente ist, desto größer ist der interfilamentäre Abstand aufgrund von elektrostatischen Abstoßungskräften (DE WAEGH *et al.*, 1992). Mit Zunahme des Axonkalibers ist gleichzeitig eine schnellere und effizientere Erregungsleitung verbunden (SAKAGUCHI *et al.*, 1993; KRIZ *et al.*, 2000). Die Kaskade der myelinabhängigen Neurofilament-Phosphorylierung wird in **Abbildung 5-2** dargestellt.

Abbildung 5-2: Phosphorylierung von Neurofilamenten



Modifiziert aus: GARCIA *et al.*, 2003

Die Signalkaskade, die zur Phosphorylierung von Neurofilamenten führt, ist im hellblauen Kästchen dargestellt: Das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) ist in der äußeren Oligodendrozytenmembran lokalisiert; MAG bindet an den Neurotrophin-Rezeptor p75; über mehrere Zwischenstufen wird eine Aktivierung der ERK1/2-Kaskade ausgelöst, die zur stochiometrischen Phosphorylierung von NF-H und NF-M beiträgt (GARCIA *et al.*, 2003)

Das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) fungiert als Effektormolekül, welches an der äußeren Oligodendrozytenmembran lokalisiert ist. Es induziert über eine Ankopplung an den Neurotrophin-Rezeptor p75 über mehrere Zwischenstufen eine Aktivierung und Phosphorylierung der ERK1/2 mit resultierender stochiometrischer Phosphorylierung von Neurofilamenten (GARCIA *et al.*, 2003).

In der beschriebenen Signalkaskade ist eine Interaktion des P-Proteins denkbar. Durch eine Bindung von P an die entsprechende Kinase könnte es zu einer unzureichenden Phosphorylierung von Neurofilamenten kommen. Dies würde wiederum mit einem verminderten Axonkaliber und Axondysfunktion einhergehen. Diese Hypothese stützt sich auf die Tatsache, dass bereits ähnliche Effekte für das Phosphoprotein beschrieben wurden. HANS *et al.* haben *in vitro* nachgewiesen, dass es vermutlich durch das Phosphoprotein zu einer Hemmung der Phosphorylierung der ERK 1/2 im Rahmen einer BDNF-induzierten Signalkaskade kommt (2004). Die ERK 1/2 ist ebenfalls Bestandteil der von GARCIA *et al.* beschriebenen Kaskade der Neurofilament-Phosphorylierung (2003). Zum anderen ist bekannt, dass das Phosphoprotein im Rahmen der Interferon-Aktivierung eine weitere Kinase (TBK-1) kompetitiv hemmt und hierdurch die Phosphorylierung von IRF-3 unterdrückt (UNTERSTAB *et al.*, 2005). P vermindert durch Interaktion mit der PKC kompetitiv die Phosphorylierung von Substraten in synaptischen Vesikeln. Die unzureichende Phosphorylierung der Substrate führt letztendlich zu einer Blockade der synaptischen Signalübertragung (VOLMER *et al.*, 2006). Auch aus den Ergebnissen in dem Modell der transgenen P-exprimierenden Maus konnte die besondere Bedeutung des Phosphoproteins herausgestellt werden (KAMITANI *et al.*, 2003). Das P-Protein des BDV spielt eine Schlüsselrolle, da es durch Interaktion mit zellulären Kinasen zahlreiche funktionelle Prozesse im Gehirn durch kompetitive Hemmung ausschalten bzw. stören kann.

Kennzeichen axonaler Dystrophien bei BDV-infizierten Ratten finden sich mehrfach in der Literatur. Dystrophische Axone mit Anreicherung von Synaptophysin im Corpus callosum BDV-infizierter Ratten wurden von GONZALEZ-DUNIA *et al.* als Zeichen gestörter axonaler Transportprozesse interpretiert (2000). Anhand der immunhistochemischen Darstellung von Neurofilament wurden Axonspheroide als Kennzeichen einer dystrophischen neuronalen Schädigung bei neonatal BDV-infizierten Lewis Ratten detektiert (SOLLMANN,

2007). Aus den Untersuchungen bei SOLLMANN geht außerdem hervor, dass bei neonatal BDV-infizierten Lewis Ratten eine Veränderung im Neurofilament-Muster erkennbar ist. Neurofilament-Dystrophien wurden im Cortex, Corpus callosum und Hippocampus NBAE-infizierter Tiere nachgewiesen (2007). Die wesentliche Frage in diesem Zusammenhang ist also, ob und inwieweit sich axonale Schädigung und Myelinisierungsstörung bei den NBAE-Tieren gegenseitig bedingen. Aufgrund der bekannten modulativen Einflüsse der Oligodendrozyten auf den Phänotyp der Neurofilamente könnten diese Veränderungen von BDV-infizierten Oligodendrozyten induziert werden. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sollten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen geklärt werden. Eine Überprüfung des Phosphorylierungsgrades der Neurofilamente könnte ebenfalls zur Klärung der pathogenetischen Mechanismen im vorliegenden Modell beitragen.

5.6.2 Oligodendrozyten-/Myelinpathologie und Mikroglia / Makrophagen

Neonatal infizierte Ratten entwickeln *in vivo* eine ausgeprägte Mikrogliose, die über den gesamten Zeitraum bestehen bleibt. Mikrogliazellen sind hierbei in der Regel nicht BDV infiziert. Mikrogliose-Foci werden vorwiegend in Cortex, Hippocampus und Cerebellum beschrieben (HORNIG *et al.*, 1999; SAUDER und DE LA TORRE, 1999; WEISSENBÖCK *et al.*, 2000). Es handelt sich um Lokalisationen, in denen der Hauptanteil infizierter und geschädigter Neuronen zu finden ist. Bei den hier untersuchten Tieren konnte ebenfalls über den gesamten Zeitraum der Infektion beginnend ab Tag 28 p.i. eine deutliche Mikrogliose nachgewiesen werden. Abweichend von der Literatur wurden in den eigenen Untersuchungen die deutlichsten mikroglialen Reaktionen in Corpus callosum und Kleinhirnmark gefunden. In diesen Regionen der weißen Hirnsubstanz finden sich besonders viele Oligodendrozyten und markhaltige Axone. Daher sollten die Wechselwirkungen zwischen Oligodendrozyten und Mikrogliazellen beleuchtet werden, um mögliche Pathogenitätsmechanismen herauszustellen. Mikrogliazellen sind wichtige Immuneffektorzellen des ZNS (GIULIAN, 1987; GRAEBER und STREIT, 1990). Bei zahlreichen pathologischen Zuständen des ZNS reagieren Mikrogliazellen mit Proliferation und Aktivierung. Sie durchlaufen während ihrer Aktivierung mehrere unterschiedliche morphologische Reifungsstadien von einer ramifizierten Form zur amöboiden Form (DAVIS *et al.*, 1994). Ein weiteres Kennzeichen mikroglialer Aktivierung ist neben der Proliferation die Expression von

Histokompatibilitätsantigenen vom Typ MHC-I und MHC-II. Eine Aktivierung von Mikrogliazellen kann durch verschiedene Faktoren induziert werden. Im Rahmen der BDV-Infektion scheint ein wesentliches Signal von geschädigten Neuronen auszugehen, da die Mikrogliose fokal eng assoziiert mit den geschädigten Neuronen auftritt (HORNIG *et al.*, 1999; WEISSENBÖCK *et al.*, 2000; OVANESOV *et al.*, 2008). Die pathogenetische Relevanz persistent infizierter Neuronen für die Induktion der Mikrogliose wurde auch *in vitro* bestätigt. Nur in BDV-infizierten Neuron-Glia-Mischzellkulturen wurde eine Mikrogliose induziert, nicht jedoch in reinen Mikroglia-Zellkulturen (OVANESOV *et al.*, 2006).

Mikrogliazellen sind auch bei vielen demyelinisierenden Erkrankungen beteiligt und scheinen bei diesen Krankheitsbildern eine bedeutsame pathogenetische Rolle zu spielen (BENVENISTE, 1997; STEIN *et al.*, 2004). Durch eine mikrogliale Aktivierung können sowohl protektive als auch toxische bzw. degenerative Prozesse resultieren. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die einzelnen ZNS-residenten Zellen unterschiedlich auf Stoffwechselprodukte von Mikrogliazellen reagieren. So scheinen Oligodendrozyten besonders empfindlich zu sein (MERRILL *et al.*, 1993; MITROVIC *et al.*, 1995). Es ist beschrieben, dass Sekretionsprodukte von aktivierten Mikrogliazellen in der Lage sind, Apoptose in Oligodendrozyten *in vitro* (SELMAJ *et al.*, 1991; LOUIS *et al.*, 1993; D'SOUZA *et al.*, 1995; McLAURIN *et al.*, 1995; BROGI *et al.*, 1997; HISAHARA *et al.*, 1997) und *in vivo* (ARNETT *et al.*, 2001) zu induzieren. Aktivierte Makrophagen sind ebenfalls indirekt durch die Bildung von TNF- α an Oligodendrozyten-Schädigungen beteiligt. In akuten Entmarkungsherden bei der Staupe finden sich vermehrt aktivierte Mikrogliazellen, die in hohem Maße zytotoxische Metaboliten produzieren, die zu einer Schädigung der Oligodendrozyten beitragen können (STEIN *et al.*, 2004).

Eine Beeinflussung der Myelinisierungsprozesse durch die Mikroglia wäre somit möglich. In diesem Zusammenhang erscheint besonders relevant, dass bei den hier untersuchten NBAE-Tieren großflächige mikrogliale Foci vorwiegend in Corpus callosum und Kleinhirnmark nachweisbar waren.

5.6.3 Oligodendrozyten-/Myelinpathologie und Immunzellen

In der vorliegenden Studie ist eine pathogenetische Beeinflussung der Myelinisierung durch Immunzellen unwahrscheinlich, da die meisten Tiere das typische Bild der persistierenden Infektion ohne infiltrierende Immunzellen ausprägten. In der Literatur wird bei neonatal infizierten Ratten von einer transienten Meningoenzephalitis berichtet, die im Alter von vier bis fünf Wochen auftritt (HORNIG *et al.*, 1999). Die 28 Tage alten Tiere in der vorliegenden Arbeit passen sowohl vom Zeitverlauf als auch in Bezug auf die zelluläre Zusammensetzung der Infiltrate zu den Beschreibungen in der Literatur. In den Infiltraten dieser Tiere fanden sich keine CD8⁺ Zellen (19 NBAE.1, 19 NBAE.2, 19 NBAE.3, 19 NBAE.5).

Nur bei den beiden Ratten-Müttern (0 Mutter, 11 Mutter) sowie bei zwei 110 Tage alten NBAE-Tieren (VII NBAE.4, VII NBAE.7) wurden CD8⁺ Immunzellinfiltrate nachgewiesen. Die Infiltrate der beiden 110 Tage alten NBAE-Tiere ähneln in der zellulären Zusammensetzung denen bei adult infizierten Tieren. Da in dieser Wurfgruppe eine niedrige Infektionsdosis verwendet wurde, wird vermutet, dass sich diese Tiere nach erfolgloser experimenteller Infektion auf natürlichem Wege bei den Wurfgeschwistern angesteckt haben (siehe auch **Kapitel 5.1 Infektionsverlauf und Klinik**). Bei diesen Tieren waren zwar ebenfalls Veränderungen der Myelinstruktur erkennbar, jedoch dürften diese Veränderungen eine Folge anderer bereits diskutierter Entstehungsmechanismen sein.

5.6.4 Oligodendrozyten-/Myelinpathologie und Astrozyten

Astrozytäre Veränderungen können sich auf Oligodendrozyten und damit auf die Myelinscheiden auswirken.

