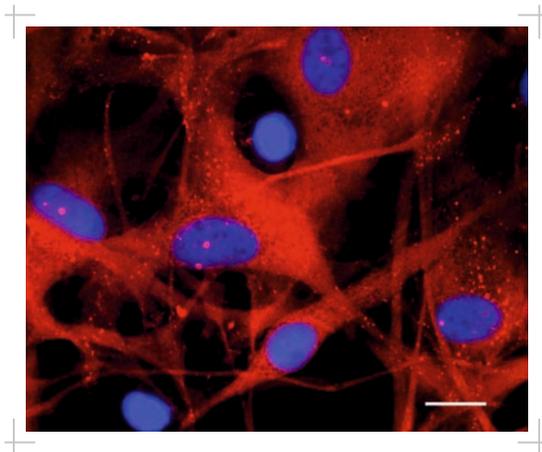


Ausbreitungs- und Persistenzstrategien des Virus der Bornaschen Krankheit in primären corticalen Astrozytenkulturen von Lewis-Ratten

KRISTINE KEHR



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

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

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

1. Auflage 2016

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

1st Edition 2016

© 2016 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 Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. Christiane Herden

**Ausbreitungs- und Persistenzstrategien
des Virus der Bornaschen Krankheit
in primären corticalen Astrozytenkulturen von Lewis-Ratten**

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

eingereicht von

Kristine Kehr

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2016

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. C. Herden
Prof. Dr. G. Tekes

Tag der Disputation: 28.04.2016

Meinen Eltern

Ich erkläre:

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

Daten der vorliegenden Arbeit wurden für folgende Publikationen verwandt:

Barbara Ahlemeyer, Kristine Kehr, Elke Richter, Manuela Hirz, Eveline Baumgart-Vogt, Christiane Herden (2013)

Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions.

J. Neurosci. Methods 212 (1), pp. 156-164

Frank Lennartz, Karen Bayer, Kristine Kehr, Yinghui Lu, Manuela Hirz, Thorsten Steinmetzer, Wolfgang Garten, Christiane Herden (2016)

Surface glycoprotein of Borna Disease virus mediates virus spread from cell to cell

Cell Microbiol 18 (3), pp. 340 – 354

Phantasie ist wichtiger als Wissen,
denn Wissen ist begrenzt.
Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 ASTROZYTEN.....	3
2.1.1 Physiologische Bedeutung von Astrozyten	3
2.1.1.1 Astrozytendifferenzierung in vivo.....	5
2.1.1.2 Astrozytenreifung in vivo.....	7
2.1.2 Pathophysiologische Bedeutung von Astrozyten	9
2.1.3 Primäre Astrozytenkulturen.....	11
2.2 BORNASCHE KRANKHEIT	12
2.2.1 Wirtsspektrum, Reservoir und geographische Ausbreitung	13
2.2.2 Klinik bei natürlich infizierten Tieren.....	16
2.2.3 Klinik bei experimentell infizierten Lewis-Ratten	16
2.2.4 Übertragung und Infektionsweg.....	18
2.2.5 Pathogenese	18
2.3 BORNA DISEASE VIRUS (BDV)	19
2.3.1 Aufbau des Virus.....	19
2.3.2 Genomorganisation und Regulation der Genexpression	20
2.3.3 Proteine des BDV	23
2.3.3.1 Hüllproteine (BDV-M, BDV-GP).....	23
2.3.3.2 Proteine des Ribonukleoproteinkomplexes (BDV-N, BDV-P, BDV-L und BDV-X)	26
2.3.4 Infektionszyklus	29
2.3.5 Ausbreitung behüllter Viren.....	32
2.3.5.1 Allgemeines zur Ausbreitung behüllter Viren.....	32
2.3.5.2 BDV-Ausbreitung in Zellkulturen.....	33
2.3.6 Persistenzmechanismen.....	34
2.4 ZELLTROPISMUS DES BDV	36
2.4.1 Astrozyten	36
2.4.2 Neurone, Oligodendrozyten und andere Gehirnzellen	37
2.4.3 Neonatale Infektion von Epithelzellen	37
2.5 ANTIVIRALE INTERVENTIONSSTRATEGIEN.....	38
2.5.1 Prophylaxe- und Therapieansätze bei Bornascher Krankheit.....	38
2.5.2 Furin und Furin-Inhibitor MI-0701	39
2.5.2.1 Furin und andere Subtilisin-ähnliche Pro-Protein-Konvertasen (SPCs)	39
2.5.2.2 SPC-Inhibitoren und der Furin-Inhibitor MI-0701.....	40

INHALTSVERZEICHNIS

3. MATERIAL UND METHODEN	42
3.1 VERSUCHSPLANUNG	42
3.2 VERSUCHSTIERE.....	43
3.2.1 Tiere zur Präparation primärer corticaler Astrozytenkulturen.....	43
3.2.2 Kontrolltiere	43
3.3 IN VITRO KONTROLLMATERIAL	44
3.4 VIRUSPRÄPARATION	44
3.5 ALLGEMEINE VIROLOGISCHE ARBEITSSCHRITTE	44
3.6 PRÄPARATION UND BDV-INFEKTION PRIMÄRER CORTICALER ASTROZYTEN	45
3.6.1 Optimierung der Präparationsmethode.....	45
3.6.2 Präparation.....	45
3.6.3 Reinheit der Astrozytenkulturen.....	48
3.6.4 BDV-Infektion.....	48
3.7 ZELLKULTURTECHNIK	49
3.7.1 Medienwechsel.....	49
3.7.2 Subkultur adhärenter Zellen (Passagieren).....	49
3.7.3 Einfrieren von Zellen.....	50
3.7.4 Auftauen von Zellen.....	50
3.7.5 DAPI-Test zum Nachweis von Mycoplasmen	51
3.8 GEWINNUNG VON UNTERSUCHUNGSMATERIAL	51
3.8.1 Material für Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	51
3.8.1.1 Vorbehandlung der Multitest-Objektträger und Deckgläschen.....	51
3.8.1.2 Aussäen der Zellen auf Multitest-Objektträgern und 24-Well Platten	51
3.8.2 Herstellung von Gefrierschnitten	52
3.8.3 Material für Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)	52
3.8.4 RNA- und Proteinlysate für real-time PCR (qPCR) und Western Blot (WB)	52
3.8.5 Zellkulturüberstand zum Nachweis von infektiösem BDV.....	53
3.9 INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ (IF)	53
3.9.1 Etablierung unterschiedlicher Fixierungsmethoden	53
3.9.2 Seren und Antikörper	53
3.9.3 Nachweis astrozytärer Reifungs- und Differenzierungsmarker	56
3.9.4 Nachweis von BDV-N, BDV-M und BDV-GP.....	57
3.9.5 Nachweis astrozytärer Reifungs- und Differenzierungsmarker und BDV-N auf 24-Well Platten.....	57
3.9.6 Kontrollen der indirekten Immunfluoreszenz.....	58
3.9.7 Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz	58

INHALTSVERZEICHNIS

3.10 WESTERN BLOT (WB).....	59
3.10.1 Lektinpräzipitation	60
3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	60
3.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	61
3.10.4 Transfer von Proteinen auf eine Blottingmembran (Western Blot).....	61
3.10.5 Immunodetektion von Proteinen auf Blottingmembranen	62
3.10.5.1 Immunodetektion auf PVDF-Membranen.....	63
3.10.5.2 Immunodetektion auf Nitrozellulose-Membranen	63
3.10.6 Chemilumineszenzdetektion.....	64
3.10.7 Kontrollen des Western Blots.....	64
3.11 IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH)	64
3.11.1 Sondenherstellung	65
3.11.2 Durchführung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH).....	66
3.11.3 Kontrollen der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung	68
3.11.4 Auswertung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung	68
3.12 REAL-TIME PCR (qPCR, quantitative PCR)	69
3.12.1 Herstellung der Standardverdünnungsreihen	69
3.12.1.1 PCR zur Amplifikation der spezifischen Plasmid-Inserts	69
3.12.1.2 Aufreinigung der DNA und photometrische Messung.....	71
3.12.1.3 Bestimmung der DNA-Kopienzahl	71
3.12.2 Spezifische Reverse Transkription (spezifische RT).....	71
3.12.3 Real-time PCR.....	75
3.12.4 Reaktionsansatz für die real-time PCR.....	75
3.12.5 Kontrollen für die real-time PCR	76
3.12.6 Quantifizierung und Normalisierung der Genexpression.....	77
3.13 INFEKTIOSITÄT DES ZELLKULTURÜBERSTANDES	77
3.14 UNTERSUCHUNG DER ROLLE DES GLYKOPROTEINS BEI DER GLIA-GLIALEN BDV-AUSBREITUNG	78
3.14.1 Versuchsaufbau	78
3.14.2 Kontrollen des Ausbreitungsversuchs	79
3.14.3 Auswertung des Ausbreitungsversuchs.....	79
3.15 STATISTIK.....	79
4. ERGEBNISSE.....	81
4.1 ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG DER PRIMÄREN CORTICALEN ASTROZYTENKULTUREN	81
4.1.1 Morphologie der primären corticalen Astrozyten	81
4.1.2 Zusammensetzung der Zellkulturen	81

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.3 Einfluss der Präparationsmethode auf die Zellausbeute.....	82
4.1.4 Geeignete Zellkultursysteme für primäre corticale Astrozyten.....	82
4.1.5 Etablierung der geeigneten Fixierungsmethode für den Nachweis der BDV-spezifischen Antigene.....	84
4.1.5.1 Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA).....	84
4.1.5.2 Fixierung mit Aceton.....	85
4.1.6 Kryokonservierung und Langzeitlagerung der primären corticalen Astrozyten.....	85
4.1.7 Untersuchung auf Mycoplasmen.....	85
4.2 NACHWEIS DER ASTROZYTENREIFUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSMARKER MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESZENZ.....	85
4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises der Astrozytenreifungs- und differenzierungsmarker-Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz.....	86
4.2.2 Astrozytenreifung.....	87
4.2.2.1 GFAP-Expression.....	87
4.2.2.2 Vimentin-Expression.....	88
4.2.2.3 S100 β -Expression.....	89
4.2.2.4 Nestin-Expression.....	89
4.2.2.5 A2B5-Expression.....	90
4.2.3 Astrozytendifferenzierung.....	92
4.2.3.1 GLAST-Expression.....	92
4.2.3.2 GLT-1-Expression.....	92
4.2.4 BDV-Infektion.....	94
4.3 NACHWEIS VON BDV-SPEZIFISCHEN ANTIGENEN MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESZENZ.....	95
4.3.1 Nachweis und Ausbreitung der BDV-Infektion in primären corticalen Astrozytenkulturen.....	95
4.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises von BDV-N, BDV-M und BDV-GP mittels Indirekter Immunfluoreszenz.....	95
4.3.3 Nachweis von BDV-N.....	97
4.3.4 Nachweis von BDV-M.....	98
4.3.5 Nachweis von GFAP.....	98
4.4 NACHWEIS VON BDV-SPEZIFISCHEN ANTIGENEN MITTELS WESTERN BLOT.....	98
4.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	99
4.4.2 Nachweises von BDV-N, BDV-M und BDV-GP.....	99
4.4.3 Nachweis von β -Actin und GFAP.....	100
4.5 NACHWEIS VON BDV-RNA MITTELS FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH).....	100
4.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung.....	100
4.5.2 Nachweis von BDV-N mRNA (BDV-N +ssRNA).....	102