Ein Hinweis darauf ergibt sich beispielsweise aus der Hundestaupe-Erkrankung. Das Staupevirus ist ebenfalls ein Vertreter der Mononegavirales. Beim Hund löst es eine demyelinisierende Erkrankung aus. Immunhistologische Untersuchungen haben ergeben, dass nicht Oligodendrozyten, sondern Astrozyten die primären Zielzellen des Staupevirus darstellen (MUTINELLI *et al.*, 1989). Die durch Astrozyten im Rahmen ihrer Aktivierung ausgeschütteten proteolytischen Enzyme können die Myelinsubstanz angreifen. Eine ausgeprägte Astroglie ist im Rahmen der neonatalen BDV-Infektion in der Literatur häufig beschrieben (CARBONE *et al.*, 1989, SAUDER und DE LA TORRE, 1999;

WEISSENBÖCK *et al.*, 2000; SOLLMANN, 2007). Inwieweit die Astrogliose in diesem Modell zur Oligodendrozyten- bzw. Myelinpathologie beiträgt, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Aufgrund der bekannten Wechselwirkungen zwischen Oligodendrozyten und Astrozyten sollten zur Klärung pathogenetischer Zusammenhänge weiterführende Untersuchungen erfolgen.

6 Zusammenfassung

Die Bornasche Krankheit (Borna Disease, BD) ist eine vor allem bei Pferden und Schafen in Zentraleuropa auftretende schwere, häufig tödlich endende immunvermittelte Meningoenzephalomyelitis. Neurone gelten als Hauptzielzellen des BDV bei der natürlichen BD, jedoch können im Verlauf der Infektion auch Oligodendrozyten und weitere Gliazellen involviert sein.

Die experimentelle Infektion von neugeborenen Ratten resultiert in lebenslanger Viruspersistenz ohne Enzephalitis und dient als repräsentatives Modell zur Erforschung von Störungen der Hirnentwicklung und Hirnfunktion. Die experimentelle Infektion von neugeborenen Ratten ist weiterhin gekennzeichnet durch eine generalisierte Ausbreitung virusspezifischer Antigene in allen ZNS-residenten Zellen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung des Einflusses des BDV auf die Oligodendrozyten unter besonderer Berücksichtigung ihrer Hauptfunktion, der Myelinisierung des ZNS. Die Myelinogenese setzt sich postnatal fort und ist daher besonders empfindlich gegenüber Hirnentwicklungsschäden durch perinatalen Insult.

30 Lewis Ratten wurden neonatal durch Exposition mit einem Aerosol einer virushaltigen Suspension infiziert. Gegenstand dieser Studie waren zusätzlich zwei Mütter und drei Sentinels, die mit den infizierten Tieren vergesellschaftet waren, sowie acht Kontrollratten. Sagittale Gehirn-Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Kresylviolett (KV) angefärbt. Es wurden immunhistochemische Färbungen zur Detektion des viralen Nukleoproteins (p38) und Phosphoproteins (p24) sowie zur Charakterisierung infiltrierender Immunzellen angefertigt. Oligodendrozyten wurden immunhistochemisch mithilfe eines Olig2-Antikörpers visualisiert. Eine Einschätzung der Myelinisierung erfolgte durch eine Standardmyelinfärbung mit Sudanschwarz (SSW) sowie durch immunhistochemische Darstellung des Basischen Myelinproteins (MBP). Der Myelinisierungsgrad wurde semiquantitativ durch mikroskopische Begutachtung klassifiziert.

18 neonatal infizierte Ratten zeigten das typische Bild der persistierenden immuntoleranten Infektion ohne infiltrierende Immunzellen. Daneben bestand bei diesen Tieren vorwiegend im Corpus callosum und Cerebellum eine ausgeprägte Mikrogliose. Die Virusproteine N und P

zeigten eine disseminierte Verbreitung im gesamten ZNS-Gewebe. Oligodendrozyten fielen besonders im Corpus callosum durch eine Tendenz zur Bildung von Clustern auf. Dies war begleitet von einer erhöhten Oligodendrozyten-Zellzahl. Olig2⁺ Zellen waren BDV-infiziert, und viele dieser Zellen zeigten lytische Veränderungen der Zellkerne, wie beispielsweise fokale Vakuolisierung. Eine verminderte Myelinexpression fand sich in den mit Sudanschwarz und MBP-Antikörper angefärbten Gehirnschnitten der neonatal infizierten Ratten. Zusätzlich wurden morphologische Abweichungen der Myelinstruktur wie fragmentierte oder perlschnurartige Myelinscheiden nachgewiesen.

Für das Myelindefizit gibt es mehrere Erklärungsansätze. Da die Hypomyelinisierung im Gehirn der NBAE-Ratten nicht mit einem Verlust von Oligodendrozyten assoziiert war, ist dieser Phänotyp möglicherweise Folge eines toxischen Effekts auf Oligodendrozyten und Myelin nach abgeschlossener Myelinformation, beispielsweise durch Sekretionsprodukte aktiverer Mikroglia/Makrophagen. Alternativ könnte die Hypomyelinisierung auch aus einer gestörten funktionellen Interaktion zwischen Oligodendrozyten und Axonen und/oder einer gestörten Maturation der Oligodendrozyten resultieren. Da das BDV als nicht-zytolytisch gilt, wurde vermutet, dass es mit Signalwegen interferiert, die für die Funktionen der Oligodendrozyten im Rahmen der Myelinisierung und Reifung von Axonen essentiell sind. Das Phosphoprotein ist möglicherweise für diesen Effekt verantwortlich, indem es die Phosphorylierung von Neurofilamenten kompetitiv beeinflusst. Ein geringerer Phosphorylierungsgrad von Neurofilamenten hat entscheidende Konsequenzen auf die Myelinisierung und axonale Reifungsprozesse. Die vermutete Hypothese sollte mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen gestützt werden.

Der Anstieg Olig2-exprimierender Zellen im Corpus callosum der NBAE-Ratten kann als Zeichen einer Remyelinisierung mit Proliferation und Migration von Oligodendrozyten-vorläuferzellen gedeutet werden.

Eine gestörte Myelinisierung beeinträchtigt sämtliche Hirnfunktionen, insbesondere die Gedächtnisleistung und das Verhalten. Die Pathologie der weißen Substanz spielt daher möglicherweise eine signifikante Rolle bei der neurologischen Erkrankung neonatal BDV-infizierter Ratten.

7 Summary

Borna disease (BD) is a severe, frequently fatal, immune-mediated meningoencephalomyelitis that most commonly affects horses and sheep in central Europe. Although neurons represent the main cellular targets of BDV infection in natural BD, oligodendrocytes and other glial cells may become involved as the infection progresses.

Experimental infection of neonatal rats results in lifelong viral persistence without encephalitis and provides an intriguing model for disturbances of brain development and function. The experimental infection of neonatal rats is further characterized by the wide distribution of viral antigens in all resident brain cells.

The aim of the present study was to analyze the influence of BDV on oligodendrocytes, especially regarding their main function, myelination of the central nervous system. The myelinogenesis continues to mature after birth and is particularly vulnerable to developmental damage following perinatal insult.

30 Lewis rats were infected as newborns by exposure to virus-containing aerosol. The study also includes two mothers and three sentinels, which were cohabitated with the infected animals, and eight control rats.

Paraffin-embedded sagittal sections of the brains were stained with hematoxylin-eosin (HE) and cresyl-violet (KV). Immunohistochemistry was carried out to detect the viral nucleoprotein (p38) and phosphoprotein (p24) and to characterize invading immune cells. The oligodendrocytes were visualized immunohistochemically using Olig2 antibody. To prove the myelination in the central nervous system, the sections were stained with sudan black (SSW), and by using immunohistochemistry with anti myelin basic protein (MBP) antibody. The degree of myelination was graded semiquantitatively by microscopic examination of the sections.

18 of the neonatally infected rats showed the typical pattern of persistent immune-tolerant infection. The viral proteins N and P showed a dissiminated distribution within the brain. The infection was associated with strong microgliosis, predominantly in corpus callosum and cerebellum. Oligodendrocytes were distributed throughout the brain, especially the corpus callosum, with a tendency for cluster formation. This was associated with an increase in the

number of oligodendrocytes. Olig2⁺ cells were found to be infected, and many of these cells exhibited morphological changes in the nuclei, i.e. focal vacuolation. Decreased myelin expression was seen in brain sections from neonatally infected rats, when stained with sudan black (SSW) and for myelin basic protein (MBP). In addition, morphological changes in the myelin such as a fragmented or beaded appearance of the myelin sheath were found.

Some possible explanations for the myelin deficit exist. Hypomyelination in NBAE rat brain was not related with a loss of oligodendrocytes, suggesting that the phenotype might be caused by a toxic effect on oligodendrocytes and myelin, i.e. by secretion products of activated microglia/macrophages. Alternatively, it is likely that the hypomyelination results from impaired interactions between oligodendrocyte processes and axons and/or impaired morphological maturation of oligodendrocytes. Since BDV is non-cytolytic, it was suggested that BDV interferes with signaling pathways that are important for proper oligodendroglial functioning in supporting myelination and maturation of axons and axonal processes. The phosphoprotein may be responsible for this interference, possibly by competing with the phosphorylation of neurofilaments. A reduced phosphorylation state of neurofilaments will have important consequences on myelination and axonal function. Further ultrastructural studies are required to establish whether the proposed hypothesis can be confirmed.

The increased number of Olig2-expressing cells in the corpus callosum of the NBAE-rats may represent a sign of proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells linked to remyelination.

Impaired myelination can affect all brain functions, including cognition and behavior.

Therefore it is possible that white matter pathology in neonatally BDV-infected rats may contribute significantly to the development of neurological disease.

8 Literaturverzeichnis

- AGARTZ I, ANDERSSON JL, SKARE S (2001):** Abnormal brain white matter in schizophrenia: a diffusion tensor imaging study. *Neuroreport* 12: 2251–2254.
- ALLMANG U, HOFER M, HERZOG S, BECHTER K, STAEHELI P (2001):** Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry* 6: 329–333.
- AMSTERDAM JD, WINOKUR A, DYSON W, HERZOG S, GONZALEZ F, ROTT R, KOPROWSKI H (1985):** Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Arch Gen Psychiatry* 42: 1093–1096.
- ARNETT HA, MASON J, MARINO M, SUZUKI K, MATSUSHIMA GK, TING JP (2001):** TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4: 1116–1122.
- ASTON C, JIANG L, SOKOLOV BP (2004):** Microarray analysis of postmortem temporal cortex from patients with schizophrenia. *Neurosci Res* 77: 858–866.
- AUBERT C, BRAHIC M (1995):** Early infection of the central nervous system by the GDVII and DA strains of Theiler's virus. *J Virol* 69: 3197–3200.
- AUTENRIETH CF (1823):** Über die hitzige Kopfkrankheit der Pferde. Auf Verlangen des Münsinger Vereins zur Beförderung der Pferdezucht auf der Alp, und zunächst für diese Gegend. *Laupp H, Tübingen*.
- BACZKO K, LIEBERT UG, CATTANEO R, BILLETER MA, ROOS RP, TER MEULEN V (1988):** Restriction of measles virus gene expression in measles inclusion body encephalitis. *J Infect Dis* 158: 144–150.
- BAHMANI MK, NOWROUZIAN I, NAKAYA T, NAKAMURA Y, HAGIWARA K, TAKAHASHI H, RAD MA, IKUTA K (1996):** Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic, thoroughbred and their cross-bred horses in Iran. *Virus Res* 45: 1–13.
- BAILEY OT, PAPPENHEIMER AM, CHEEVER FS, DANIELS JB (1949):** A murine virus (JHM) causing disseminated encephalomyelitis with extensive destruction of myelin. II. Pathology. *J Exp Med* 90: 195–212.
- BAJRAMOVIC JJ, 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: 12222–12231.

- BARAC-LATAS V, SUCHANEK G, BREITSCHOPF H, STUEHLER A, WEGE H, LASSMANN H (1997):** Patterns of oligodendrocyte pathology in coronavirus-induced subacute demyelinating encephalomyelitis in the Lewis rat. *Glia* 19: 1–12.
- BARTZOKIS G (2002):** Schizophrenia: breakdown in the well-regulated lifelong process of brain development and maturation. *Neuropsychopharmacology* 27: 672–683. *Review*.
- BARTZOKIS G (2004):** Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25: 5–18. *Review*.
- BARTZOKIS G (2005):** Brain myelination in prevalent neuropsychiatric developmental disorders: primary and comorbid addiction. *Adolesc Psychiatry* 29: 55–96.
- BARTZOKIS G, BECKSON M, LU PH, NUECHTERLEIN KH, EDWARDS N, MINTZ J (2001):** Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 58: 461–465.
- BARTZOKIS G, NUECHTERLEIN KH, LU PH, GITLIN M, ROGERS S, MINTZ J (2003):** Dysregulated brain development in adult men with schizophrenia: a magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* 53: 412–421.
- BAUMANN N, PHAM-DINH D (2001):** Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* 81: 871–927. *Review*.
- BAUTISTA JR, RUBIN SA, MORAN TH, SCHWARTZ GJ, CARBONE KM (1995):** Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res* 90: 45–53.
- BAUTISTA JR, SCHWARTZ GJ, DE LA TORRE JC, MORAN TH, CARBONE KM (1994):** Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull* 34: 31–40.
- BAXTER AG (2007):** The origin and application of experimental autoimmune encephalitis. *Nat Rev Immunol* 7: 904–912. *Review*.
- BECK A (1925):** Die enzootische Encephalitis des Schafes. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 34: 764.
- BECK A, FROHBÖSE H (1926):** Die enzootische Encephalitis des Schafes. Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung der Pferde und Schafe. *Arch Wiss Prakt Tierheilkd* 83: 84–110.
- BECKMAN M (2004):** Neuroscience. Crime, culpability, and the adolescent brain. *Science* 305: 596–599.
- BENVENISTE EN (1997):** Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 75: 165–173.

- BERG AL, DÖRRIES R, BERG M (1999):** Borna disease virus infection in racing horses with behavioral and movement disorders. *Arch Virol* 144: 547–559.
- BERG AL, REID-SMITH R, LARSSON M, BONNETT B (1998):** Case control study of feline Borna disease in Sweden. *Vet Rec* 142: 715–717.
- BERG M, JOHANSSON M, MONTELL H, BERG AL (2001):** Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect* 127: 173–178.
- BERGLES DE, ROBERTS JD, SOMOGYI P, JAHR CE (2000):** Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405: 187–191.
- BILLICH C (2002):** Charakterisierung von Borna Disease Virus-spezifischen Antikörpern in Human- und Tierseren. *Freiburg im Breisgau, Albert-Ludwigs-Universität, med. Fak., Diss.*
- BILLICH C, SAUDER C, FRANK R, HERZOG S, BECHTER K, TAKAHASHI K, PETERS H, STAEHELI P, SCHWEMMLE M (2002):** High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biol Psychiatry* 51: 979–987.
- BILZER T, GRABNER A, STITZ L (1996):** Immunpathologie der Borna-Krankheit beim Pferd: klinische, virologische und neuropathologische Befunde. *Tierärztl Prax* 24: 567–576.
- BILZER T, PLANZ O, LIPKIN WI, STITZ L (1995):** Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol* 5: 223–230.
- BILZER T, STITZ L (1994):** Immune-mediated brain atrophy – CD8+ T-cells contribute to tissue destruction during Borna disease. *J Immunol* 153: 818–823.
- BILZER T, STITZ L (1996):** Immunopathogenesis of virus diseases affecting the central nervous system. *Critical Reviews in Immunology* 16: 145–222. *Review.*
- BLAKEMORE WF, SUMMERS BA, APPEL MG (1989):** Evidence of oligodendrocyte infection and degeneration in canine distemper encephalomyelitis. *Acta Neuropathol* 77: 550–553.
- BODE L (1999):** Borna Disease Virus - natürliche Infektion und Krankheit bei Tier und Mensch. *Berlin, FU, veterinärmed. Fak., Habil.*
- BODE L, DÜRRWALD R, KOEPEL P, LUDWIG H (1994):** Neue Aspekte der equinen Borna-Virus-Infektion mit und ohne Krankheit. Diagnoseschema und Einsendeprotokoll. *Prakt Tierarzt* 75: 1065–1068.

- BODE L, LUDWIG H (1997):** Bornavirus-Infektion und psychiatrische Erkrankungen. *Z Allg Med* 73: 621–662.
- BODE L, STEINBACH F, LUDWIG H (1994):** A novel marker for Borna disease virus infection. *Lancet* 343: 297–298.
- BORROW P, WELSH CJ, TONKS P, DEAN D, BLAKEMORE WF, NASH AA (1998):** Investigation of the role of delayed-type-hypersensitivity responses to myelin in the pathogenesis of Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Immunology* 93: 478–484.
- BOTTERON C, ZURBRIGGEN A, GRIOT C, VANDEVELDE M (1992):** Canine distemper virus-immune complexes induce bystander degeneration of oligodendrocytes. *Acta Neuropathol* 83: 402–407.
- 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: 6043–6051.
- BRIDEAU RJ, CARTER PB, McMASTER WR, MASON DW, WILLIAMS AF (1980):** Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 10: 609–615.
- BRIESE T, DE LA TORRE JC, LEWIS A, LUDWIG H, LIPKIN WI (1992):** Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11486–11489.
- BRIESE T, SCHNEEMANN A, LEWIS AJ, PARK YS, KIM S, LUDWIG H, LIPKIN WI (1994):** Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4362–4366.
- BROGI A, STRAZZA M, MELLI M, COSTANTINO-CECCARINI E (1997):** Induction of intracellular ceramide by interleukin-1 beta in oligodendrocytes. *J Cell Biochem* 66: 532–541.
- BUNGE RP (1968):** Glial cells and the central myelin sheath. *Physiol Rev* 48: 197–251.
- BÜRGE T, GRIOT C, VANDEVELDE M, PETERHANS E (1989):** Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. *J Virol* 63: 2790–2797.
- CAPLAZI P, EHRENSPERGER F (1998):** Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 61: 203–220.

- CAPLAZI P, MELZER K, GOETZMANN R, ROHNER-COTTI A, BRACHER V, ZLINSZKY K, EHRENSPERGER F (1999):** Die Bornasche Krankheit in der Schweiz und im Fürstentum Lichtenstein. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 141: 521–527. *Review.*
- CAPLAZI P, WALDVOGEL A, STITZ L, BRAUN U, EHRENSPERGER F (1994):** Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol* 111: 65–72.
- CARBONE KM, DUCHALA CS, GRIFFIN JW, KINCAID AL, 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: 3431–3440.
- CARBONE KM, MOENCH TR, LIPKIN WI (1991a):** Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol* 50: 205–214.
- CARBONE KM, PARK SW, RUBIN SA, WALTRIP II RW, VOGELSANG GB (1991b):** Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol* 65: 6154–6164.
- CARBONE KM, RUBIN SA, SIERRA-HONIGMANN AM, LEDERMAN HM (1993):** Characterization of a glial cell line persistently infected with Borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol* 67: 1453–1460.
- CARBONE KM, TRAPP BD, GRIFFIN JW, DUCHALA CS, NARAYAN O (1989):** Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 48: 631–644.
- CARONI P, SCHWAB ME (1988a):** Antibody against myelin-associated inhibitor of neurite growth neutralizes nonpermissive substrate properties of CNS white matter. *Neuron* 1: 85–96.
- CARONI P, SCHWAB ME (1988b):** Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 106: 1281–1288.
- CERRUTI-SOLA S, KRISTENSEN F, VANDEVELDE M, BICHSEL P, KIHM U (1983):** Lymphocyte responsiveness to lectin and myelin antigens in canine distemper infection in relation to the development of demyelinating lesions. *J Neuroimmunol* 4: 77–90.
- CERVOS-NAVARRO J, ROGGENDORF W, LUDWIG H, STITZ L (1981):** Die Borna-Krankheit beim Affen unter besonderer Berücksichtigung der encephalitischen Reaktion. *Verh Dtsch Ges Pathol* 65: 208–212.

- CHALMERS RM, THOMAS DR, SALON RL (2005):** Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *QJM* 98: 255–274. *Review.*
- CHAMBERS JS, PERRONE-BIZZOZERO NI (2004):** Altered myelination of the hippocampal formation in subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurochem Res* 29: 2293–2302.
- CHAN AC, DESAI DM, WEISS A (1994):** The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annu Rev Immunol* 12: 555–592. *Review.*
- CHANG A, TOURTELLOTTE WW, RUDICK R, TRAPP BD (2002):** Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346: 165–173.
- CIZZA G, STERNBERG EM (1994):** The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in susceptibility to autoimmune/inflammatory disease. *Immunomethods* 5: 73–78. *Review.*
- COMPSTON A, COLES A (2002):** Multiple sclerosis. *Lancet* 359: 1221–1231. *Review.*
- CONZELMANN KK (1998):** Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 32: 123–162.
- CONZELMANN KK (2004):** Reverse genetics of mononegavirales. *Curr Top Microbiol Immunol* 283: 1–41.
- CUBITT B, DE LA TORRE JC (1994):** Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* 68: 1371–1381.
- CUBITT B, OLDSTONE C, DE LA TORRE JC (1994a):** Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol* 68: 1382–1396.
- CUBITT B, OLDSTONE C, VALCARCEL J, DE LA TORRE JC (1994b):** RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a nonsegmented negative strand RNA virus. *Virus Res* 34: 69–79.
- DAL CANTO MC, LIPTON HL (1975):** Primary demyelination in Theiler's virus infection. An ultrastructural study. *Lab Invest* 33: 626–637.
- DAL CANTO MC, RABINOWITZ SG (1982):** Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system. *Ann Neurol* 11: 109–127. *Review.*
- DAMBSKA M, LAURE-KAMIONOWSKA M (1990):** Myelination as a parameter of normal and retarded brain maturation. *Brain Dev* 12: 214–220.
- DANNER K (1982):** Borna-Virus und Borna-Infektionen – Vom Miasma zum Modell. *Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.*

- DANNER K, MAYR A (1979):** In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. *Arch Virol* 61: 261–271.
- DAUPHIN G, LEGAY V, PITEL PH, ZIENTARA S (2002):** Borna disease: current knowledge and virus detection in France. *Vet Res* 33: 127–138. *Review*.
- DAUPHIN G, LEGAY V, SAILLEAU C, SMONDACK S, HAMMOUMI S, ZIENTARA S (2001):** Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes (*Vulpes vulpes*). *J Gen Virol* 82: 2199–2204.
- DAVID S, AGUAYO AJ (1981):** Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931–933.
- DAVIS EJ, FOSTER TD, THOMAS WE (1994):** Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull* 34: 73–78.
- DEGIORGIS MP, BERG AL, HARD AF SEGERSTAD C, MORNER T, JOHANSSON M, BERG M (2000):** Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *J Clin Microbiol* 38: 3087–3091.
- DE LA TORRE JC (1994):** Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol* 68: 7669–7675
- DE LA TORRE JC, GONZALEZ-DUNIA D, CUBITT B, MALLORY M, MUELLER-LANTZSCH N, GRASSER FA, HANSEN LA, MASLIAH E (1996):** Detection of borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. *Virology* 223: 272–282.
- DE LA TORRE JC, OLDSTONE MB (1996):** Anatomy of viral persistence: mechanisms of persistence and associated disease. *Adv Virus Res* 46: 311–346. *Review*.
- DEMERENS C, STANKOFF B, LOGAK M, ANGLADE P, ALLINQUANT B, COURAUD F, ZALC B, LUBETZKI C (1996):** Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9887–9892.
- 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 (Berl)* 181: 41–50.
- DE WAEGH SM, LEE VM, BRADY ST (1992):** Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68: 451–463.
- DIECKHÖFER R, BODE L, LUDWIG H, KIEFER M, RECKWALD P, RUPP A (2004):** Bornavirus (BDV) beim Pferd: Klinik, Diagnostik und Therapie bei einem lokalen Infektionsgeschehen im Saarland und tierseuchenrechtliche Betrachtungen. *Tierärztl Umschau* 59: 619–632.