INHALTSVERZEICHNIS

4.5.3 Nachweis von BDV-M mRNA (BDV-Intron-I +ssRNA).....	102
4.5.4 Nachweis von BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA)	102
4.5.5 Nachweis von genomischer BDV-N vRNA (BDV-N genRNA, BDV-N –ssRNA)	103
4.6 NACHWEIS VON BDV-RNA MITTELS REAL-TIME PCR (qPCR)	103
4.6.1 Sensitivität und Spezifität der Real-time PCR	103
4.6.2 Referenzgene GAPDH, SDHS, HPRT	104
4.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises BDV-spezifischer Transkripte	105
4.6.4 Nachweis der BDV-spezifischen Transkripte	106
4.6.4.1 BDV-N-spezifische Transkripte (BDV-N mRNA, BDV-N +ssRNA).....	106
4.6.4.2 BDV-M-spezifische Transkripte (BDV-M mRNA, BDV-Intron I +ssRNA)	107
4.6.4.3 BDV-GP-spezifische Transkripte (BDV-GP mRNA, BDV-Intron II +ssRNA).....	107
4.7 KORRELATION DER ERGEBNISSE DER BDV-PROTEIN- UND m-RNA-NACHWEISE	107
4.7.1 Korrelation der Ergebnisse zum Nachweis von BDV-Proteinen (IF und WB).....	107
4.7.2 Korrelation der Ergebnisse zum Nachweis von BDV mRNA (FISH und qPCR).....	108
4.7.3 Korrelation der Ergebnisse zum Nachweis von BDV-Proteinen und BDV mRNA (IF+WB und FISH+qPCR)	110
4.8 UNTERSUCHUNG DER INFEKTIOSITÄT DES ZELLKULTUR-ÜBERSTANDES BDV-INFIZIERTER PRIMÄRER ASTROZYTEN MITTELS IF	112
4.9 UNTERSUCHUNG DER ROLLE DES BDV-GLYKOPROTEINS BEI DER GLIA-GLIALEN BDV-AUSBREITUNG	112
4.9.1 Einfluss des Furin-Inhibitors MI-0701 auf die Ausbreitung der BDV-Infektion.....	113
4.9.2 Zellmorphologie nach Behandlung mit MI-0701	114
4.10 FOTOGRAFISCHE DOKUMENTATION DER ERGEBNISSE	115
5. DISKUSSION	125
5.1 ETABLIERUNG UND EIGNUNG DER ASTROZYTENKULTUREN.....	126
5.2 ASTROZYTENREIFUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSMARKER	131
5.2.1 Astrozytenreifung	131
5.2.2 Astrozytendifferenzierung.....	136
5.2.3 Einfluss der BDV-Infektion auf Astrozytenreifung und -differenzierung	137
5.3 EINSATZ UND GRENZEN PRIMÄRER CORTICALER ASTROZYTEN AM BEISPIEL DER UNTERSUCHUNG DER BDV-AUSBREITUNG	138
5.4 AUSBREITUNG UND EXPRESSION VON BDV PROTEINEN UND RNA IN PRIMÄREN CORTICALEN ASTROZYTEN	141
5.4.1 Expression von BDV-N, BDV-M und BDV-GP.....	142
5.4.2 Expression von BDV-N mRNA, BDV-M mRNA, BDV-GP mRNA und BDV-N vRNA	145
5.4.3 Korrelation der viralen Transkription und Proteinexpression	148
5.4.4 Ausbreitungsstrategien des BDV	150

INHALTSVERZEICHNIS

5.4.4.1 Untersuchung der Infektiosität des Zellkulturüberstandes	150
5.4.4.2 Rolle des BDV-Glykoproteins bei der glia-glialen Ausbreitung.....	151
5.5 PERSISTENZMECHANISMEN DES BDV	154
5.6 SCHLUSSBETRACHTUNG.....	157
6. ZUSAMMENFASSUNG	159
7. SUMMARY	164
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	168
9. ANHANG.....	200
9.1 BEZUGSQUELLEN FÜR GERÄTE UND SOFTWARE	200
9.2 BEZUGSQUELLEN FÜR REAGENZIEN, KITS, ANTIKÖRPER UND EINMALWAREN	201
9.3 LÖSUNGEN UND PUFFER	206
9.3.1 Zellkultur	206
9.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz.....	207
9.3.3 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)	208
9.3.4 RNA- und Proteinisolierung, Lektinpräzipitation und Western Blot	213
9.3.5 RT, Real-time PCR und Gelelektrophorese	216
9.4 TABELLEN	217
9.5 ABBILDUNGEN	234
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	238

1. EINLEITUNG

Das Virus der Bornaschen Krankheit (Borna disease Virus, BDV) stellt ein wichtiges Modell für die Untersuchung von Ausbreitungs- und Persistenzmechanismen neurotroper Viren im zentralen Nervensystem (ZNS) und den mit der Infektion verbundenen zentralnervösen Störungen dar (RICHT et al., 1998; HERDEN, 2009).

In vivo zeigt das BDV in den ersten 2 Wochen nach experimenteller Infektion von Lewis-Ratten einen ausgeprägten Tropismus für Neuronen. Es sind nur wenige Astrozyten BDV-infiziert (CARBONE et al., 1987; CARBONE et al., 1991a; RICHT et al., 1991; GOSZTONYI et al., 1993; BAUTISTA et al., 1994; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; GONZALEZ-DUNIA et al., 2005; HERDEN et al., 2005). Im chronischen Stadium der Infektion sind dagegen im gesamten Gehirn verteilt auch zunehmend Astrozyten BDV-positiv (CARBONE et al., 1987; CARBONE et al., 1991a; STAEHEL et al., 2001; OVANESOV et al., 2008). Infizierte Gliazellen scheinen somit ein Reservoir für eine persistente Virusreplikation in der chronischen Infektionsphase zu sein (CARBONE et al., 1987; HERDEN, 2009). Die Adaptationsvorgänge zwischen der akuten und chronisch persistierenden Phase der Bornaschen Krankheit sind bisher jedoch nur unvollständig verstanden. Aus Voruntersuchungen hat sich eindeutig ergeben, dass insbesondere die viralen Strukturproteine im infizierten Gehirn in verschiedenen Zelltypen unterschiedlichen Expressionstrategien unterliegen (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ, 2006; HERDEN, 2009).

Das BDV gelangt über eine rezeptormediierte Endozytose in seine Zielzellen, ein Prozess der durch das mit der Virushülle assoziierte BDV-Glykoprotein (BDV-GP) vermittelt wird (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; RICHT et al., 1998; PEREZ et al., 2001; KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005; CLEMENTE und DE LA TORRE, 2009). BDV-GP wird noch vor dem Zusammenbau infektiöser Viruspartikel durch die zelluläre Protease Furin in eine amino-terminale (BDV-GP-N) und eine carboxy-terminale Untereinheit (BDV-GP-C) gespalten (RICHT et al., 1998; EICKMANN et al., 2005). Diese Spaltung ist essentiell zur funktionellen Aktivierung des Proteins und somit wesentlich für die initiale Bindung des Virus an den Rezeptor der Zielzellen (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; RICHT et al., 1998; PEREZ et al., 2001; KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005).

Die weiteren Ausbreitungsstrategien des BDV nach der initialen Zellinfektion werden nach wie vor kontrovers diskutiert (GOSZTONYI et al., 1993; BAJRAMOVIC et al., 2003). Trotz hoher Mengen viraler BDV-Proteine und RNA wird *in vivo* wenig oder gar kein infektiöses Virus in den Extrazellularraum freigesetzt und es finden sich nur wenige infektiöse Partikel in einer Zelle (PAULI UND LUDWIG, 1985; KOHNO et al., 1999; EICKMANN et al., 2005; GONZALEZ-DUNIA et al., 2005; HERDEN, 2009). Als Ausbreitungsweg gesichert ist bisher lediglich die intraaxonale und transsynaptische Übertragung zwischen Neuronen. Sie geht höchstwahrscheinlich BDV-GP-abhängig, durch Weitergabe behüllter Virionen, von staten (BAJRAMOVIC et al., 2003). Wie das Virus von Neuronen auf andere Gehirnzellen übertragen wird und wie die glia-gliale BDV-Ausbreitung funktioniert, ist bisher nicht bekannt (RICHT et al., 1998; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009; ALGERMISSEN, 2010). Einige Studien

lassen jedoch eine BDV-GP- und wirtszellrezeptorunabhängige Virusausbreitung über nicht behüllte Ribonukleoprotein-Partikel (RNP) vermuten (GOSZTONYI et al., 1993; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007).

Das Hüllprotein BDV-GP konnte bisher in Astrozyten weder *in vivo* noch *in vitro* nachgewiesen werden, sondern fand sich immer nur im Zytoplasma großer Neuronen. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis der für BDV-GP kodierenden mRNA in beiden Zellpopulationen (WERNER-KEIŠS, 2006). Auch beim Nachweis des mit der Virushülle assoziierten BDV-Matrixprotein (BDV-M) ergaben sich in der Vergangenheit offene Fragen. Die für das Protein kodierende mRNA konnte bisher *in vivo* nur vereinzelt in Astrozyten nachgewiesen, und nicht sicher im Zytoplasma als Ort der Proteintranslation detektiert werden (POROMBKA, 2006).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von Astrozyten bei der Ausbreitung des BDV. Außerdem sollte analysiert werden, ob in Astrozyten hinsichtlich der BDV-Protein und – mRNA Expression Unterschiede zwischen der akuten und der chronisch-persistenten Infektionsphase bestehen. Dadurch sollte geklärt werden, ob zellspezifische Regulationsmechanismen in Astrozyten zur BDV-Persistenz beitragen. Dies wurde wie folgt erarbeitet:

1. Zunächst erfolgte die Etablierung und Charakterisierung der primären Astrozytenkulturen aus den cerebralen Cortices von Lewis-Ratten. Es wurden dafür sowohl bei BDV-infizierten als auch bei nicht infizierten Kulturen die glialen Reifungs- und Differenzierungsmarker GFAP, Vimentin, Nestin, S100 β , A2B5, GLAST und GLT-1 untersucht. Dadurch sollten die Eignungen und Grenzen der primären Astrozytenkulturen zur Analyse persistierender Virusinfektionen erarbeitet werden.
2. Die Virusproteine BDV-N, BDV-M und BDV-GP und die dazu gehörenden mRNAs wurden in einer Kinetik in BDV-infizierten Astrozyten *in vitro* untersucht.
3. Die Rolle des BDV-GP für die glia-gliale Virusausbreitung in primären Astrozytenkulturen wurde getestet. Dazu wurde ein Furininhibitor verwendet, der die Spaltung des viralen Glykoproteins in seine beiden funktionellen Untereinheiten BDV-GP-C und BDV-GP-N verhindert (BECKER et al., 2010). Ob Viruspartikel von Astrozyten freigesetzt werden, wurde außerdem anhand von Zellkulturüberstand BDV-infizierter Astrozyten untersucht.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 ASTROZYTEN

Im Säugergehirn kommen zehnmal mehr Gliazellen als Neurone vor, wobei Astrozyten ca. die Hälfte der Gliapopulation ausmachen (KIMELBERG, 1983). Früher sah man Astrozyten lediglich als passiv unterstützende Komponenten für das neuronale Gewebe an. Mittlerweile ist bekannt, dass Astrozyten im gesunden ZNS eine Vielzahl komplexer und essentieller Funktionen ausüben (FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; PARPURA et al., 2012). Astrozyten spielen auch eine Rolle in pathologischen Prozessen. Funktionsstörungen oder abnormale Effekte von Astrozyten sind an vielen Krankheitsprozessen beteiligt oder stellen sogar die Hauptursache für pathologische Effekte dar (MANSOUR et al., 2008; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; STIPURSKY et al., 2012b).

2.1.1 Physiologische Bedeutung von Astrozyten

Astrozyten (griechisch *astro*, *άστρο*: Stern), sind verzweigte Zellen, die durch ihre Fortsätze mit anderen Gliazellen und/oder Neuronen sowie mit der Basallamina der Gefäße, der Zerebrospinalflüssigkeit oder der *Pia mater* in Verbindung stehen (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; PARPURA et al., 2012). Im ZNS stellen sie die größte Zellpopulation (FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Mittlerweile ist bekannt, dass die Morphologie der Astrozyten deutlich komplexer ist als bisher angenommen (BUSHONG et al., 2004; FREEMAN, 2010). Einzelne Astrozyten formen in der grauen Substanz individuelle nicht-überlappende Domänen, so dass nur die distalen Spitzen ihrer Fortsätze über *Gap junctions* mit benachbarten Astrozyten in Verbindung stehen (BUSHONG et al., 2004; JABS et al., 2008; WELBERG, 2009; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; VERKHRATSKY et al., 2010; PARPURA et al., 2012). Innerhalb dieser individuellen Domäne interagieren Astrozyten mit 4-8 Neuronen (VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; VERKHRATSKY et al., 2010) und können bei Nagern einen Bereich zwischen 20.000 und 80.000 μm^3 einnehmen (FREEMAN, 2010). Mit ihren terminalen Fortsätzen stehen sie insbesondere mit Synapsen in Verbindung bzw. umschließen diese (FREEMAN, 2010; PARPURA et al., 2012), dabei kann ein einzelner Astrozyt bei Nagern mit 20.000 – 100.000 Synapsen verknüpft sein, bei Primaten oder Menschen sogar mit bis zu zwei Millionen (FREEMAN, 2010; KIMELBERG, 2010; PARPURA et al., 2012). Interzelluläre *Gap junction*-Verbindungen dienen dem Austausch von Signalmolekülen kleiner als 1 bis 1,2 kDa und 1,5 nm im Durchmesser (THOMPSON UND MACVICAR; GIAUME et al., 2010; THEIS UND GIAUME, 2012). Als Beispiel sind Ionen (K^+ , Ca^{2+} und Na^+), Glutamat, *second messenger* (z.B. ATP) und Metaboliten wie z.B. Glucose und Aminosäuren zu nennen (THEIS UND GIAUME, 2012). Durch diese *Gap junction*-Kanäle entstehen größere astrogliale Netzwerke, die unter anderem über Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine intergliale Kommunikation ermöglichen können (WALLRAFF et al., 2004; SEIFERT et al., 2006; FREEMAN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; PARPURA et al., 2012; THEIS UND GIAUME, 2012). Ob diese Ca^{2+} -Wellen *in situ* und *in*

vivo auch unter physiologischen Bedingungen auftreten, ist bisher jedoch noch nicht sicher geklärt (GIAUME et al., 2010). Im Bereich des Cortex cerebri können in diesen Netzwerken mehrere hundert Astrozyten miteinander verkettet sein (THEIS UND GIAUME, 2012). Durch die Bildung unterschiedlich großer Domänen wird die graue Substanz in astrogliale Territorien geteilt, die durch ihre Verbindung mit Neuronen und Gefäßen wiederum neurovaskuläre Einheiten formen (FREEMAN, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; PARPURA et al., 2012). Nahezu die gesamte Gefäßoberfläche des Gehirns ist von den plattenartig verbreiterten Fortsatzenden (*endfeets*) der Astrozyten eingehüllt (PARPURA et al., 2012). Durch ihre strategische Position zwischen Gefäßen und Neuronen können Astrozyten den Austausch von Molekülen zwischen diesen beiden steuern und stellen somit das Verbindungsglied in der sogenannten neurovaskulären Kopplung (*neurovascular coupling*) dar (GIAUME et al., 2010; PARPURA et al., 2012). Die funktionelle Rolle der Astrozyten bei der Bildung und Aufrechterhaltung der Bluthirnschranke (*blood brain barrier*, BBB) ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Hinweise, dass Astrozyten die Bildung der BBB über Induktion der Barrierefunktion von Endothelzellen beeinflussen können (KIMELBERG, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010).

Astrozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Gehirnentwicklung, wo sie sowohl die Neurogenese als auch die Entwicklung von neuronalen und glialen Netzwerken regulieren (FREEMAN, 2010; KIMELBERG, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; PARPURA et al., 2012; STIPURSKY et al., 2012a; STIPURSKY et al., 2012b). Sie stehen insbesondere im Bereich von Synapsen in einer engen, dynamischen Verbindung mit Neuronen, wo sie die sogenannte *tripartite* Synapse formen, die aus 2 Neuronen und einem Astrozyten besteht (KIMELBERG, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; PARPURA et al., 2012). In diesen Bereichen regulieren Astrozyten die Flüssigkeits-, Ionen-, pH- und Neurotransmitterhomöostase (MANSOUR et al., 2008; WELBERG, 2009; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2011) und tragen durch *Gap Junction*-medierte Diffusion von Metaboliten zur Energieversorgung der Neuronen bei (WELBERG, 2009; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2011; PARPURA et al., 2012). Es gibt Hinweise, dass durch Ca^{++} -abhängige Exocytose chemische Transmitter, sogenannte Gliotransmitter, als Antwort auf Veränderungen der neuronalen synaptischen Aktivität freigesetzt werden (SEIFERT et al., 2006; JABS et al., 2008; FREEMAN, 2010; GIAUME et al., 2010; KIMELBERG, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; PARPURA et al., 2012). Diese Gliotransmitter können vermutlich die synaptische Plastizität modulieren und dadurch Verhaltensänderungen hervorrufen (FREEMAN, 2010; GIAUME et al., 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; PARPURA et al., 2012); allerdings ist noch nicht gesichert, ob die in zahlreichen Studien gewonnenen Erkenntnisse tatsächlich die Verhältnisse *in vivo* widerspiegeln (GIAUME et al., 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Denkbar ist jedoch, dass Astrozyten, die mit ihren Verästelungen viele tausend Synapsen gleichzeitig erreichen, durch die Abgabe von Gliotransmittern zu einer Synchronisation der neuronalen Signalübertragungsmuster (des neuronalen „Feuerns“) führen können (SEIFERT

et al., 2006). In welchem Maße diese unterschiedlichen astrozytären Funktionen von allen Astrozyten oder teilweise nur von bestimmten Subpopulationen bekleidet werden, ist noch unklar (ZHANG UND BARRES, 2010).

Cytoneme und tunnelformende Nanoröhren (*tunneling nanotubes, TNTs*) sind weitere relativ neu entdeckte Zell-zu-Zell-Verbindungen, die nicht nur Kommunikationsverbindungen sind, sondern auch dem interzellulären Transport dienen (GERDES et al., 2007; SHERER UND MOTHESE, 2008; WANG et al., 2011). Der Durchmesser dieser Kanäle beträgt 50 bis 200 nm und ihre Länge kann mehrere Zelldurchmesser betragen (GERDES et al., 2007). Entlang der Außenseite von Cytonemen bzw. Filopodienbrücken können Stoffe transportiert werden während in TNTs Stoffe und Zytoplasmabestandteile (Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi, Mitochondrien, Endosomen) innerhalb eines offenen Kanals von Zelle zu Zelle weitergegeben werden (SHERER UND MOTHESE, 2008; WANG et al., 2011). Diese Zell-zu-Zellverbindungen scheinen auch bei der Ausbreitung mancher Viren eine Rolle spielen zu können (SHERER UND MOTHESE, 2008; WANG et al., 2011).

2.1.1.1 Astrozytendifferenzierung in vivo

Astrozyten sind sowohl funktionell als auch morphologisch gesehen eine heterogene Zellgruppe (JABS et al., 2008; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012). Sie können aufgrund ihrer unterschiedlichen Morphologie und anatomischen Lokalisation in drei Haupttypen eingeteilt werden. Protoplasmatische und fibröse Astrozyten befinden sich im Großhirn, Bergmann Gliazellen dagegen ausschließlich im Kleinhirn (WALLRAFF et al., 2004; GOURSAUD et al., 2009; KIMELBERG, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012; PARPURA et al., 2012).

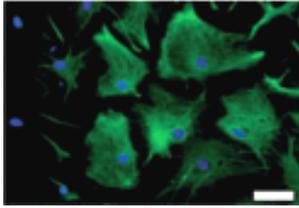
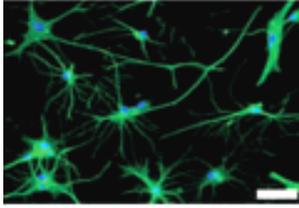
Protoplasmatische Astrozyten (Typ 1-Astrozyten) findet man in der gesamten grauen Substanz (GOURSAUD et al., 2009; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Sie haben eine flache, polygonale Struktur (FAN et al., 1999) und besitzen jeweils 5-10 Hauptäste, von denen wiederum viele feine Verästelungen abzweigen (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010) (Tabelle 1). Dies gibt ihnen ein schwammartiges Aussehen mit einem Netzwerk stark verzweigter Fortsätze (BUSHONG et al., 2004; JABS et al., 2008). Mit diesen Fortsätzen stehen Typ 1-Astrozyten in Kontakt mit Blutgefäßen und umschließen Synapsen (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; LANGE et al., 2012). Protoplasmatische Astrozyten werden teilweise auch als elektrophysiologisch passive Astrozyten bezeichnet, da sie ein lineares Spannungs-Strom-Verhältnis haben (JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010) und große zeit- und spannungsunabhängige passive Membrankanäle besitzen (WALLRAFF et al., 2004; JABS et al., 2008). Im Gegensatz zu Typ 2-Astrozyten zeigen sie eine ausgeprägte *Gap junction*-Kopplung, was sich durch den Nachweis des Transmembranproteins Connexin 43 darstellen lässt (WALLRAFF et al., 2004; JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010). Eine Hauptaufgabe dieser Astrozyten ist die Aufnahme von Neurotransmittern, die von Neuronen freigesetzt werden (ANDERSON UND SWANSON,

2000; SEIFERT et al., 2006; JABS et al., 2008). Zu diesem Zweck besitzen Typ 1-Astrozyten Glutamattransporter, haben jedoch keine Glutamat-Rezeptoren (WALLRAFF et al., 2004; JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010), so dass sie auch als GluT-Astrozyten (Glutamattransporter-Astrozyten) bezeichnet werden (SEIFERT et al., 2006; JABS et al., 2008). Die Transmitteraufnahme wird durch zwei gliaspezifische Glutamattransporter, EAAT1 und EAAT2, gewährleistet, die bei Nagern Glutamat-Aspartat Transporter (GLAST) und Glutamat-Transporter 1 (GLT-1) genannt werden (SEIFERT et al., 2006; JABS et al., 2008). Tabelle 1 gibt eine Übersicht zur Differenzierung in Typ 1 und Typ 2-Astrozyten