- DIETZ DM, PLETNIKOV MV (2003):** Postnatal weight gain inhibition does not account for neurobehavioral consequences of neonatal Borna disease virus infection. *Physiol Behav* 80: 359–366.
- DIETZ M, VOGEL M, RUBIN S, MORAN T, CARBONE K, PLETNIKOV M (2004):** Developmental alterations in serotonergic neurotransmission in Borna disease virus (BDV)-infected rats: a multidisciplinary analysis. *J Neurovirol* 10: 267–277.
- DIJKSTRA CD, DÖPP EA, JOLING P, KRAAL G (1985):** The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54: 589–599.
- 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: 818–828.
- DONG WK, GREENOUGH WT (2004):** Plasticity of nonneuronal brain tissue: roles in developmental disorders. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10: 85–90. Review.
- DOYLE JP, COLMAN DR (1993):** Glial-neuron interactions and the regulation of myelin formation. *Curr Opin Cell Biol* 5: 779–785.
- D´SOUZA S, ALINAUSKAS K, McCREA E, GOODYER C, ANTEL JP (1995):** Differentially susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury. *J Neurosci* 15: 7293–7300.
- 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 Veterinärmed B* 44: 147–184.
- EICKMANN M, KIERMAYER S, KRAUS I, GOSSL M, RICHT JA, GARTEN W (2005):** Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Lett* 579: 4751–4756.
- EISENMAN LM, BROTHERS R, TRAN MH, KEAN RB, DICKSON GM, DIETZSCHOLD B, HOOPER DC (1999):** Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *J Neurovirol* 5: 181–189.
- FANCY SP, ZHAO C, FRANKLIN RJ (2004):** Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* 27: 247–254.
- FANKHAUSER R (1982):** Hundestaupe – Geschichte einer Krankheit. *Schweiz Arch Tierheilkd* 124: 245–256.
- FERGUSON B, MATYSZAK MK, ESIRI MM, PERRY VH (1997):** Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120: 393–399.

- FIELDS RD (2005):** Myelination: an overlooked mechanism of synaptic plasticity? *Neuroscientist 11: 528–531.*
- FISCHER U, HUBER J, BOELENS WC, MATTAJ IW, LUHRMANN R (1995):** The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell 82: 475–483.*
- FLARIS NA, DENSMORE TL, MOLLESTON MC, HICKEY WF (1993):** Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia 7: 34–40.*
- FLYNN SW, LANG DJ, MACKAY AL, GOGHARI V, VAVASOUR IM, WHITTALL KP, SMITH GN, ARANGO V, MANN JJ, DWORK AJ, FALKAI P, HONER WG (2003):** Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol Psychiatry 8: 811–820.*
- FURRER E, BILZER T, STITZ L, PLANZ O (2001a):** Neutralizing antibodies in persistent borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *J Virol 75: 943–951.*
- FURRER E, BILZER T, STITZ L, PLANZ O (2001b):** High-dose Borna disease virus infection induces a nucleoprotein-specific cytotoxic T-lymphocyte response and prevention of immunopathology. *J Virol 75: 11700–11708.*
- 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: 108–113.*
- GALABRU J, SARON MF, BERG M, BERG AL, HERZOG S, LABIE J, ZIENTARA S (2000):** Borna disease virus antibodies in French horses. *Vet Rec 147: 721–722.*
- GALIBERTI JB (1660):** Neugebahnter Tümmelplatz, und eröffnete Reitschul. Samt beygefügter Gestütt Ordnung und gründlicher Einzäumung wie auch der Pferde Cur, und Artzney. *Verlegung Michael Rigers Buchhandlers, Wien.*
- GARCIA ML, LOBSIGER CS, SHAH SB, DEERINCK TJ, CRUM J, YOUNG D, WARD CM, CRAWFORD TO, GUTOW T, UCHIYAMA Y, ELLISMAN MH, CALCUTT NA, CLEVELAND DW (2003):** NF-M is an essential target for the myelin-directed “outside-in” signaling cascade that mediates radial axonal growth. *J Cell Biol 163: 1011–1020.*
- GARCIA-SASTRE A, PALESE P (1993):** Genetic manipulation of negative-strand RNA virus genomes. *Annu Rev Microbiol 47: 765–790.*

- GIEDD JN (2004):** Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci* 1021: 77–85.
- GIULIAN D (1987):** Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. *J Neurosci Res* 18: 155–171, 132-133.
- GLAUS T, GRIOT C, RICHARD A, ALTHAUS U, HERSCHKOWITZ N, VANDELVELDE M (1990):** Ultrastructural and biochemical findings in brain cell cultures infected with canine distemper virus. *Acta Neuropathol* 80: 59–67.
- GONZALEZ-DUNIA D, CUBITT B, DE LA TORRE JC (1998):** Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol* 72: 783–788.
- GONZALEZ-DUNIA D, CUBITT B, GRASSER FA, DE LA TORRE JC (1997a):** Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J Virol* 71: 3208–3218.
- GONZALEZ-DUNIA D, SAUDER C, DE LA TORRE JC (1997b):** Borna disease virus and the brain. *Brain Res Bull* 44: 647–664. *Review.*
- GONZALEZ-DUNIA D, VOLMER R, MAYER D, SCHWEMMLE M (2005):** Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res* 111: 224–234. *Review.*
- GONZALEZ-DUNIA D, WATANABE M, SYAN S, MALLORY M, MASLIAH E, DE LA TORRE JC (2000):** Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J Virol* 74: 3441–3448.
- GOSZTONYI G, DIETZSCHOLD B, KAO M, RUPPRECHT CE, LUDWIG H, KOPROWSKI H (1993):** Rabies and borna disease. A comparative pathogenetic study of two neurovirulent agents. *Lab Invest* 68: 285–295.
- GOSZTONYI G, KAO M, BODE L, LUDWIG H (1991):** Obesity syndrome in experimental infection of rats with Borna disease virus. *Clin Neuropathol* 10: 33–34.
- GOSZTONYI G, LUDWIG H (1984):** Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals. *Acta Neuropathol (Berl)* 64: 213–221.
- GOSZTONYI G, LUDWIG H (1995):** Borna disease – neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 39–73. *Review.*
- GRABNER A, FISCHER A (1991):** Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years. *Tierärztl Prax* 19: 68–73.
- GRAEBER MB, STREIT WJ (1990):** Microglia: immune network in the CNS. *Brain Pathol* 1: 2–5. *Review.*

- GÜNGÖR S, ANLAR B, TURAN N, YILMAZ H, HELPS CR, HARBOUR DA (2005):** Antibodies to borna disease virus in subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatr Infect Dis J* 24: 833–834.
- GUO LH, MITTELBRONN M, BRABECK C, MUELLER CA, SCHLUESENER HJ (2004):** Expression of interleukin-16 by microglial cells in inflammatory, autoimmune, and degenerative lesions of the rat brain. *J Neuroimmunol* 146: 39–45.
- HAGA S, YOSHIMURA M, MOTOI Y, ARIMA K, AIZAWA T, IKUTA K, TASHIRO M, IKEDA K (1997):** Detection of Borna disease virus genome in normal human brain tissue. *Brain Res* 770: 307–309.
- HAGIWARA K, ASAKAWA M, LIAO L, JIANG W, YAN S, CHAI J, OKU Y, IKUTA K, ITO M (2001):** Seroprevalence of Borna disease virus in domestic animals in Xinjiang, China. *Vet Microbiol* 80: 383–389.
- HAGIWARA K, KAMITANI W, TAKAMURA S, TANIYAMA H, NAKAYA T, TANAKA H, KIRISAWA R, IWAI H, IKUTA K (2000):** Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Vet Microbiol* 72: 207–216.
- HAGIWARA K, KAWAMOTO S, TAKAHASHI H, NAKAMURA Y, NAKAYA T, HIRAMUNE T, ISHIHARA C, IKUTA K (1997):** High prevalence of Borna disease virus infection in healthy sheep in Japan. *Clin Diagn Lab Immunol* 4: 339–344.
- HAGIWARA K, NAKAYA T, NAKAMURA Y, ASAHI S, TAKAHASHI H, ISHIHARA C, IKUTA K (1996):** Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy dairy cattle. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 185: 145–151.
- HALLENSLEBEN W, SCHWEMMLE M, HAUSMANN J, STITZ L, VOLK B, PAGENSTECHE A, STAEHELI P (1998):** Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol* 72: 4379–4386.
- HAMANO K, IWASAKI N, TAKEYA T, TAKITA H (1996):** A quantitative analysis of rat central nervous system myelination using the immunohistochemical method for MBP. *Dev Brain Res* 93: 18–22.
- HANS A, BAJRAMOVIC JJ, SYAN S, PERRET E, DUNIA I, BRAHIC M, GONZALEZ-DUNIA D (2004):** Persistent, noncytolytic infection of neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced synaptogenesis. *FASEB J* 18: 863–865.
- HASEGAWA M, HOUDOU S, MITO T, TAKASHIMA S, ASANUMA K, OHNO T (1992):** Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: a myelin basic protein immunohistochemical study. *Brain Dev* 14: 1–6.

- HATALSKI CG, HICKEY WF, LIPKIN WI (1998):** Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol* 90: 137–142.
- HATALSKI CG, KLICHE S, STITZ L, LIPKIN WI (1995):** Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J Virol* 69: 741–747.
- HAUSMANN J, HALLENSLEBEN W, DE LA TORRE JC, PAGENSTECHER A, ZIMMERMANN C, PIRCHER H, STAEHELI P (1999):** T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9769–9774.
- HEINIG A (1969):** Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: RÖHRER H (Hrsg.), *Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Band 4. Fischer Verlag, Jena*, 83–148.
- HELPS CR, TURAN N, BILAL T, HARBOUR DA, YILMAZ H (2001):** Detection of antibodies to Borna disease virus in Turkish cats by using recombinant p40. *Vet Rec* 149: 647–650.
- HEMMER B, ARCHELOS JJ, HARTUNG HP (2002):** New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Rev Neurosci* 3: 291–301.
- HERDEN C, HERZOG S, RICHT JA, 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: 39–48.
- HERDEN C, SCHLUESENER HJ, RICHT JA (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: 512–521.
- HERNDON RM, GRIFFIN DE, McCORMICK U, WEINER LP (1975):** Mouse hepatitis virus-induced recurrent demyelination. A preliminary report. *Arch Neurol* 32: 32–35.
- HERZOG S, FRESE K, RICHT JA, ROTT R (1994):** Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit beim Pferd. *Wien Tierärztl Mschrift* 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: 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: 171–177.
- HERZOG S, ROTT R (1980):** Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 168: 153–158.

- HERZOG S, WONIGEIT K, FRESE K, HEDRICH HJ, ROTT R (1985):** Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. *J Gen Virol* 66: 503–508.
- HICKEY WF (1991):** Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1: 97–105.
- HICKEY WF (1999):** Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* 11: 125–137.
- HIEPE T (1958):** Die Bornasche Krankheit. Klinisch-diagnostische Untersuchungen an Pferden und Schafen mit besonderer Berücksichtigung des Liquor cerebrospinalis. *Wiss Zeitschr Univ Leipzig* 8: 263–338.
- HIGGINS RJ, KRAKOWKA SG, METZLER AE, KOESTNER A (1982):** Experimental canine distemper encephalomyelitis in neonatal gnotobiotic dogs. A sequential ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 57: 287–295.
- 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: 675–677.
- HILDEBRAND C, REMAHL S, PERSSON H, BJARTMAR C (1993):** Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40: 319–384. Review.
- HIRANO N, KAO M, LUDWIG H (1983):** Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol* 64: 1521–1530.
- HISAHARA S, SHOJI S, OKANO H, MIURA M (1997):** ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. *J Neurochem* 69: 10–20.
- HOLLAND J, SPINDLER K, HORODYSKI F, GRABAU E, NICHOL S, VANDEPOL S (1982):** Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577–1585. Review.
- HONKAVUORI KS, SHIVAPRASAD HL, WILLIAMS BL, QUAN PL, HORNIG M, STREET C, PALACIOS G, HUTCHISON SK, FRANCA M, EGHOLM M, BRIESE T, LIPKIN WI (2008):** Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 14: 1883–1886.
- HOOPER DC, KEAN RB, SCOTT GS, SPITSIN SV, MIKHEEVA T, MORIMOTO K, BETTE M, RÖHRENBECK AM, DIETZSCHOLD B, WEIHE E (2001):** The central nervous system inflammatory response to neurotropic virus infection is peroxynitrite dependent. *J Immunol* 167: 3470–3477.
- HORNIG M, SOLBRIG M, HORSCROFT N, WEISSENBÖCK H, LIPKIN WI (2001):** Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: models for neuropsychiatric disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 253: 157–177.