Fibröse Astrozyten (Typ 2-Astrozyten) kommen in der gesamten weißen Substanz vor und haben eine rundliche Form mit vielen dünnen faserähnlichen Fortsätzen mit denen sie in Kontakt mit Ranvierschen Schnürringen stehen (Tabelle 1) (GOURSAUD et al., 2009; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012) und somit offenliegende Axone zwischen benachbarten Myelinscheiden umhüllen (WOLSWIJK UND NOBLE, 1989). Die Zellen zeigen eine ausgeprägte GFAP-Expression (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Aus elektrophysiologischer Sicht können sie als „komplexe Astrozyten“ bezeichnet werden (JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010), da sie spannungs- und zeitabhängige K^+ Ströme aufweisen (WALLRAFF et al., 2004; ZHANG UND BARRES, 2010). Typ 2-Astrozyten exprimieren Glutamatrezeptoren vom AMPA-Typ (ionophore Glutamatrezeptoren) (VERKHRATSKY UND STEINHÄUSER, 2000; WALLRAFF et al., 2004; JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010) und erhalten via freigesetztem Glutamat synaptischen Input von glutamatergen und GABAergen Neuronen (SEIFERT et al., 2006). Sie exprimieren jedoch keine Glutamattransporter und sind nicht durch *Gap junctions* gekoppelt, somit zeigen sie auch keine Connexin 43 Expression (WALLRAFF et al., 2004; JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010) und scheinen nicht an der Pufferung von K^+ und Glutamat beteiligt zu sein (WALLRAFF et al., 2004). In einigen Veröffentlichungen werden Typ 2-Astrozyten auch als GluR-Zellen (Glutamatrezeptor-Astrozyten) bezeichnet (SEIFERT et al., 2006; JABS et al., 2008). Tabelle 1 gibt eine Übersicht zur Differenzierung in Typ 1- und Typ 2-Astrozyten

Ob Typ 1- und Typ 2-Astrozyten von gemeinsamen oder unabhängigen Astrozytenvorläuferzellen gebildet werden, ist noch nicht genau bekannt, neuere Erkenntnisse deuten jedoch eher auf die Existenz von unabhängigen Vorläuferzellen hin (MARÍN-PADILLA, 1995; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010).

Tabelle 1: Astrozytendifferenzierung in Typ 1- und Typ 2-Astrozyten

Astrozytendifferenzierung		
	Typ 1-Astrozyten	Typ 2-Astrozyten
Morphologie	 <p>protoplasmatisch (flach und polygonal)</p>	 <p>rund mit dünnen, faser- artigen Fortsätzen</p>
Lokalisation	graue Substanz	weiße Substanz
Kontakt mit Blutgefäßen	++	-
Gap Junction-Kopplung	++	-
Connexin 43-Expression	++	-
GLAST-Expression	++	-
GLT-1-Expression	+ bis ++	-
Glutamaterezeptor-Expression	-	++

-: nicht vorhanden; (+): kaum vorhanden; +: geringgradig ausgeprägt; ++: mittelgradig bis stark ausgeprägt (Abbildungen von GFAP markierten Typ 1- und Typ 2-Astrozyten aus Goursaud et al., 2009)

2.1.1.2 Astrozytenreifung in vivo

Astrozyten zählen wie Oligodendrozyten zu den Makrogliazellen und sind neuroektodermalen Ursprungs (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010). Es scheinen sowohl räumlich als auch zeitlich unterschiedliche Mechanismen zur Entwicklung der verschiedenen Gehirnzellen beizutragen (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010). Während der embryonalen Gehirnentwicklung generieren multipotente neurale Stammzellen Neuronen und Gliavorläuferzellen, die in ihrem Differenzierungspotential weitgehend festgelegt sind (MANSOUR et al., 2008; CHAN-LING et al., 2009; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHENG et al., 2012). Im Laufe dieses Prozesses werden zunächst aus *neural precursor cells (NPCs)* Neuronen- und später Gliazellen gebildet (FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010). Die Mechanismen, die diesem Wechsel von Neurogenese zu Gliogenese zugrundeliegen, sind bisher noch unzureichend verstanden. Es scheinen aber sowohl extrinsische Umweltfaktoren von neu generierten Neuronen und andere lösliche Faktoren des ZNS als auch intrinsische Faktoren beteiligt zu sein (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; STIPURSKY et al., 2012a; STIPURSKY et al., 2012b).

Die zugrundeliegenden Mechanismen der weiteren Entwicklung und Ausreifung sind für die meisten Zelltypen des ZNS relativ gut verstanden (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010). Was die Astrozytenentwicklung angeht ist jedoch vieles unklar. Beispielsweise sind die Gene und

die Signalwege, die eine immature astrozytäre Zelle dazu bringen, sich zu einem murenen Astrozyten zu entwickeln noch weitgehend unentdeckt (CHAN-LING et al., 2009; FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; STIPURSKY et al., 2012b). Gliogenese findet von der späten Embryonalphase bis in die neonatale und postnatale Periode statt, währenddessen sich Astrozyten ständig teilen (LANGE et al., 2012). Die Astrogenese scheint im Embryo mit der späten Phase der radialen Gliazellfunktion verbunden zu sein. Eine genaue Zeitbestimmung scheidet derzeit jedoch noch häufig am Mangel aussagekräftiger Marker für Astrozytenvorläuferzellen, was es schwierig oder unmöglich macht sie von radialen Gliazellen zu unterscheiden (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010). Das extrazelluläre Milieu beeinflusst während der Gliogenese die Regulation der Transkriptionsfaktoren und Genexpression und bedingt dadurch eine weitere Ausdifferenzierung der Zellen (LANGE et al., 2012). Nachdem die Astrozytenspezifikation stattgefunden hat, wandern Astrozytenvorläuferzellen zu ihrer endgültigen Position, wo sie ihre terminale Differenzierung beginnen (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010). Während der Astrozytenreifung findet eine Veränderung der Astrozytenfunktion statt und der Reifungsgrad beeinflusst *in vivo* und *in vitro* sowohl das Transkriptom als auch das Proteom der Zellen (LANGE et al., 2012). Die Ausreifung von Astrozytenkulturen kann durch den Nachweis bestimmter Marker untersucht werden (AHLEMEYER et al., 2013).

Neuron cell surface antigen, auch **A2B5** genannt, ist ein Gangliosid-Epitop auf der Plasmamembran von Neuronen, neuroendokrinen Zellen und Gliazellen (DUBOIS-DALCQ, 1987). Der Marker ist unter anderem in oligodendroglialen Vorläuferzellen vorhanden, und findet sich in immaturren Zellen, die sich entweder zu Typ 2-Astrozyten oder zu Oligodendrozyten differenzieren (DUBOIS-DALCQ, 1987; ALOISI et al., 1988; MARÍN-PADILLA, 1995; YANG UND HERNANDEZ, 2003).

Nestin ist ein großes Intertmediärfilament-Protein der Klasse IV und dient als Marker neuronaler Stammzellen (BRAMANTI et al., 2010). Als Bestandteil des Zytoskeletts wird es vorübergehend auch in immaturren Astrozyten mit GFAP koexprimiert (BRAMANTI et al., 2010; BRUNET et al., 2010). Auch reaktive, adulte Astrozyten exprimieren erneut Nestin (BRAMANTI et al., 2010).

Vimentin und **glial fibrillary acidic protein (GFAP, Saures Gliafaserprotein)** sind Klasse III Intermediärfilament-Proteine und somit Komponenten des Zytoskeletts (HERRMANN UND AEBI, 2000). Die Vimentinexpression fällt bei zunehmender Astrozytenausreifung ab, während die GFAP-Expression im Zuge der Maturation ansteigt (MANZANO et al., 2007; BRAMANTI et al., 2010; AHLEMEYER et al., 2013).

S100 β ist ein EF-Hand calciumbindendes Peptid, das hauptsächlich von Astrozyten gebildet wird und parakrine und autokrine Effekte auf Neurone und Gliazellen ausübt (ROTHERMUNDT et al., 2003; OHTAKI et al., 2007). Eine weitere wichtige Rolle dieses Proteins scheint die Förderung einer Entzündungsantwort als Zytokin zu sein. Dies geschieht durch Bindung an seinen zellulären Oberflächenrezeptor RAGE (*receptor of advanced glycation end products*) (OHTAKI et al., 2007). Das Protein ist in eine Vielzahl von zellulären

Antworten eingebunden, so beeinflusst es Proteinphosphorylierung, Zellproliferation und Differenzierung, strukturelle Reorganisation von Membranen, Zytoskelettmodifikationen, intrazelluläre Kalziumhomöostase und begünstigt das zelluläre Überleben (OHTAKI et al., 2007).

In Untersuchungen an Ratten und humanen fetalen Retinae, die aufgrund ihres gemeinsamen embryonalen Ursprungs als Teil des ZNS gelten, konnten fünf Stadien der Astrozytendifferenzierung unterschieden werden: 1. Astrozytenvorläuferzellen (*astrocyte precursor cells*), die A2B5 und Vimentin-positiv sowie GFAP und S100β negativ sind (MANSOUR et al., 2008; CHAN-LING et al., 2009). 2. Immature perinatale Astrozyten (*immatur perinatal astrocytes*), die Vimentin, GFAP und S100β exprimieren und für A2B5 negativ sind. Die dritte Gruppe stellen mature perinatale Astrozyten (*mature perinatal astrocytes*) dar, die GFAP und S100β exprimieren und negativ für Vimentin sind. Das gleiche gilt für die 4. Gruppe der jungen adulte Astrozyten (*young adulte astrocytes*). Bei der 5. Gruppe, den gealterten Astrozyten (*aged astrocytes*), findet man dagegen keine Vimentin- und S100β-, sondern nur noch GFAP-Expression (CHU et al., 2001; CHAN-LING et al., 2009). Eine Übersicht gibt Abbildung 1.

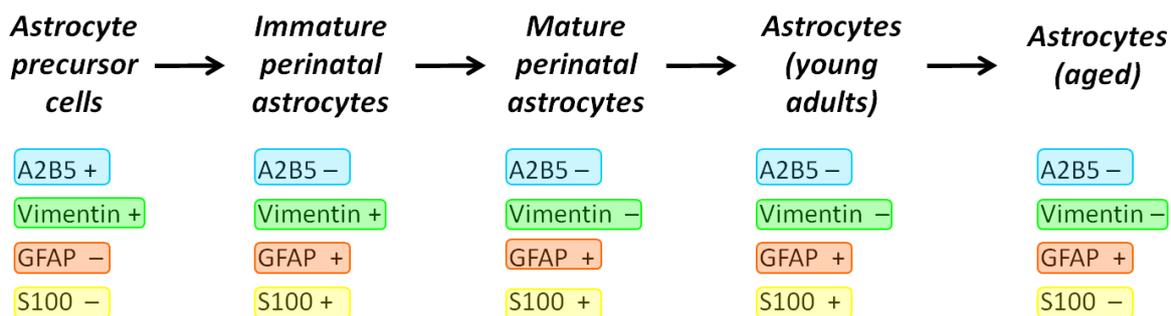


Abbildung 1: Astrozytenreifung *in vivo* (nach CHAN-LING et al., 2009)

Verschiedene Entwicklungsstadien von Astrozyten können mit unterschiedlicher Markerexpression nachgewiesen werden. + = positiv; - = negativ; Astrozytenvorläuferzellen wurden nach der Studie von Chan-Ling et al. nur vom embryonalen Tag 16 bis 20 nachgewiesen

BRUNNE et al. (2010) untersuchten die Astrozytenentwicklung und Reifungsmarkerexpression im Gyrus dentatus von Mäusen und kamen hinsichtlich der Reifungsmarkerexpression von Vimentin, GFAP und Nestin zu ähnlichen Ergebnisse wie CHAN-LING et al. (2009) und BRAMATI et al. (2010).

2.1.2 Pathophysiologische Bedeutung von Astrozyten

Veränderungen in der Funktion von Astrozyten tragen zur Entwicklung vieler, wenn nicht aller neurologischen Erkrankungen bei (GIAUME et al., 2010; VERKHRATSKY et al., 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Ein Verlust der normalen Astrozytenfunktion kann zu überschießenden Entzündungsreaktionen durch Zytokinproduktion, Produktion von

neurotoxischen reaktiven Sauerstoffspezies, Abgabe von exzitotoxisch wirkendem Glutamat, Beeinträchtigung der Bluthirnschranke, Verursachung eines zytotoxischen Ödems durch Aquaporin 4-Überaktivität oder auch zur Mitverursachung von chronischen, insbesondere neuropathischen Schmerzen führen (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010).

Unter **reaktiver Astrogliose** versteht man ein weites Spektrum von astrozytären Veränderungen, die infolge von ZNS-Störungen und -Infektionen auftreten (MANSOUR et al., 2008; PUSCHMANN et al., 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Die Veränderungen differieren je nach Schweregrad des Insults und reichen von progressiven Modifikationen in molekularer Expression, über fortschreitende zelluläre Hyperplasie bis hin zu Astrozytenproliferation und Narbenbildung (MANSOUR et al., 2008; PUSCHMANN et al., 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Potentiell können Astrozyten dadurch sowohl Funktionen dazugewinnen als auch verlieren, was sich entsprechend positiv oder nachteilig auf umliegende neuronale und nicht-neuronale Zellen auswirken kann (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Astrozyten können Zielzellen für **ZNS-Infektionserreger** sein oder lediglich auf ihre Anwesenheit reagieren (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Glianarben bilden eine effektive Barriere, um die Ausbreitung von invasiven Mikroorganismen wie *Toxoplasma gondii* oder von Mikroabszessen zu verhindern (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Astrozyten kommt auch im Bereich der Glia limitans eine wichtige Rolle bei der Abgrenzung einer bakteriell oder mykotisch bedingten Leptomeningitis zu, wodurch die Entstehung einer Enzephalitis verhindert wird (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Eine ausgeprägte reaktive Astrogliose findet sich auch bei viralen Enzephalitiden, so auch bei der Bornaschen Krankheit (HERDEN, 2009). Bei Humanen Herpes Virus 6- und T-Lymphotropic Virus Typ-1-Infektionen sind Astrozyten die Zielzellen (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Auch bei der Infektion mit neurotrophen HIV-Stämmen kommt es zur Astrozytendysfunktion mit Verlust ihrer neurosupportiven und neuroprotektiven Funktionen (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Astrozyten tragen außerdem zur Pathogenese der Herpes simplex und Cytomegalievirus-Infektion, der Infektion mit dem West Nil Virus und dem Tollwutvirus sowie der Theiler-Virus-Enzephalomyelitis bei (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; SUN et al., 2015).

Bei **akuten ischämischen Zuständen**, wie beim Schlaganfall, können Astrozyten sowohl schützende als auch schädigende Einflüsse ausüben (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2011). Dies scheint auch für **Multiple Sklerose und andere autoimmune ZNS Erkrankungen** (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; STIPURSKY et al., 2012b), für die **Alzheimersche Krankheit** (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2011; LANGE et al., 2012; PARPURA et al., 2012) und für **Parkinson** (VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2011; LANGE et al., 2012) zu gelten.

Die selten auftretende frühkindliche **Alexander Krankheit** ist erwiesenermaßen eine primäre Astropathie. Durch eine Mutation des Gens für GFAP kommt es zu Astrozytendefekten (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010). Auch die neuropsychiatrischen Ausfallerscheinungen bei **Hepatischer Enzephalopathie (HE)** entstehen primär durch Störungen der Astrozytenfunktion (SEIFERT et al., 2006; SOFRONIEW

UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2011; LANGE et al., 2012).

Im Gehirngewebe von Patienten mit **Epilepsie** finden sich deutliche strukturelle und funktionelle Astrozytenveränderungen (SEIFERT et al., 2006; JABS et al., 2008; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; LANGE et al., 2012), was die Krampfenstehung begünstigt (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Eine ausgeprägte astrozytäre Degeneration und Atrophie (VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010) und ein Verlust der Glutamataufnahmefunktion scheinen zur Pathogenese der **Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)** beizutragen (SEIFERT et al., 2006; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; LANGE et al., 2012). Die **familiäre halbseitige Migräne vom Typ 2** steht mit Mutationen in der alpha2-Untereinheit der Na⁺-K⁺-ATPase in Verbindung, die hauptsächlich von Astrozyten exprimiert wird (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Astrozyten tragen außerdem zur Pathogenese verschiedener **psychiatrischer Erkrankungen** bei. So zeigen Patienten mit **Depressionen** eine verminderte Astrozytendichte (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010). Kürzlich wurde eine gestörte Glutathomöostase als der hinführende Pathomechanismus bei **Schizophrenie** identifiziert und in Verbindung mit einer möglicherweise gestörten Astrozytenfunktion gebracht (VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010). Unlängst wurde auch bei **neurodegenerativen Erkrankungen** die Möglichkeit einer Astrozytenbeteiligung diskutiert (VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010). Die Erkrankungen sind häufig mit einer Atrophie von Astrozyten assoziiert, was zur Beeinträchtigung der synaptischen Funktionen und somit zu frühen kognitiven Defiziten führen könnte (VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010). Auch bei **verschiedenen Demenzformen** scheinen Dysfunktionen oder Degenerationen von Astrozyten eine Rolle zu spielen (VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010).

2.1.3 Primäre Astrozytenkulturen

Die große Anzahl unterschiedlicher Zelltypen im ZNS erschwert es bei Untersuchungen zwischen primären Effekten einer einzelnen Zellpopulation oder sogar einer Einzelzelle und Wechselwirkungseffekten mit anderen Zelltypen zu unterscheiden. Aus diesem Grund stellen primäre Astrozytenkulturen wichtige Untersuchungswerkzeuge dar (KIMELBERG, 1983; PUSCHMANN et al., 2010; LANGE et al., 2012). Aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Funktionen werden Astrozyten *in vitro* für viele unterschiedliche Vorhaben benutzt. Beispielsweise dienen sie als Modell zur Untersuchung biologischer Wachstums- und Differenzierungssignale (NOBLE UND MURRAY, 1984; LANGAN UND SLATER, 1991; AHLEMEYER et al., 2013) oder der Untersuchung von extrazellulären Matrixproteinen, die von Astrozyten gebildet und freigesetzt werden (BIRAN et al., 1999). Kultivierte Astrozyten werden außerdem zur Erforschung ihrer physiologischen Funktionen, z.B. für die neuronale Differenzierung (SCHMALENBACH UND MÜLLER, 1993; JORDAN et al., 2008; COSTANTINI et al., 2010; KREMSKY et al., 2012) oder bei der Seneszenz (PERTUSA et al., 2007; COSTANTINI et al., 2010) verwendet. Auch zur Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung von Astrozyten, beispielsweise bei persistierenden Virusinfektionen eignen sie sich (NAVARRA et

al., 2004). Primäre Astrozytenkulturen wurden bereits erfolgreich zur Untersuchung der Pathogenese der Bornaschen Krankheit eingesetzt (RICHT UND STITZ, 1992; BILLAUD et al., 2000; KÖSTER-PATZLAFF et al., 2007; PENG et al., 2007; OVANESOV et al., 2008). Astrozytenkulturen dienen ferner zur Erforschung der Pathogenese der Alzheimerschen- (TERWEL et al., 2011) und der Parkinsonscher-Krankheit (LANGAN et al., 1995) oder auch zur Untersuchung von Epilepsie, Amyotropher Lateralsklerose, Schlaganfall und Multipler Sklerose (SEIFERT et al., 2006; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; SIDORYK-WEGRZYNOWICZ et al., 2011; LANGE et al., 2012, 2012). In der Regel ist für diese Studien eine Langzeitkultivierung von Astrozyten erforderlich (AHLEMEYER et al., 2013). Langzeitkultivierte Astrozyten von Ratten unterschiedlichen Alters (KREMSKY et al., 2012) oder unterschiedlichen Gehirnregionen wie Cortex cerebri, Hippocampus, Cerebellum, Striatum, Nervus opticus und Rückenmark sind bereits etabliert (MCCARTHY UND VELLIS, 1980; LINDSAY et al., 1982; SCHWARTZ UND WILSON, 1992; REUSS et al., 1998; SILVA et al., 1999; WEINSTEIN, 2001; YANG UND HERNANDEZ, 2003; BRUNNE et al., 2010).

2.2 BORNASCHE KRANKHEIT

Die Bornasche Krankheit (*Borna disease*, BD) ist eine seit über 200 Jahren bei Pferd und Schaf bekannte Infektion des zentralen Nervensystems. Die zunächst als „Hitze Kopfkrankeheit“ oder „Seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung“ bekannte Erkrankung wurde schließlich nach der gleichnamigen Kreisstadt Borna in Sachsen benannt, in der zwischen 1894 und 1896 eine schwere Epidemie wütete (AUTHENRIETH, 1823; ZWICK, 1939).

Der Nachweis intranukleärer Einschlusskörperchen führte bereits 1909 zur Annahme einer viralen Ätiologie (JOST und DEGEN, 1909). Diese These wurde durch die experimentelle Infektion eines Kaninchens und eines Pferdes durch das bakterienfreie Gehirnhomogenat eines erkrankten Pferdes bestätigt (ZWICK und SEIFRIED, 1925; ZWICK et al., 1927). Als ätiologisches Agens konnte jedoch erst 1990 das neurotrope Borna disease virus (BDV) sequenziert werden (LIPKIN et al., 1990). Das behüllte, nicht-segmentierte, einzelsträngige RNA-Virus mit negativer Polarität des Genoms (*non-segmented, negativ single-stranded RNA*, NNS RNA) wurde aufgrund einiger biologischer und genetischer Besonderheiten als erster Vertreter der neuen Familie *Bornaviridae* innerhalb der Ordnung der *Mononegavirales* klassifiziert (LIPKIN et al., 1990; VANDEWOUDE et al., 1990; RICHT et al., 1992; CUBITT et al., 1994a; DE LA TORRE, 1994; SCHNEIDER et al., 1994a; SCHNEEMANN et al., 1995). Vor einigen Jahren wurde ein weiterer Vertreter der Familie *Bornaviridae*, das aviäre Bornavirus (ABV), als Auslöser der Neuropathischen Drüsenmagendilatation (*proventricular dilatation disease*, PDD) bei Psittaciden und anderen Vogelarten identifiziert (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008, PAYNE et al., 2012). Mittlerweile sind 14 unterschiedliche ABV Genotypen bekannt (PAYNE et al., 2012; KUHN et al., 2015). Kürzlich wurden weitere Bornavirusarten bei Reptilien gefunden (GILBERT et al., 2014; STENGLEIN et al., 2014). KUHN et al. schlugen deshalb 2015 eine neue Klassifikation der *Bornaviridae* mit Neueinteilung der

Virusgattungen und Umbenennung der Virusarten vor, die allerdings noch nicht von der ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) anerkannt wurde. Die neu entdeckten Viren weisen oft nur eine Homologie von um die 60% im Vergleich zu den klassischen Säugetier Bornaviren auf (KUHN et al., 2015). Aktuell konnte als neues Virus das „Variegated Squirrel 1 Bornavirus“ bei Bunthörnchen nachgewiesen werden, welches zwischen 2011 und 2013 zu tödlich verlaufenden Enzephalitiden bei drei Bunthörnchenzüchtern geführt hat (HOFFMANN et al., 2015).