- HORNIG M, WEISSENBOECK H, HORSCROFT N, LIPKIN WI (1999):** An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12102–12107.
- HSIEH ST, KIDD GJ, CRAWFORD TO, XU Z, LIN WM, TRAPP BD, CLEVELAND DW, GRIFFIN JW (1994):** Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J Neurosci* 14: 6392–6401.
- IBRAHIM MS, WATANABE M, PALACIOS JA, KAMITANI W, KOMOTO S, KOBAYASHI T, TOMONAGA K, IKUTA K (2002):** Varied persistent life cycles of Borna disease virus in a human oligodendrogloma cell line. *J Virol* 76: 3873–3880.
- ISAACSON SH, ASHER DM, GODEC MS, GIBBS CJ JR., GAJDUSEK DC (1996):** Widespread, restricted low-level measles virus infection of brain in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropathol* 91: 135–139.
- JOEST E, DEGEN K (1909):** Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde. *Z Inf Krkh Haustiere* 9: 348–356.
- JOEST E, DEGEN K (1911):** Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes. *Z Inf Krkh Haustiere* 9: 1–98.
- JOEST E, SEMMLER W (1911):** Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsweges und der Kerneinschlüsse. *Z Inf Krkh Haustiere* 10: 293.
- JORDAN I, BRIESE T, AVERETT DR, LIPKIN WI (1999):** Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin. *J Virol* 73: 7903–7906.
- JORDAN I, LIPKIN WI (2001):** Borna disease virus. *Rev Med Virol* 11: 37–57. Review.
- JURASKA JM, KOPCIK JR (1988):** Sex and environmental influences on the size and ultrastructure of the rat corpus callosum. *Brain Res* 450: 1–8.
- KAMITANI W, ONO E, YOSHINO S, KOBAYASHI T, TAHARAGUCHI S, LEE BJ, YAMASHITA M, KOBAYASHI T, OKAMOTO M, TANIYAMA H, TOMONAGA K, IKUTA K (2003):** Glial expression of Borna disease virus phosphoprotein induces behavioral and neurological abnormalities in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8969–8974.
- KAO M (1985):** Die Pathogenese der Bornaschen Krankheit bei der Ratte. Ein Modell für persistierende und subakute/akute Krankheiten des Zentralnervensystems und für die Fettsucht (obesity syndrome). Berlin, FU, veterinämed. Fak., Diss.

- KAO M, HAMIR AN, RUPPRECHT CE, FU ZF, SHANKAR V, KOPROWSKI H, DIETZSCHOLD B (1993):** Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *Vet Rec* 132: 241–244.
- KAO M, LUDWIG H, GOSZTONYI G (1984):** Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *J Gen Virol* 65: 1845–1849.
- KARPUS WJ, PETERSON JD, MILLER SD (1994):** Anergy in vivo: down-regulation of antigen-specific CD4+ Th1 but not Th2 cytokine responses. *Int Immunol* 6: 721–730.
- KHOURY SJ, AKALIN E, CHANDRAKER A, TURKA LA, LINSLEY PS, SAYEGH MH, HANCOCK WW (1995):** CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 155: 4521–4524.
- KIERMAYER S, KRAUS I, RICHT JA, GARTEN W, EICKMANN M (2002):** Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 531: 255–258.
- KIRKPATRICK LL, BRADY ST (1994):** Modulation of the axonal microtubule cytoskeleton by myelinating Schwann cells. *J Neurosci* 14: 7440–7450.
- KLICHE S, BRIESE T, HENSCHEN AH, STITZ L, LIPKIN WI (1994):** Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J Virol* 68: 6918–6923.
- KNOBLER RL, RODRIGUEZ M, LAMPERT PW, OLDSTONE MB (1983):** Virologic models of chronic relapsing demyelinating disease. *Acta Neuropathol Suppl* 9: 31–37.
- 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: 3404–3412.
- KOBAYASHI T, SHOYA Y, KODA T, TAKASHIMA I, LAI PK, IKUTA K, KAKINUMA M, KISHI M (1998):** Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 243: 188–197.
- KOHNO T, GOTO T, TAKASAKI T, MORITA C, NAKAYA T, IKUTA K, KURANE I, SANO K, NAKAI M (1999):** Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 73: 760–766.
- KOŁODZIEJEK J, DÜRRWALD 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: 385–398.
- KORN T (2008):** Pathophysiology of multiple sclerosis. *J Neurol* 255 Suppl 6:2–6. Review.

- KRAKOWKA S, McCULLOUGH B, KOESTNER A, OLSEN R (1973):** Myelin-specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection. *Infect Immun* 8: 819–827.
- 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: 2686–2692.
- KRISTENSSON K, NORRBY E (1986):** Persistence of RNA viruses in the central nervous system. *Annu Rev Microbiol* 40: 159–184. Review.
- KRIZ J, ZHU Q, JULIEN JP, PADJEN AL (2000):** Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Res* 885: 32–44.
- KRONEVI T, NORDSTRÖM M, MORENO W, NILSSON PO (1974):** Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nord Vet Med* 26: 720–725.
- KUBICKI M, PARK H, WESTIN CF, NESTOR PG, MULKERN RV, MAIER SE, NIZNIKIEWICZ M, CONNOR EE, LEVITT JJ, FRUMIN M, KIKINIS R, JOLESZ FA, McCARLEY RW, SHENTON ME (2005):** DTI and MTR abnormalities in schizophrenia: analysis of white matter integrity. *Neuroimage* 26: 1109–1118.
- LAMPERT PW (1978):** Autoimmune and virus-induced demyelinating diseases. A review. *Am J Pathol* 91: 176–208. Review.
- LAMPERT PW, SIMS JK, KNIAZEFF AJ (1973):** Mechanism of demyelination in JHM virus encephalomyelitis. Electron microscopic studies. *Acta Neuropathol* 24: 76–85.
- LAPPE-SIEFKE C, GOEBBELS S, GRAVEL M, NICKSCH E, LEE J, BRAUN PE, GRIFFITHS IR, NAVE KA (2003):** Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33: 366–374.
- LEBELT J, HAGENAU K (1996):** Die Verteilung des Bornavirus in natürlich infizierten Tieren mit klinischer Erkrankung. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 109: 178–183.
- LEE BJ, WATANABE M, KAMITANI W, BABA S, YAMASHITA M, KOBAYASHI T, TOMONAGA K, IKUTA K (2003):** Age- and host-dependent control of Borna disease virus spread in the developing brains of gerbils and rats. *Microbes Infect* 5: 1195–1204.
- LEVINE JM, REYNOLDS R, FAWCETT JW (2001):** The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 24: 39–47.

- LING C, SANDOR M, SURESH M, FABRY Z (2006):** Traumatic injury and the presence of antigen differentially contribute to T-cell recruitment in the CNS. *J Neurosci* 26: 731–741.
- LIPKIN WI, HORNIG M (2004):** Psychotropic viruses. *Curr Opin Microbiol* 7: 420–425. Review.
- LIPKIN WI, TRAVIS GH, CARBONE KM, WILSON MC (1990):** Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4184–4188.
- LIU Y, WU Y, LEE JC, XUE H, PEVNY LH, KAPRIELIAN Z, RAO MS (2002):** Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: an in situ and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia* 40: 25–43.
- LOUIS JC, MAGAL E, TAKAYAMA S, VARON S (1993):** CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 259: 689–692.
- LU QR, YUK D, ALBERTA JA, ZHU Z, PAWLITZKY I, CHAN J, McMAHON AP, STILES CD, ROWITCH DH (2000):** Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* 25: 317–329.
- LUBETZKI C, DEMERENS C, ANGLADE P, VILLARROYA H, FRANKFURTER A, LEE VM, ZALC B (1993):** Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6820–6824.
- LUDWIG H, BODE L (2000):** Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev Sci Tech* 19: 259–288. Review.
- LUDWIG H, BODE L, GOSZTONYI G (1988):** Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol* 35: 107–151. Review.
- LUDWIG H, FURUYA K, BODE L, KLEIN N, DÜRRWALD R, LEE DS (1993):** Biology and neurobiology of Borna disease viruses (BDV), defined by antibodies, neutralizability and their pathogenic potential. *Arch Virol Suppl* 7: 111–133.
- 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. *Tierärztl Prax* 3: 421–453.
- LUDWIN SK, JOHNSON ES (1981):** Evidence for a “dying-back” gliopathy in demyelinating disease. *Ann Neurol* 9: 301–305.
- LUNDGREN AL (1992):** Feline non-suppurative meningoencephalomyelitis. A clinical and pathological study. *J Comp Pathol* 107: 411–425.

- LUNDGREN AL, CZECH G, BODE L, LUDWIG H (1993):** Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *Zentralbl Veterinärmed B* 40: 298–303.
- LUNDGREN AL, 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: 2215–2222.
- MALIK TH, KOBAYASHI T, GHOSH M, KISHI M, LAI PK (1999):** Nuclear localization of the protein from the open reading frame x1 of the Borna disease virus was through interactions with the viral nucleoprotein. *Virology* 258: 65–72.
- MALKINSON M, WEISMAN Y, PERL S, ASHASH E (1995):** A Borna-like disease of ostriches in Israel. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 31–38.
- MARBURG O (1906):** Die sogenannte „akute multiple Sklerose“ (Enzephalomyelitis peraxialis scleroticans). *Jahrb Neurol Psych* 27: 211–312.
- MARTIN R, McFARLAND HF, McFARLIN DE (1992):** Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 10: 153–187. Review.
- MAYER D, BAGINSKY S, SCHWEMMLE M (2005):** Isolation of viral ribonucleoprotein complexes from infected cells by tandem affinity purification. *Proteomics* 5: 4483–4487.
- McLAURIN J, D’SOUZA S, STEWART J, BLAIN M, BEAUDET A, NALBANTOGLU J, ANTEL JP (1995):** Effect of tumor necrosis factor alpha and beta on human oligodendrocytes and neurons in culture. *Int J Dev Neurosci* 13: 369–381.
- MEIER S (2006):** Molekulare Analyse der Nogo Expression und der Myelinisierung während der Entwicklung und nach Läsion. *Berlin, Charité-Universitätsmedizin, med. Fak., Diss.*
- MEIER S, BRAUER AU, HEIMRICH B, NITSCH R, SAVASKAN NE (2004):** Myelination in the hippocampus during development and following lesion. *Cell Mol Life Sci* 61: 1082–1094.
- MERRILL JE, IGNARRO LJ, SHERMAN MP, MELINEK J, LANE TE (1993):** Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J Immunol* 151: 2132–2141.
- METZLER A, EHRENSPERGER F, DANNER K (1979):** Bornavirus Infektion bei Schafen: Verlaufsuntersuchungen nach spontaner Infektion, unter besonderer Berücksichtigung der Antikörperkinetik im Serum und Liquor cerebrospinalis. *Schweiz Arch Tierheilk* 121: 37–48.
- METZLER A, EHRENSPERGER F, WYLER R (1978):** Natural borna virus infection in rabbits. *Zentralbl Veterinärmed B* 25: 161–164.

- MITROVIC B, IGNARRO LJ, VINTERS HV, AKERS MA, SCHMID I, UITTENBOGAARD C, MERRILL JE (1995):** Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* 65: 531–539.
- MIZUTANI T, INAGAKI H, HAYASAKA D, SHUTO S, MINAKAWA N, MATSUDA A, KARIWA H, TAKASHIMA I (1999):** Transcriptional control of Borna disease virus (BDV) in persistently BDV-infected cells. *Arch Virol* 144: 1937–1946.
- MOHAMMED AH, NORRBY E, KRISTENSSON K (1993):** Viruses and behavioural changes: a review of clinical and experimental findings. *Rev Neurosci* 4: 267–286. *Review.*
- MORALES JA, 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 (Berl)* 177: 51–68.
- MORIMOTO K, HOOPER DC, BORNHORST A, CORISDEO S, BETTE M, FU ZF, SCHÄFER MK, KOPROWSKI H, WEIHE E, DIETZSCHOLD B (1996):** Intrinsic responses to Borna disease virus infection of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13345–13350.
- MÜLLER CF, FATZER RS, BECK K, VANDEVELDE M, ZURBRIGGEN A (1995):** Studies on canine distemper virus persistence in the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 89: 438–445.
- MUTINELLI F, VANDEVELDE M, GRIOT C, RICHARD A (1989):** Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathol* 77: 333–335.
- NAGASHIMA K, WEGE H, MEYERMANN R, TER MEULEN V (1978):** Corona virus induced subacute demyelinating encephalomyelitis in rats: a morphological analysis. *Acta Neuropathol* 44: 63–70.
- NAKAMURA Y, KISHI M, NAKAYA T, ASAHI S, TANAKA H, SENTSU H, IKEDA K, IKUTA K (1995):** Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. *Vaccine* 13: 1076–1079.
- NAKAMURA Y, NAKAYA T, HAGIWARA K, MOMIYAMA N, KAGAWA Y, TANIYAMA H, ISHIHARA C, SATA T, KURATA T, IKUTA K (1999a):** High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine* 17: 480–489.
- NAKAMURA Y, WATANABE M, KAMITANI W, TANIYAMA H, NAKAYA T, NISHIMURA Y, TSUJIMOTO H, MACHIDA S, IKUTA K (1999b):** High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Vet Microbiol* 70: 153–169.