Das BDV führt bei natürlich und experimentell infizierten Tieren zu einer persistierenden, nicht-zytolytischen Infektion sowie einer nicht-eitrigen Poliomeningoenzephalitis, verursacht durch virusinduzierte T-zellvermittelte Pathogenitätsmechanismen (ROTT UND BECHT, 1995; DÜRRWALD UND LUDWIG, 1997; STAEHELI et al., 2000; HERDEN et al.; in KНИЕPE and HOWLEY, 2013).

Die durch das ABV verursachte PDD ist eine progressive und tödlich verlaufende Erkrankung domestizierter und wild lebender Psittaciden (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008). Eine nicht-eitrige Entzündung des enterischen, autonomen und zentralen Nervensystems verursacht neben den für die Erkrankung typischen gastrointestinalen Störungen und Abmagerung variable neurologische Symptome (WEISSENBÖCK et al., 2009; DELNATTE et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; PAYNE et al., 2011).

2.2.1 Wirtsspektrum, Reservoir und geographische Ausbreitung

Die natürliche BDV-Infektion und Erkrankung kommt vor allem bei Pferden und Schafen vor. Die Erkrankung wurde jedoch sporadisch auch bei anderen Equiden, Rindern und Ziegen, Kaninchen, bei einem Luchs sowie bei verschiedenen Zootieren (Alpakas, Faultieren, verschiedene Affenarten und einem Nilpferd) beschrieben (ZWICK, 1939; METZLER et al., 1978; BODE et al., 1994b; CAPLAZI et al., 1994; ROTT UND BECHT, 1995; DÜRRWALD UND LUDWIG, 1997; DEGIORGIS et al., 2000; STAEHELI et al., 2000; JACOBSEN et al., 2010). Erkrankungsfälle bei Haustieren wie Hunden und Katzen sind sehr selten (WEISSENBÖCK et al., 1998).

ABV wurde weltweit bei 34 verschiedenen in Gefangenschaft lebenden Papageienarten nachgewiesen. Das Virus fand sich außerdem bei Nicht-Psittaciden wie Kanarienvögeln, einem Riesentukan sowie bei wildlebenden Wasservögeln wie Canadagänsen und einem Trompetenschwan (WEISSENBÖCK et al., 2009; DELNATTE et al., 2011; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; PAYNE et al., 2011; 2012).

Die BD der Säugetiere ist in einigen Gebieten Zentraleuropas endemisch (Hessen, Baden-Württemberg, Bayern, Niedersachsen, Thüringen, Sachsen). Weitere Endemiegebiete liegen in der Schweiz, Österreich und Liechtenstein (ZWICK, 1939; WEISSENBÖCK et al., 1998; KOLODZIEJEK et al., 2005; DÜRRWALD et al., 2006). Das Vorkommen von natürlichen Erkrankungsfällen außerhalb der klassischen endemischen Gebiete wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Über Erkrankungsfälle und/oder den Nachweis virusspezifischer Antikörper bzw. viraler RNA wurde in Frankreich, Türkei, Australien, USA, China und in

anderen Ländern berichtet (ROTT UND BECHT, 1995; GALABRU et al., 2000; HAGIWARA et al., 2001; YILMAZ et al., 2002; HERDEN et al.; in KNIEPE and HOWLEY, 2013). DÜRRWALD et al. (2006) lassen jedoch Zweifel am korrekten Nachweis von viralen Sequenzen außerhalb von Endemiegebieten aufkommen und diskutieren bei einigen Studien die Möglichkeit von Laborkontaminationen. Das weltweite Vorkommen von ABV gilt dagegen als nahezu gesichert. Die Erkrankung wurde 2008 erstmals in den USA und Israel beschrieben. Seitdem wurden über ABV-Infektionen in verschiedenen europäischen Ländern, wie Deutschland, Österreich, Schweiz, Spanien, Italien, England, Ungarn und Dänemark berichtet. Weitere Berichte stammen aus Canada, Australien und Japan (HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; LIERZ et al., 2009; WEISSENBOCK et al., 2009; HEFFELS-REDMANN et al., 2011; OGAWA et al., 2011).

In einer phylogenetischen Studie von KOLODZIEJEK et al. (2005) wird die hohe Homologie der Nukleotidsequenzen von 40 Feld-, Vakzine- und Laborstämmen des BDV (mit Ausnahme von Stamm No/98 aus Österreich) bestätigt. Die existierenden Sequenzunterschiede können bestimmten geographischen Regionen zugeordnet werden, in denen das BDV endemisch vorkommt. Alle BDV-Isolate einer bestimmten Region zeigen untereinander eine deutlich höhere genetische Homologie als mit BDV-Sequenzen aus anderen Regionen, unabhängig vom Jahr ihrer Isolierung (1985-1998) und der Wirtsspezies, aus der sie gewonnen wurden (Pferd, Schaf und Esel). So lässt sich BDV in fünf genetische Gruppen unterteilen: Stamm V (ursprünglich aus endemischem Gebiet in Niedersachsen), He/80-Gruppe (ursprünglich aus Baden Württemberg), RW-98 Gruppe (v.a. in endemischen Gebieten Bayerns vorkommend), Stamm Dessau Gruppe (v.a. in Sachsen-Anhalt) und der österreichische Stamm No/98 (KOLODZIEJEK et al., 2005). Die außergewöhnlich starke Sequenzkonservierung ist für NNS RNA Viren ungewöhnlich, der Grund für diese außergewöhnliche Stabilität ist unbekannt (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b).

Das geographisch limitierte Auftreten bestimmter Feldvirusstämme weist auf das Vorhandensein eines oder mehrere natürlicher, örtlich gebundener Erregerreservoirs oder Vektoren hin, die nur in bestimmten Regionen vorkommen (DÜRRWALD UND LUDWIG, 1997; VAHLENKAMP et al., 2002; KOLODZIEJEK et al., 2005; DÜRRWALD et al., 2006). BDV-Antigen und virale RNA wurde bei wildlebenden Feldspitzmäusen [*Crocidura leucodon*, *bicolor* *white-toothed shrews*] in endemischen Gebieten in der Schweiz und in der eigenen Arbeitsgruppe in Bayern nachgewiesen. Die Tiere zeigten eine disseminierte BDV-Verteilung ohne offenkundige klinische Symptome und stellen somit ein BDV-Reservoir dar (HILBE et al., 2006; PUORGER et al., 2010; BOURG et al., 2013).

Die Ansteckung findet vermutlich im Herbst/Winter statt, wenn die Feldspitzmäuse sich witterungsbedingt vermehrt in Pferde- oder Schafställen aufhalten (persönliche Mitteilung CHRISTIANE HERDEN). Die natürlichen Wirte nehmen das Virus vermutlich über direkten Kontakt mit den Exkreten infizierter Spitzmäuse oder über kontaminiertes Futter oder Trinkwasser auf (Richt et al., 1997b). Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich 2-6 Monaten kommt es zur Erkrankung von Pferden (ROTT UND BECHT, 1995; RICHT et al., 2000; JACOBSEN et al., 2010; PRIESTNALL et al., 2011). Dies erklärt die saisonale Häufung der

Erkrankungsfälle in April, Mai und Juni (RICHT et al., 2000; persönliche Mitteilung CHRISTIANE HERDEN). Das Vorkommen anderer Reservoir-Spezies ist bisher nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen (persönliche Mitteilung CHRISTIANE HERDEN).

Bis vor kurzem nahm man an, dass, mit Ausnahme endogener Retroviren, keine viralen Genabschnitte im Genom von Tieren existieren. Überraschenderweise konnten kürzlich endogene Elemente, die homolog zu BDV-Genen sind, im Genom von Fledermäusen, Elefanten, Fischen, Lemuren, Nagern, Eichhörnchen, Primaten und Menschen entdeckt werden. Phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass Bornaviren Primaten bereits vor 40 Millionen Jahren infiziert haben (BELYI et al., 2010; HORIE et al., 2010). Der ätiologische Zusammenhang von BDV und psychiatrischen Erkrankungen beim Menschen (z.B. bei schweren Depressionen, bipolare Störungen, Schizophrenie und Autismus sowie Chronic Fatigue Syndrom, AIDS-Encephalopathie, Multiple Sklerose, *Motor Neuron Disease* und Glioblastoma multiforme) wird jedoch kontrovers diskutiert. Untersuchungen haben ergeben, dass bei psychiatrisch erkrankten Patienten signifikant häufiger BDV-spezifische Serumantikörper beobachtet werden konnten, die jedoch nur zum Teil eine hohe Avidität zu BDV-spezifischem Antigen aufweisen (ROTT et al., 1985; RICHT et al., 1993; WALTRIP et al., 1995; SAUDER et al., 1996; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; CHEN et al., 1999; BODE et al., 2001; BILLICH et al., 2002; STAEHELI, 2002; SCHWEMMLE UND BILLICH, 2004; HORNIG et al., 2012; HERDEN et al., in KNIEPE and HOWLEY, 2013). Auch die Wertigkeit des Nachweises von viralem Antigen und virusspezifischer RNA in peripheren Blutmonozyten und im Gehirn psychisch kranker Patienten wird kontrovers diskutiert (WOLFF et al., 2006; HERDEN et al., in KNIEPE and HOWLEY, 2013). Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es sich bei den Isolaten mit hoher Wahrscheinlichkeit um Laborstämme des BDV und somit vermutlich um versehentliche Laborkontaminationen handelt. Die klassischen Bornavirusstämme scheinen nicht humanpathogen zu sein (SCHWEMMLE et al., 1999; STAEHELI et al., 2000; STAEHELI, 2002; PLANZ et al., 2003; HOFER et al., 2006; DÜRRWALD et al., 2007). Kürzlich wurde ein neuartiges Bornavirus bei Bunthörnchen und ihren an Enzephalitis verstorbenen Züchtern nachgewiesen, welches sich deutlich von den bisher bekannten Bornaviren unterscheidet (HOFFMANN et al., 2015).

Experimentell lässt sich BDV auf ein bemerkenswert weites und phylogenetisch unterschiedliches Wirtsspektrum übertragen, welches von Vögeln über Nager bis hin zu nicht-humanen Primaten reicht (RUBIN et al., 1993; ROTT UND BECHT, 1995; RICHT et al., 1997b; STAEHELI et al., 2000; DE LA TORRE, 2002a). BDV führt nach einer variablen Inkubationszeit zu unterschiedlichen Infektionsverläufen, die von der Wirtsspezies, dem Immunstatus und dem Alter des Wirtes, der Infektionsroute und dem jeweiligen Virusstamm abhängen (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a). Hochempfindlich für eine experimentelle BDV-Infektion mit typischen neurologischen Symptomen sind Kaninchen, Meerschweinchen und Lewis-Ratten (ROTT UND BECHT, 1995). Eine asymptomatische Infektion mit Viruspersistenz zeigt sich dagegen bei bestimmten Mausstämmen, Hamstern, Frettchen und *black hooded* Ratten (HERZOG et al., 1991; ROTT UND BECHT, 1995; HALLENSLEBEN et al., 1998).

2.2.2 Klinik bei natürlich infizierten Tieren

Die Inzidenz der BD ist heutzutage mit weniger als 100 erkrankten Pferden und Schafen im Jahr deutlich geringer als zur Zeit der Seuchenzüge gegen Ende des 19. Jahrhunderts (MÜLLER-DOBLIES et al., 2004; DÜRRWALD et al., 2006). In gemischten Haltungsformen mit Pferden, Schafen und Rindern sowie in Ställen mit geringeren Hygienestandards kommt es häufiger zu BD-Erkrankungen (DÜRRWALD et al., 2006). Das Vorkommen BDV-spezifischer Antikörpern bei klinisch gesunden Pferden in Deutschland liegt bei durchschnittlich 11,5%. In endemischen Gebieten liegt die Seroprävalenz bei 22,5% und erreicht bis zu 50% in Ställen, in denen bereits BD Erkrankungen aufgetreten sind. Klinisch inapparente Infektionen kommen somit sowohl bei Pferden als auch Schafen häufiger vor (RICHT et al., 2000; MÜLLER-DOBLIES et al., 2004; DÜRRWALD et al., 2006). Der Grund für die Diskrepanz zwischen der hohen BDV-Seroprävalenz und der geringen BD-Inzidenz von etwa 0,02% bis 0,04% ist bisher nicht bekannt (RICHT et al., 2000). Möglicherweise spielen Alter der Tiere, Immunstatus, genetischer Hintergrund sowie der Virusstamm und/oder die Infektionsdosis und das Vorkommen der Reservoirwirte eine Rolle (CARBONE et al., 1987; RICHT et al., 2000; HERDEN, 2009).

Kommt es zum Ausbruch der Erkrankung, so sterben die Tiere in 90% der Fälle innerhalb von 1 – 4 Wochen nach Auftreten erster neurologischer Symptome (RICHT et al., 2000). Genesung oder rezidivierende Krankheitsverläufe sind dagegen seltener anzutreffen. Einige Tiere entwickeln jedoch einen chronischen Krankheitsverlauf mit viraler Persistenz (DÜRRWALD UND LUDWIG, 1997).

Neurologische Symptome bei erkrankten Pferden variieren abhängig von der betroffenen Gehirnregion und dem Verlauf der Erkrankung. Typischerweise treten, verursacht durch die nicht-eitrige Meningoenzephalitis, gleichzeitige oder aufeinanderfolgende Veränderungen der Psyche, des Sensoriums, der Sensibilität, der Motorik und des autonomen Nervensystems auf (ZWICK, 1939; DÜRRWALD UND LUDWIG, 1997). Daneben wurde über atypische Symptome berichtet, die möglicherweise mit BD in Zusammenhang stehen könnten. Dazu zählen Verhaltensstörungen, Gangstörungen, chronische Lahmheit, rezidivierende Kolik und Abmagerung bis hin zur Kachexie (BODE et al., 1994a; BERG, 1999; DÜRRWALD et al., 2006). Schafe haben ähnliche klinische Symptome wie Pferde und zeigen Verhaltens- und Bewegungsstörungen (CAPLAZI et al., 1994). Die Mortalitätsrate beträgt bei BDV erkrankten Schafen 50% (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b).

2.2.3 Klinik bei experimentell infizierten Lewis-Ratten

Der Krankheitsverlauf experimentell infizierter Ratten ist abhängig von der verwendeten Viruspassage und dem Rattenstamm (NARAYAN et al., 1983a; HERZOG et al., 1984; HERDEN et al., in KNIEPE and HOWLEY, 2013). Die BDV-Empfänglichkeit von Ratten ist genetisch beeinflusst. Wistar Ratten und *black-hooded* Ratten sind wesentlich weniger empfänglich als Lewis-Ratten (HIRANO et al., 1983; CIZZA UND STERNBERG, 1994). Aufgrund ihrer Empfänglichkeit stellen Lewis-Ratten das klassische Tiermodell zum Studium der

Pathogenese und der Immunpathogenese der BDV-Infektion dar (NARAYAN et al., 1983a; HERZOG et al., 1984; HERDEN et al., in KNIEPE and HOWLEY, 2013).

Adult infizierte Lewis-Ratten entwickeln ca. 10-20 Tage nach intrazerebraler Infektion typischerweise eine persistente Infektion mit nicht-eitriger Meningoenzephalitis und biphasischem Verlauf der klinischen und neurologischen Symptomen (NARAYAN et al., 1983a; HERZOG et al., 1984; CARBONE et al., 1987; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; HERDEN et al., 2000; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; SOLBRIG, 2010). Der Beginn der klinischen Symptome korreliert dabei mit dem Auftreten entzündlicher Veränderungen im ZNS (NARAYAN et al., 1983a; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN, 2009; HERDEN et al., in KNIEPE and HOWLEY, 2013).

Initial zeigen die Tiere Hyperaktivität, Aggressivität und übersteigerte Schreckhaftigkeit, teilweise treten auch Paralysen auf (NARAYAN et al., 1983a). Nach dieser akuten Phase beginnt ab dem ca. 60. Tag p.i. (*post infectionem*, nach Infektion) das chronische Stadium der Erkrankung, das durch Somnolenz, Apathie, Paralyse, Ataxie, stereotypem Verhalten und Automutilisation gekennzeichnet ist. Bis ca. dem 100. Tag p.i. zeigen die Tiere zunehmende Erblindung (NARAYAN et al., 1983a; HERDEN et al., 2000; SOLBRIG, 2010). Abhängig von der verwendeten Viruspräparation können bis zu 100% der Ratten eine Obesitas mit einem im Vergleich zu gesunden Tieren bis zu dreifach erhöhten Körpergewicht entwickeln. Eine Obesitas kann auch ohne vorherige neurologische Symptome auftreten (HERDEN et al., 2000).

Im Gegensatz zu adulten Ratten zeigen neonatal infizierte Ratten (*PTI-NB: „persistent, tolerant infection of the new-born“*) eine persistente BDV-Infektion ohne typische klinische Symptome und entzündliche Veränderungen im Gehirn aber mit einer disseminierten Virusausbreitung in allen Organen. Diese lebenslange BDV-Persistenz mit hohen Virustitern im Gehirn resultiert in hippocampalen und cerebellaren Dysgenesen (CARBONE et al., 1987; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; MORALES et al., 1988; SOLBRIG, 2010). Sie sind kleiner als ihre nicht infizierten Wurfgeschwister und zeigen geringgradige Verhaltensstörungen, die sich als kognitive, emotionale und soziale Defizite äußern. Die Veränderungen im Kleinhirn äußern sich als milde motorische Koordinationsstörungen und Defizite in den Haltungs- und Stellreaktionen (DITTRICH et al., 1989; CARBONE et al., 1991a; BAUTISTA et al., 1994; HORNIG et al., 1999; PLETNIKOV et al., 1999; PLETNIKOV et al., 2002; LANCASTER et al., 2007).

Die meisten adulten Mausstämme entwickeln trotz Inokulation hoher Virustiter keine Enzephalitis. Interessanterweise kann die Erkrankung bei einigen Mausstämmen durch Infektion neonataler Mäuse hervorgerufen werden (HALLENSLEBEN et al., 1998). Die Ursache für den unterschiedlichen Verlauf der BDV-Infektion in adulten versus neugeborenen Mäusen und versus Ratten war lange unklar (HAUSMANN et al., 2005). Ein Zusammenhang mit Speziesunterschieden und deren antiviraler Effektivität von IFN- γ gegenüber BDV wird vermutet (SOLBRIG, 2010).

2.2.4 Übertragung und Infektionsweg

Die experimentelle BDV-Infektion adulter Ratten wurde bisher durch intracraniale oder intranasale Virusinokulation vorgenommen. Bei allen Infektionswegen scheint das Virus in terminale Nervenenden einzudringen und sich in erster Linie intraaxonal und transsynaptisch auszubreiten (CARBONE et al., 1987; MORALES et al., 1988; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995). CARBONE et al. (1987), MORALES et al. (1988) sowie SAUDER und STAEHELI (2003) zeigten bei Ratten, dass eine intranasale Infektion über olfaktorische Nervenfasern am ehesten der natürlichen BDV-Infektionsroute entspricht.

Nach Ansteckung mit dem BDV erfolgt die initiale Amplifikation dabei zunächst im olfaktorischen System (MORALES et al., 1988). Danach findet die weitere Virusausbreitung in zahlreiche Bereiche des Dienzephalons und Telenzephalons statt (z.B. Hypothalamus, Thalamus, Cortex und Hippocampus). Letztendlich wird ein ähnlich disseminiertes Verteilungsmuster wie nach *intra cranialer* (i.c.) Infektion erreicht (MORALES et al., 1988; SAUDER UND STAEHELI, 2003). Nach der Besiedelung des ZNS gelangt das BDV in das periphere Nervensystem und die Retina (NARAYAN et al., 1983b; CARBONE et al., 1987; MORALES et al., 1988; HERDEN et al., 2000; HERDEN, 2009). Immunkompetente adulte BDV-infizierte Tiere scheiden kein infektiöses Virus aus, bei ihnen bleibt die BD-Infektion streng neurotrop (HERZOG et al., 1984; MORALES et al., 1988; SAUDER UND STAEHELI, 2003).

Bei neonatal infizierten Ratten kann infektiöses Virus und virales Antigen dagegen in den Zellen fast aller Organe gefunden werden, darunter z.B. Speicheldrüse, nasale Mukosa, Darm, Niere und Harnblase. Es wird über Tränen, Saliva und Urin ausgeschieden (HERZOG et al., 1984; MORALES et al., 1988). Neugeborene, experimentell infizierte Ratten sind in der Lage, die Erkrankung auf ihr Muttertier zu übertragen, wobei diese erst nach 3-5 Monaten erkranken (HERZOG et al., 1984; MORALES et al., 1988). Vermutlich scheiden die persistent infizierten Jungtiere in sehr jungem Alter noch keine Viruspartikel aus (SAUDER UND STAEHELI, 2003). Offenbar scheint das BDV in den späteren Infektionsstadien zentrifugal über anterograden axonalen Transport in peripheren Nerven in die Gewebe und Ausscheidungsorgane transportiert zu werden (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b).

2.2.5 Pathogenese

BDV führt bei natürlich und experimentell infizierten Tieren zu einer persistierenden, nicht-zytolytischen Infektion. Die klinische Erkrankung entsteht dabei nicht durch die Virusreplikation selbst, sondern durch virusinduzierte, immunpathologische Mechanismen, die einer Hypersensibilitätsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) entsprechen (STITZ et al., 2002). Histopathologische Veränderungen nach BDV-Infektion sind bei allen Säugetieren nahezu identisch und betreffen hauptsächlich die graue Substanz des Gehirns und des Rückenmarks. Die schwere nicht-eitrige Poliomeningoenzephalitis und Myelitis ist durch perivaskuläre und parenchymale mononukleäre Infiltrate gekennzeichnet, die aus CD4+ und CD8+ T-Zellen und Makrophagen bestehen. Zu späteren Zeitpunkten p.i. sind auch vermehrt Plasmazellen und B-Lymphozyten zu finden. Häufig besteht begleitend eine Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia (RICHT et al., 1997b; HERDEN et al., 2000; ALGERMISSEN, 2010).