- 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: 1401–1403.
- NARAYAN O, HERZOG S, FRESE K, SCHEEFERS H, ROTT R (1983b):** Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophtalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis* 148: 305–315.
- NDUBAKU U, DE BELLARD ME (2008):** Glial cells: old cells with new twists. *Acta Histochem* 110: 182–195. Review.
- NITZSCHKE E (1963):** Untersuchungen über die experimentelle Bornavirus-Infektion bei der Ratte. *Zentralbl Veterinärmed B* 10: 470–527.
- NIXON RA (1998):** Dynamic behavior and organization of cytoskeletal proteins in neurons: reconciling old and new findings. *Bioessays* 20: 798–807.
- NIXON RA, SIHAG RK (1991):** Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci* 14: 501–506.
- NORTON WT, CAMMER W (1984):** Isolation and characterization of myelin. In: MORELL P (Hrsg.), *Myelin*. Plenum Press, 2. Aufl., New York, 147–195.
- NÖSKE K, BILZER T, PLANZ O, STITZ L (1998):** Virus-specific CD4+ T cells eliminate borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8+ T cells. *J Virol* 72: 4387–4395.
- NOTTERPEK LM, ROME LH (1994):** Functional evidence for the role of axolemma in CNS myelination. *Neuron* 13: 473–485.
- NOWOTNY N, KOLODZIEJEK J, JEHLE CO, SUCHY A, STAEHELI P, SCHWEMMLE M (2000):** Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol* 74: 5655–5658.
- NUNEZ JL, NELSON J, PYCH JC, KIM JH, JURASKA JM (2000):** Myelination in the splenium of the corpus callosum in adult male and female rats. *Brain Res Dev Brain Res* 120: 87–90.
- 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: 312–317.
- OLDSTONE MB (1989):** Viral persistence. *Cell* 56: 517–520. Review.
- OLDSTONE MB (1991):** Molecular anatomy of viral persistence. *J Virol* 65: 6381–6386. Review.

- OUCHI A, KISHI M, KOBAYASHI T, LAI PK, MALIK TH, IKUTA K, MOCHIZUKI M (2001):** Prevalence of circulating antibodies to p10, a non-structural protein of the Borna disease virus in cats with ataxia. *J Vet Med Sci* 63: 1279–1285.
- OVANESOV MV, MOLDOVAN K, SMITH K, VOGEL MW, PLETNIKOV MV (2008):** Persistent Borna Disease Virus (BDV) infection activates microglia prior to a detectable loss of granule cells in the hippocampus. *J Neuroinflammation* 5: 16.
- OVANESOV MV, SAUDER C, RUBIN SA, RICHT J, NATH A, CARBONE KM, PLETNIKOV MV (2006):** Activation of microglia by borna disease virus infection: in vitro study. *J Virol* 80: 12141–12148.
- PAULI G, LUDWIG H (1985):** Increase of virus yields and releases of Borna disease virus from persistently infected cells. *Virus Res* 2: 29–33.
- PAXINOS G, WATSON C (1998):** The Rat Brain in Stereotactic Coordinates. *Academic Press, 4. Aufl., San Diego, CA.*
- PEREZ M, SANCHEZ A, CUBITT B, ROSARIO D, DE LA TORRE JC (2003):** A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* 84: 3099–3104.
- PEREZ M, WATANABE M, WHITT MA, DE LA TORRE JC (2001):** N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol* 75: 7078–7085.
- PETZOLD A, GVERIC D, GROVES M, SCHMIERER K, GRANT D, CHAPMAN M, KEIR G, CUZNER L, THOMPSON EJ (2008):** Phosphorylation and compactness of neurofilaments in multiple sclerosis: Indicators of axonal pathology. *Exp Neurol* 213:326–335.
- PLANZ O, BILZER T, SOBBE M, STITZ L (1993):** Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J Exp Med* 178: 163–174.
- PLANZ O, BILZER T, STITZ L (1995):** Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *J Virol* 69: 896–903.
- PLANZ O, DUMRESE T, HÜLPÜSCH S, SCHIRLE M, STEVANOVIC S, STITZ L (2001a):** A naturally processed rat major histocompatibility complex class I-associated viral peptide as target structure of borna disease virus-specific CD8+ T cells. *J Biol Chem* 276: 13689–13694.
- PLANZ O, PLESCHKA S, LUDWIG S (2001b):** MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J Virol* 75: 4871–4877.

- PLANZ O, PLESCHKA S, OESTERLE K, BERBERICH-SIEBELT F, EHRHARDT C, STITZ L, LUDWIG S (2003a):** Borna disease virus nucleoprotein interacts with the CDC2-cyclin B1 complex. *J Virol* 77: 11186–11192.
- PLANZ O, RZIHA HJ, STITZ L (2003b):** Genetic relationship of Borna disease virus isolates. *Virus Genes* 26: 25–30.
- PLANZ O, STITZ L (1999):** Borna disease virus nucleoprotein (p40) is a major target for CD8(+)-T-cell-mediated immune response. *J Virol* 73: 1715–1718.
- PLATA-SALAMAN CR, ILYIN SE, GAYLE D, ROMANOVITCH A, CARBONE KM (1999):** Persistent Borna disease virus infection of neonatal rats causes brain regional changes of mRNAs for cytokines, cytokine receptor components and neuropeptides. *Brain Res Bull* 49: 441–451.
- PLESCHKA S, STAEHELI P, KOLODZIEJEK J, RICHT JA, NOWOTNY N, SCHWEMMLE M (2001):** Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. *J Gen Virol* 82: 2681–2690.
- PLETNIKOV MV, RUBIN SA, SCHWARTZ GJ, CARBONE KM, MORAN TH (2000):** Effects of neonatal rat Borna disease virus (BDV) infection on the postnatal development of the brain monoaminergic systems. *Brain Res Dev Brain Res* 119: 179–185.
- PLETNIKOV MV, RUBIN SA, SCHWARTZ GJ, MORAN TH, SOBOTKA TJ, CARBONE KM (1999a):** Persistent neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats. *Physiol Behav* 66: 823–831.
- PLETNIKOV MV, RUBIN SA, VASUDEVAN K, MORAN TH, CARBONE KM (1999b):** Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 100: 43–50.
- PLETNIKOV MV, RUBIN SA, VOGEL MW, MORAN TH, CARBONE KM (2002a):** Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. I. Brain pathology and behavioral deficits. *Brain Res* 944: 97–107.
- PLETNIKOV MV, RUBIN SA, VOGEL MW, MORAN TH, CARBONE KM (2002b):** Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. II. Neurochemical alterations and responses to pharmacological treatments. *Brain Res* 944: 108–123.
- 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: 1895–1898.

- PRICE J (1994):** Glial cell lineage and development. *Curr Opin Neurobiol* 4: 680–686. Review.
- PRINEAS JW, BARNARD RO, KWON EE, SHARER LR, CHO ES (1993):** Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33: 137–151.
- PRINGLE CR (1996):** Virus taxonomy 1996 – A bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch Virol* 141: 2251–2256.
- RAFF MC, MILLER RH, NOBLE M (1983):** A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390–396.
- RAINE CS (1976):** On the development of CNS lesions in natural canine distemper encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 30: 13–28.
- RAINE CS, CANNELLA B, DUIJVESTIJN AM, CROSS AH (1990):** Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Lab Invest* 63: 476–489.
- RAO P, SEGAL BM (2004):** Experimental autoimmune encephalomyelitis. *Methods Mol Med* 102: 363–375.
- REEVES NA, HELPS CR, GUNN-MOORE DA, BLUNDELL C, FINNEMORE PL, PEARSON GR, HARBOUR DA (1998):** Natural Borna disease virus infection in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 143: 523–526.
- REISS AL, FEINSTEIN C, ROSENBAUM KN (1986):** Autism and genetic disorders. *Schizophr Bull* 12: 724–738.
- REYNOLDS R, CENCI DI BELLO I, DAWSON M, LEVINE J (2001):** The response of adult oligodendrocyte progenitors to demyelination in EAE. *Prog Brain Res* 132: 165–174.
- REYNOLDS R, HARDY R (1997):** Oligodendroglial progenitors labeled with the O4 antibody persist in the adult rat cerebral cortex in vivo. *J Neurosci Res* 47: 455–470.
- RICHT JA, 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: 4528–4533.
- RICHT JA, HERZOG S, HABERZETTL K, ROTT R (1993):** Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 182: 293–304.

- RICHT JA, PFEUFFER I, CHRIST M, FRESE K, BECHTER K, HERZOG S (1997):** Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerg Infect Dis* 3: 343–352. Review.
- RICHT JA, ROTT R (2001):** Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet J* 161: 24–40. Review.
- RICHT JA, STITZ L, WEKERLE H, ROTT R (1989):** Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J Exp Med* 170: 1045–1050.
- RICHT JA, VANDEWOUDE S, ZINK MC, CLEMENTS JE, HERZOG S, STITZ L, ROTT R, NARAYAN O (1992):** Infection with Borna Disease Virus: molecular and immunobiological characterization of the agent. *Clin Infect Dis* 14: 1240–1250. Review.
- ROGGENDORF W, SASAKI S, LUDWIG H (1983):** Light microscope and immunohistological investigations on the brain of Borna disease virus-infected rabbits. *Neuropathol Appl Neurobiol* 9: 287–296.
- ROSARIO D, PEREZ M, DE LA TORRE JC (2005):** Functional characterization of the genomic promoter of borna disease virus (BDV): implications of 3'-terminal sequence heterogeneity for BDV persistence. *J Virol* 79: 6544–6550.
- ROSS SE, GREENBERG ME, STILES CD (2003):** Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39: 13–25. Review.
- 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: 755–756.
- ROWITCH DH (2004):** Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 5: 409–419.
- RUBIN SA, BAUTISTA JR, MORAN TH, SCHWARTZ GJ, CARBONE KM (1999a):** Viral teratogenesis: brain developmental damage associated with maturation state at time of infection. *Brain Res Dev Brain Res* 112: 237–244.
- RUBIN SA, SIERRA-HONIGMANN AM, LEDERMAN HM, WALTRIP II RW, EIDEN JJ, CARBONE KM (1995):** Hematologic consequences of Borna disease virus infection of rat bone marrow and thymus stromal cells. *Blood* 85: 2762–2769.

- RUBIN SA, SYLVES P, VOGEL M, PLETNIKOV M, MORAN TH, SCHWARTZ GJ, CARBONE KM (1999b):** Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res Bull* 48: 23–30.
- RUBIN SA, WALTRIP II RW, BAUTISTA JR, CARBONE KM (1993):** Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J Virol* 67: 548–552.
- RUBIN SA, YEDNOCK TA, CARBONE KM (1998):** In vivo treatment with anti-alpha4 integrin suppresses clinical and pathological evidence of Borna disease virus infection. *J Neuroimmunol* 84: 158–163.
- SAITO N, ITOUJI A, TOTANI Y, OSAWA I, KOIDE H, FUJISAWA N, OGITA K, TANAKA C (1993):** Cellular and intracellular localization of epsilon-subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the epsilon-subspecies. *Brain Res* 607: 241–248.
- SAKAGUCHI T, OKADA M, KITAMURA T, KAWASAKI K (1993):** Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett* 153: 65–68.
- SÁNCHEZ I, HASSINGER L, PASKEVICH PH, SHINE HD, NIXON RA (1996):** Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation. *J Neurosci* 16: 5095–5105.
- SÁNCHEZ MM, HEARN EF, DO D, RILLING JK, HERNDON JG (1998):** Differential rearing affects corpus callosum size and cognitive function of rhesus monkeys. *Brain Res* 812: 38–49.
- SAUDER C, DE LA TORRE JC (1998):** Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology. *J Virol Methods* 71: 229–245.
- SAUDER C, DE LA TORRE JC (1999):** Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J Neuroimmunol* 96: 29–45.
- SAUDER C, HERPFER I, HASSLER C, STAEHELI P (2004):** Susceptibility of Borna disease virus to the antiviral action of gamma-interferon: evidence for species-specific differences. *Arch Virol* 149: 2171–2186.
- SAUDER C, STAEHELI P (2003):** Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol* 77: 12886–12890.
- SCHMITHORST VJ, WILKE M, DARDZINSKI BJ, HOLLAND SK (2005):** Cognitive functions correlate with white matter architecture in a normal pediatric population: a diffusion tensor MRI study. *Hum Brain Mapp* 26: 139–147.

- SCHNEEMANN A, SCHNEIDER PA, KIM S, LIPKIN WI (1994):** Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 68: 6514–6522.
- SCHNEIDER PA, BRIESE T, ZIMMERMANN W, LUDWIG H, LIPKIN WI (1994a):** Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J Virol* 68: 63–68.
- SCHNEIDER PA, HATALSKI CG, LEWIS AJ, LIPKIN WI (1997):** Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J Virol* 71: 331–336.
- SCHNEIDER PA, SCHNEEMANN A, LIPKIN WI (1994b):** RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 68: 5007–5012.
- SCHNEIDER U, NAEGELE M, STAEHELI P (2004):** Regulation of the Borna disease virus polymerase complex by the viral nucleoprotein p38 isoform. Brief Report. *Arch Virol* 149: 1409–1414.
- 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: 11781–11789.
- SCHNEIDER U, SCHWEMMLE M, STAEHELI P (2005):** Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 3441–3446.
- SCHOBESBERGER M, ZURBRIGGEN A, SUMMERFIELD A, VANDEVELDE M, GRIOT C (1999):** Oligodendroglial degeneration in distemper: apoptosis or necrosis? *Acta Neuropathol* 97: 279–287.
- SCHOBESBERGER ZURBRIGGEN A, DOHERR MG, WEISSENBOCK H, VANDEVELDE M, LASSMANN H, GRIOT C (2002):** Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathol* 103: 11–19.
- SCHÜPPEL KF, KINNE J, REINACHER M (1994):** Bornavirus-Antigennachweis bei Alpakas (*Lama pakos*) sowie bei einem Faultier (*Choloepus didaktylus*) und einem Zwergflußferd (*Choeropsis liberiensis*). *Verhandlungsbericht XXXVI Int Symp Erkrgr Zootiere* 36: 189–194.
- SCHÜPPEL KF, REINACHER M, LEBELT J, KULKA D (1995):** Bornasche Krankheit bei Primaten. *Verhandlungsbericht XXXVII Int Symp Erkrgr Zootiere* 37: 115–120.
- 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: 3163–3169.

- SCHWEMMLE M, DE B, SHI L, BANERJEE A, LIPKIN WI (1997):** Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *J Biol Chem* 272: 21818–21823.
- SCHWEMMLE M, JEHLE C, FORMELLA S, STAEHELI P (1999a):** Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* 354: 1973–1974.
- SCHWEMMLE M, JEHLE C, SHOEMAKER T, LIPKIN WI (1999b):** Characterization of the major nuclear localization signal of the Borna disease virus phosphoprotein. *J Gen Virol* 80: 97–100.
- SCHWEMMLE M, SALVATORE M, SHI L, RICHT J, LEE CH, LIPKIN WI (1998):** Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem* 273: 9007–9012.
- SCOLDING N, FRANKLIN R, STEVENS S, HELDIN CH, COMPSTON A, NEWCOMBE J (1998):** Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* 121: 2221–2228.
- SELMAJ K, RAINE CS, FAROOQ M, NORTON WT, BROSNAN CF (1991):** Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 147: 1522–1529.
- SHANKAR V, KAO M, HAMIR AN, SHENG H, KOPROWSKI H, DIETZSCHOLD B (1992):** Kinetics of virus spread and changes in levels of several cytokine mRNAs in the brain after intranasal infection of rats with Borna disease virus. *J Virol* 66: 992–998.
- SHERMAN DL, BROPHY PJ (2005):** Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6: 683–690. Review.
- SHOYA Y, KOBAYASHI T, KODA T, IKUTA K, KAKINUMA M, KISHI M (1998):** Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of the Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 72: 9755–9762.
- SIERRA-HONIGMANN AM, RUBIN SA, ESTAFANOUS MG, YOLKEN RH, CARBONE KM (1993):** Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J Neuroimmunol* 45: 31–36.
- SIREVAAG AM, GREENOUGH WT (1987):** Differential rearing effects on rat visual cortex synapses: III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain Res* 424: 320–332.

- SOBBE M, BILZER T, GOMMEL S, NOSKE K, PLANZ O, STITZ L (1997):** Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8+ T cells and perforin mRNA. *J Virol* 71: 2400–2407.
- SOLLMANN D (2007):** Charakterisierung der BDV-Infektion bei neugeborenen-aerogen-infizierten Ratten mittels immunohistochemischer Methoden. *Gießen, JLU, veterinärmed. Fak., Diss.*
- SPICKET GP, BRANDON MR, MASON DW, WILLIAMS AF, WOOLLETT GR (1983):** MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leucocyte-common antigen. *J Exp Med* 158: 795–810.
- STAEHELI P, SAUDER C, HAUSMANN J, EHRENSPERGER F, SCHWEMMLE M (2000):** Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol* 81: 2123–2135. *Review.*
- STARR R, ATTEMA B, DeVRIES GH, MONTEIRO MJ (1996):** Neurofilament phosphorylation is modulated by myelination. *J Neurosci Res* 44: 328–337.
- STEIN MS, CZUB M, SCHREINER N, MOORE PF, VANDEVELDE M, ZURBRIGGEN A, TIPOLD A (2004):** Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *J Neuroimmunol* 153: 122–131.
- STEINGARD RJ, RENSHAW PF, HENNEN J, LENOX M, CINTRON CB, YOUNG AD, CONNOR DF, AU TH, YURGELUN-TODD DA (2002):** Smaller frontal lobe white matter volumes in depressed adolescents. *Biol Psychiatry* 52: 413–417.
- STERNBERG EM, WILDER RL, GOLD PW, CHROUSOS GP (1990):** A defect in the central component of the immune system-hypothalamic-pituitary-adrenal axis feedback loop is associated with susceptibility to experimental arthritis and other inflammatory diseases. *Ann N Y Acad Sci* 594: 289–292.
- STERNBERGER NH, ITOYAMA Y, KIES M, WEBSTER HD (1978):** Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 2521–2524.
- STITZ L, BILZER T, PLANZ O (2002):** The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci* 7: 541–555. *Review.*
- STITZ L, BILZER T, RICHT JA, ROTT R (1993):** Pathogenesis of Borna disease. *Arch Virol Suppl* 7: 135–151. *Review.*
- STITZ L, DIETZSCHOLD B, CARBONE KM (1995):** Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 75–92.

- STITZ L, KREY H, LUDWIG H (1981):** Borna disease in rhesus monkeys as a models for uveo-cerebral symptoms. *J Med Virol* 6: 333–340.
- STITZ L, NOSKE K, PLANZ O, FURRER E, LIPKIN WI, BILZER T (1998):** A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* 72: 8884–8892.
- STITZ L, PLANZ O, BILZER T, FREI K, FONTANA A (1991a):** Transforming growth factor-beta modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus. Pathogenic importance of CD8+ cells and suppression of antibody formation. *J Immunol* 147: 3581–3586.
- STITZ L, SCHILKEN D, FRESE K (1991b):** Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats. *J Virol* 65: 457–460.
- STITZ L, SOBBE M, BILZER T (1992):** Preventive effects of early anti-CD4 or anti-CD8 treatment on Borna disease in rats. *J Virol* 66: 3316–3323.
- STITZ L, SOEDER D, DESCHL U, FRESE K, HEDRICH HJ, ROTT R (1989):** Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *J Immunol* 143: 4250–4256.
- STOYLOFF R, STRECKER A, BODE L, FRANKE P, LUDWIG H, HUCHO F (1997):** The glycosylated matrix protein of Borna disease virus is a tetrameric membrane-bound viral component essential for infection. *Eur J Biochem* 246: 252–257.
- SUMMERS BA, APPEL MJ (1987):** Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. *J Neurocytol* 16: 871–881.
- SUTER U, WELCHER AA, OZCELIK T, SNIPES GJ, KOSARAS B, FRANCKE U, BILLINGS-GAGLIARDI S, SIDMAN RL, SHOOTER EM (1992):** Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 356: 241–244.
- SZELIGO F, LEBLOND CP (1977):** Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control impoverished environments following weaning. *J Comp Neurol* 172: 247–263.
- SZUCHET S (1995):** The morphology and ultrastructure of oligodendrocytes and their functional implications. In: *KETTENMAN H, RANSOM BR (Hrsg.), Neuroglia. Oxford University Press, New York, 23–43.*
- TAKAHASHI H, NAKAYA T, NAKAMURA Y, ASAH I, ONISHI Y, IKEBUCHI K, TAKAHASHI TA, KATOH T, SEKIGUCHI S, TAKAZAWA M, TANAKA H, IKUTA K (1997):** Higher prevalence of Borna disease virus infection in blood donors living near thoroughbred horse farms. *J Med Virol* 52: 330–335.

- TAKEBAYASHI H, YOSHIDA S, SUGIMORI M, KOSAKO H, KOMINAMI R, NAKAFUKU M, NABESHIMA Y (2000):** Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. *Mech Dev* 99: 143–148.
- TALBOTT JF, LOY DN, LIU Y, QIU MS, BUNGE MB, RAO MS, WHITTEMORE SR (2005):** Endogenous Nkx2.2+/Olig2+ oligodendrocyte precursor cells fail to remyelinate the demyelinated adult rat spinal cord in the absence of astrocytes. *Exp Neurol* 192: 11–24.
- 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: 480–482.
- TASAKI I (1982):** Physiology and Electrochemistry of Nerve Fibers. *Academic Press, New York*.
- TEKKI-KESSARIS N, WOODRUFF R, HALL AC, GAFFIELD W, KIMURA S, STILES CD, ROWITCH DH, RICHARDSON WD (2001):** Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development* 128: 2545–2554.
- THIEDEMANN N, PRESEK P, ROTT R, STITZ L (1992):** Antigenic relationship and further characterization of two major Borna disease virus-specific proteins. *J Gen Virol* 73: 1057–1064.
- TOURBAH A, LINNINGTON C, BACHELIN C, AVELLANA-ADALID V, WEKERLE H, BARON-VAN EVERCOOREN A (1997):** Inflammation promotes survival and migration of the CG4 oligodendrocyte progenitors transplanted in the spinal cord of both inflammatory and demyelinated EAE rats. *J Neurosci Res* 50: 853–861.
- TRAPP BD, PETERSON J, RANSOHOFF RM, RUDICK R, MÖRK S, BÖ L (1998):** Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338: 278–285.
- TROWBRIDGE IS, THOMAS ML (1994):** CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 12: 85–116. *Review*.
- TSUJIMURA K, MIZUTANI T, KARIWA H, YOSHIMATSU K, OGINO M, MORII Y, INAGAKI H, ARIKAWA J, TAKASHIMA I (1999):** A serosurvey of Borna disease virus infection in wild rats by a capture ELISA. *J Vet Med Sci* 61: 113–117.
- UNTERSTAB G, LUDWIG S, ANTON A, PLANZ O, DAUBER B, KRAPPMANN D, HEINS G, EHRHARDT C, WOLFF T (2005):** Viral targeting of the interferon- β -inducing Traf family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13640–13645.

- VAHLENKAMP TW, KONRATH A, WEBER M, MÜLLER H (2002):** Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* 76: 9735–9743.
- VAN BERLO MF, WARRINGA R, WOLSWIJK G, LOPES-CARDOZO M (1989):** Vulnerability of rat and mouse brain cells to murine hepatitis virus (JHM-strain): studies in vivo and in vitro. *Glia* 2: 85–93.
- VAN DER VOORN JP, KAMPHORST W, VAN DER KNAAP MS, POWERS JM (2004):** The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocyte loss and axonal dysfunction. *Acta Neuropathol* 107: 539–545.
- VANDEVELDE M, HIGGINS RJ, KRISTENSEN B, KRISTENSEN F, STECK AJ, KIHM U (1982):** Demyelination in experimental canine distemper virus infection: Immunological, pathological, and immunological studies. *Acta Neuropathol* 56: 285–293.
- VANDEVELDE M, ZURBRIGGEN A (2005):** Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol* 109: 56–68.
- VANDEVELDE M, ZURBRIGGEN A, DUMAS M, PALMER D (1985a):** Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro. *J Neurol Sci* 69: 133–137.
- VANDEVELDE M, ZURBRIGGEN A, HIGGINS RJ, PALMER D (1985b):** Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol* 67: 211–218.
- VANDEWOUDE S, RICHT JA, ZINK MC, ROTT R, NARAYAN O, CLEMENTS JE (1990):** A borna virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioral diseases. *Science* 250: 1278–1281.
- VIGNAIS L, NAIT OUMESMAR B, MELLOUK F, GOUT O, LABOURDETTE G, BARON-VAN EVERCOOREN A, GUMPEL M (1993):** Transplantation of oligodendrocyte precursors in the adult demyelinated spinal cord: migration and remyelination. *Int J Dev Neurosci* 11: 603–612.
- 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: 195–202.
- VON SIND JB (1767):** Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt, welcher einen gründlichen Unterricht von den gewöhnlichsten Krankheiten der Pferde im Feld und auf der Reise wie auch einen auserlesenen Vorrath der nützlichsten und durch die Erfahrung bewährtesten Heilungsmittel eröffnet. *Brönner, 2. Aufl., Frankfurt.*
- WALKER MP, JORDAN I, BRIESE T, FISCHER N, LIPKIN WI (2000):** Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* 74: 4425–4428.

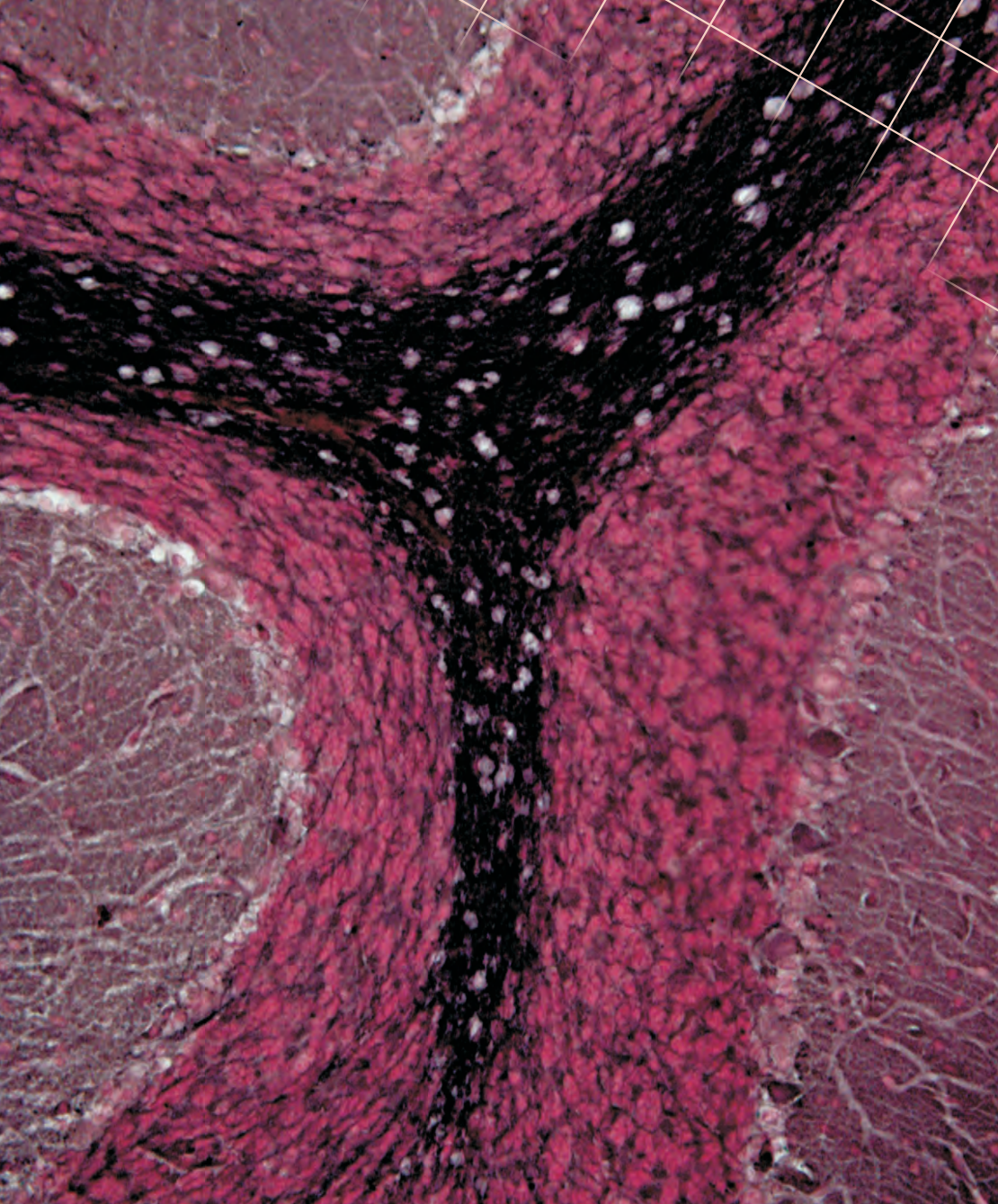
- WALTHER A (1952):** Auffällige Sehstörungen bei Bornascher Krankheit des Pferdes. *Dtsch Tierärztl Wochenschr* 59: 88.
- WALTHER F (1899):** Gehirn-Rückenmarksentzündung bei Pferden und Schafen in der Amtshauptmannstadt Borna. In: *Mitteilungen aus den Berichten der Bezirksthierärzte auf das Jahr 1899. Ber Veterinärwesen Königr Sachsen* 44:80.
- WATANABE M, LEE BJ, KAMIATANI W, KOBAYASHI T, TANIYAMA H, TOMONAGA K, IKUTA K (2001):** Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally borna disease virus-infected gerbils. *Virology* 282: 65–76.
- WATANABE M, LEE BJ, YAMASHITA M, KAMITANI W, KOBAYASHI T, TOMONAGA K, IKUTA K (2003):** Borna disease virus induces acute fatal neurological disorders in neonatal gerbils without virus- and immune-mediated cell destructions. *Virology* 310: 245–253.
- WATANABE M, TOYAMA Y, NISHIYAMA A (2002):** Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion. *J Neurosci Res* 69: 826–836.
- WAXMAN SG (1977):** Conduction in myelinated, unmyelinated, and demyelinated fibers. *Arch Neurol* 34: 585–589.
- WEINER LP (1973):** Pathogenesis of demyelination induced by a mouse hepatitis. *Arch Neurol* 28: 298–303.
- WEISSENBÖCK H, BILZER T, EHRENSPERGER F, GOSZTONYI G, HERDEN C, STAEHELI P, HAUSMANN J, PAGENSTECHE A (2002):** Equine borna disease in Japan. *Vet Rec* 151: 712.
- WEISSENBÖCK H, HORNIG M, HICKEY WF, LIPKIN WI (2000):** Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathol* 10: 260–272.
- WEISSENBÖCK H, NOWOTNY N, CAPLAZI P, KOLODZIEJEK J, EHRENSPERGER F (1998a):** Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol* 36: 2127–2130.
- WEISSENBÖCK H, SUCHY A, CAPLAZI P, HERZOG S, NOWOTNY N (1998b):** Borna disease in Austrian horses. *Vet Rec* 143: 21–22.
- WEKERLE H, SUN D, OROPEZA-WEKERLE RL, MEYERMANN R (1987):** Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol* 132: 43–57.
- WEN W, MEINKOTH JL, TSIEN RY, TAYLOR SS (1995):** Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82: 463–473.

- WIGGINS RC (1982):** Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Res* 257: 151–175. Review.
- WINDEBANK AJ, WOOD P, BUNGE RP, DYCK PJ (1985):** Myelination determines the caliber of dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurosci* 5: 1563–1569.
- WISNIEWSKI H, RAINE CS, KAY WJ (1972):** Observations on viral demyelinating encephalomyelitis. Canine distemper. *Lab Invest* 26: 589–599.
- WOLFF T, PFLEGER R, WEHNER T, REINHARDT J, RICHT JA (2000):** A short leucine-rich sequence in the Borna disease virus p10 protein mediates association with the viral phospho- and nucleoproteins. *J Gen Virol* 81: 939–947.
- WOLSWIJK G (2000):** Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain* 123: 105–115.
- WOLSWIJK G (2002):** Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 125: 338–349.
- WONG GH, BARTLETT PF, CLARK-LEWIS I, McKIMM-BRESCHKIN JL, SCHRADER JW (1985):** Interferon-gamma induces the expression of H-2 und Ia antigens on brain cells. *J Neuroimmunol* 7: 255–278. Review.
- WOODRUFF RH, FRANKLIN RJ (1997):** Growth factors and remyelination in the CNS. *Histol Histopathol* 12: 459–466. Review.
- WOOLLETT GR, BARCLAY AN, PUCLAVEC M, WILLIAMS AF (1985):** Molecular and antigenic heterogeneity of the rat-leucocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Euro J Immunol* 15: 168–173.
- WÖRZ (1858):** Die halbakute Gehirnentzündung oder Kopfkrankheit der Pferde. *Ebner & Seubert, Stuttgart*.
- WU LL, ZHANG L, SHAO J, QIN YF, YANG RW, ZHAO ZY (2008):** Effect of perinatal iron deficiency on myelination and associated behaviours in rat pups. *Behav Brain Res* 188: 263–270.
- YILMAZ H, HELPS CR, TURAN N, UYSAL A, HARBOUR DA (2002):** Detection of antibodies to Borna disease virus (BDV) in Turkish horse sera using recombinant p40. Brief report. *Arch Virol* 147: 429–435.
- YOKOO H, NOBUSAWA S, TAKEBAYASHI H, IKENAKA K, ISODA K, KAMIYA M, SASAKI A, HIRATO J, NAKAZATO Y (2004):** Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am J Pathol* 164: 1717–1725.

- YOLKEN RH, TORREY EF (1995):** Viruses, schizophrenia and bipolar disorder. *Clin Microbiol Rev* 8: 131–145.
- ZALC B, FIELDS RD (2000):** Do action potentials regulate myelination? *Neuroscientist* 6: 5–12. Review.
- ZHOU Q, WANG S, ANDERSON DJ (2000):** Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25: 331–343.
- ZOCHER M, CZUB S, SCHULTE-MONTING J, DE LA TORRE JC, SAUDER C (2000):** Alterations in neurotrophin and neurotrophin receptor gene expression patterns in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J Neurovirol* 6: 462–477.
- ZURBRIGGEN A, SCHMID I, GRABER HU, VANDEVELDE M (1998):** Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta Neuropathol (Berl)* 95: 71–77.
- ZURBRIGGEN A, VANDEVELDE M, DUMAS M (1986):** Secondary degeneration of oligodendrocytes in canine distemper virus infection in vitro. *Lab Invest* 54: 424–431.
- ZURBRIGGEN A, VANDEVELDE M, DUMAS M, GRIOT C, BOLLO E (1987):** Oligodendroglial pathology in canine distemper virus infection in vitro. *Acta Neuropathol* 74: 366–373.
- ZURBRIGGEN A, YAMAWAKI M, VANDEVELDE M (1993):** Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. *Lab Invest* 68: 277–284.
- ZWICK W (1939):** Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. In: *GILDEMEISTER E, HAAGEN E, WALDMANN O (Hrsg.), Handbuch der Viruskkrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena, 254–354.*
- ZWICK W, SEIFRIED O (1925):** Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). *Berl Tierärztl Wochenschr* 41: 129–132.
- ZWICK W, SEIFRIED O, WITTE J (1927):** Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). *Z Infkrkh Haustiere* 30: 42–136.

9 Anhang

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 zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5467-9



9 783835 954678