Die pathognomonischen intranukleären „Joest-Degen“ Einschlusskörperchen in Neuronen und Astrozyten findet man heute seltener (JOEST und DEGEN, 1911; HERDEN et al. 1999; ALGERMISSSEN, 2010). Hauptsächlich betroffene Gehirnregionen sind Bulbus olfactorius, Cortex cerebri, Nucleus caudatus, Thalamus, Hippocampus und die periventrikulären Bereiche der Medulla oblongata (HERDEN et al., 1999; ROTT UND BECHT, 1995; CAPLAZI UND EHRENSPERGER, 1998). Die entzündlichen Veränderungen im ZNS erreichen zwischen dem 30. und 40. Tag nach Infektion (*day post infection*, dpi) ihr Maximum. In der späten Phase der Erkrankung nehmen bei adulten Lewis-Ratten die entzündlichen Infiltrate trotz disseminierter Virusausbreitung im ZNS ab (NARAYAN et al., 1983a; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN, 2009). Die Retina von betroffenen Pferden ist trotz des positiven viralen Antigennachweises mikroskopisch meist unverändert, was auf das Vorliegen einer zentralen Blindheit hindeutet (HERDEN et al., 1999). Im Gegensatz dazu entwickeln BDV-infizierte Ratten und Kaninchen typischerweise Blindheit, die durch eine nicht-eitrige Chorioretinitis mit Degeneration von Zapfen und Stäbchen verursacht wird (NARAYAN et al., 1983a).

BDV kann mit zellulären Proteinen und Signalkaskaden interagieren und ist zu einer Induktion der antiviralen Interferonantwort fähig (GONZALEZ-DUNIA et al., 2005). Zytokine spielen in der Pathogenese der BD eine wichtige Rolle. Nach BDV-Infektion immunkompetenter Ratten zeigt sich eine Aufregulierung der proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-1 α , IL-6 und Interferon γ (STITZ et al., 1995; HATALSKI et al., 1998b). Die Entzündung im ZNS geht in der späten Phasen der Erkrankungen trotz Viruspersistenz zurück (NARAYAN et al., 1983a; HATALSKI et al., 1998b). Möglicherweise wird dies durch einen Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-Immunantwort verursacht, was den Übergang von der akuten in die chronische Erkrankungsphase bewirken könnte (HATALSKI et al., 1998a, 1998b).

2.3 BORNA DISEASE VIRUS (BDV)

2.3.1 Aufbau des Virus

Beim BDV handelt es sich um ein behülltes, nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Virus negativer Polarität, das entfernt mit Rhabdo-, Paramyxovirus- und Filoviren verwandt ist (BRIESE et al., 1994; CUBITT et al., 1994a; DE LA TORRE, 1994).

Als einziges Virus unter den NNS RNA-Viren der Tiere benutzt das BDV den Zellkern als Ort für seine Transkription und Replikation (BRIESE et al., 1992; DE LA TORRE, 1994; SCHNEEMANN et al., 1995). Als weitere Besonderheit innerhalb der Ordnung der *Mononegavirales* zeigt das BDV überlappende Transkriptionseinheiten und Transkriptionssignale, ein Überlappen der offenen Leseraster, Überlesen von Transkriptions-Stoppsignalen sowie posttranskriptionelles RNA-Spleißen (DE LA TORRE, 2002b). Diese Besonderheiten haben zur Einordnung des BDV in die Familie *Bornaviridae* geführt (PRINGLE, 1996; HONKAVUORI et al., 2008; KISTLER et al., 2008; KUHN et al. 2015).

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von zellfreien Extrakten BDV-infizierter Zellkulturen konnten Viruspartikel dargestellt werden. Das BDV ist ein kugelförmiger, behüllter Partikel mit einem 50-60 nm großen elektronendichten Kern und einem Gesamtdurchmesser von ca. 80-130 nm (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; SCHNEIDER et al., 1997a; KOHNO et al., 1999). Das helikale Nukleokapsid ist etwa 4 nm breit. Die Lipidhülle enthält ca. 7 nm lange spikeähnliche Projektionen, die das BDV-Glykoprotein (BDV-GP) darstellen sollen (Abbildung 2) (ZIMMERMANN et al., 1994; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; SCHNEIDER et al., 1997a; KOHNO et al., 1999; PEREZ et al., 2001). Wie auch andere Vertreter der NNS RNA-Viren mit linearem Genom verfügt das BDV über einen viralen Polymerase-Komplex. Dieser transkriptionsaktiv RNP-Komplex (Ribonukleoprotein-Komplex) besteht aus dem Nukleoprotein (BDV-N), dem Phosphoprotein (BDV-P) und der Polymerase (BDV-L) (PATNAIK et al., 1992; PEREZ et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2004b; MAYER et al., 2005). Das Matrixprotein (BDV-M) ist an der inneren Schicht der Hüllmembran des Virions lokalisiert (KRAUS et al., 2001; KRAUS et al., 2005) und soll sowohl mit dem RNP-Komplex als auch mit dem Glykoprotein interagieren (MARTIN UND HELENIUS, 1991; GAROFF et al., 1998; CHASE et al., 2007). Das BDV ist als behülltes Virus sensitiv für organische Lösungsmittel, UV-Licht (inaktiviert nach 30 Sekunden) und Detergentien (DANNER UND MAYR, 1979; DE LA TORRE, 1994; HERDEN et al., in KNEPE and HOWLEY, 2013).

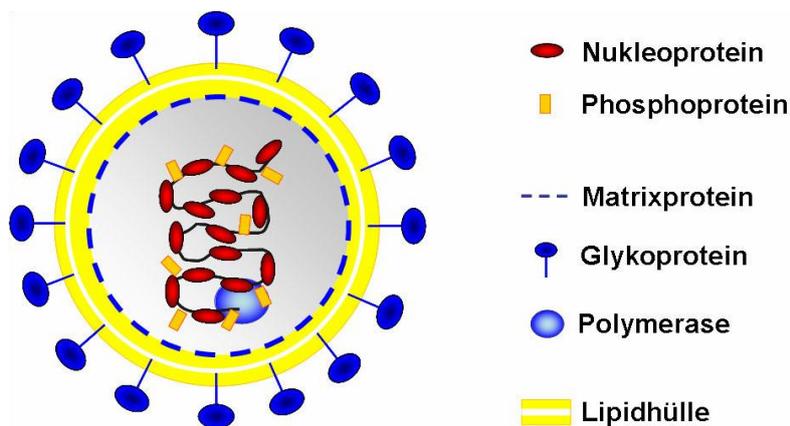


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines BDV-Partikels (nach POROMBKA, 2006)

2.3.2 Genomorganisation und Regulation der Genexpression

Die virale RNA (vRNA) hat eine Größe von etwa 8900 Nukleotiden (BRIESE et al., 1994; CUBITT UND DE LA TORRE, 1994; DE LA TORRE, 1994). Die RNA-abhängige RNA Polymerase (BDV-L) katalysiert die virale Replikation und produziert so komplementäre RNA (cRNA, +ssRNA). Im Rahmen der Transkription katalysiert sie die Entstehung von 3'-polyadenylierten und mit einer 5'-Kappe versehenen primären Transkripten (subgenomische RNAs, mRNAs) unterschiedlicher Größe (DE LA TORRE, 1994).

Die cRNA des Virus besteht aus 3 Transkriptionseinheiten (I-III) mit mindestens sechs offenen Leserastern („*open reading frame*“, ORF) und weist die typische 3'-5'-Orientierung

der *Mononegavirales* auf. (BRIESE et al., 1994; NOWOTNY UND KOLODZIEJEK, 2000; PLESCHKA et al., 2001) (Abbildung 3).

Die überwiegend polycistonischen Transkriptionseinheiten werden durch drei Transkriptionsinitiationssignale (Startsignale S1 – S3) und mindestens vier Polyadenylierungs-/Terminations-Signale (Stoppsignale T1- T4) gebildet, die zum Teil überlappen (BRIESE et al., 1994; SCHNEEMANN et al., 1994) (Abbildung 3). Die Nutzung eines fünften Stoppsignals (t6) konnte bisher nicht bewiesen werden (BRIESE et al., 1994; CUBITT et al., 2001; HERDEN, 2009). Die erste und die zweite Transkriptionseinheit überlappen, so dass das Startsignal S2 stromaufwärts des Stoppsignals T1 liegt (BRIESE et al., 1994; CUBITT et al., 1994a; SCHNEEMANN et al., 1994; POENISCH et al., 2008). Das Überlesen (*readthrough*) von Stoppsignalen ist eine charakteristische Eigenschaft des BDV und führt zur Generierung von primären subgenomischen RNA-Transkripten von 1,2 kB (S1-T1) und 1,9 kB (S1-T2), 0,8 kB (S2-T2) und 3,5 kB (S2-T3), 2,8 kB (S3-T3) sowie 7,2 kB (S3-T4) (siehe Abbildung 3)

Von der **Transkriptionseinheit I** wird als einziges monocistonisches Produkt das 1,2 kB Transkript generiert (BDV-N mRNA). Es enthält den **ORF I** zur Translation des BDV-Nukleoproteins (p40/p38, BDV-N) (BRIESE et al., 1994; SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1994b; KOBAYASHI et al., 1998). Durch gelegentliches Ignorieren des T1 Stoppsignals entsteht das 1,9 kB lange Transkript, welches ORF I, ORF II und ORF X enthält. Dadurch können vermutlich die Mengen an BDV-P und BDV-X feinreguliert werden, welche wiederum die Polymeraseaktivität beeinflussen (POENISCH et al., 2008)

Transkriptionseinheit II ist bicistonisch und generiert das 0,8 kB große Transkript, welches die überlappenden **ORF II** und **ORF X** zur Translation von BDV-Phosphoprotein (p24, BDV-P) und X-Protein (p10, BDV-X) enthält. Das AUG-Startcodon zur Translation von X scheint nicht gespleißt zu werden (BRIESE et al., 1994; SCHNEEMANN et al., 1994; WEHNER et al., 1997). Stattdessen scheint die Expression von X und P durch Überlesen (*leaky ribosomal scanning*) von stromaufwärts gelegenen Startcodons reguliert zu werden (SCHNEIDER et al., 1997b; WEHNER et al., 1997).

Von der **Transkriptionseinheit III** werden je nach Nutzung der Stopcodons (S3 – T3/T4) die primären 2,8 und 7,2 kB großen Transkripte generiert. Das 2,8 kB Transkript enthält die ORFs III und IV; das 7,2 kB große Transkript **ORF III**, **ORF IV** und **ORF V**. ORF III kodiert für das Matrixprotein M (p16, BDV-M), ORF IV für das Glykoprotein GP (gp94, BDV-GP) und ORF V am 3`-Ende der BDV-cRNA für die RNA-abhängige RNA-Polymerase L (p180/190, BDV-L). (DE LA TORRE, 1994; SCHNEEMANN et al., 1995; WEHNER et al., 1997; WALKER et al., 2000; WOLFF et al., 2000; DE LA TORRE, 2002a, 2002b; TOMONAGA et al., 2002). Die primären Transkripte werden durch alternatives Spleißen modifiziert, um die Expression von BDV-M, BDV-GP und BDV-L cotranskriptionell zu regulieren (CUBITT et al., 1994b; DE LA TORRE, 1994; SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1994b; JEHLE et al., 2000; TOMONAGA et al., 2000; DE LA TORRE, 2002b; TOMONAGA et al., 2002; SCHNEIDER, 2005). Insgesamt sind drei verschiedene Introns (I-III) enthalten. Intron I (nt 1932 bis 2025; 93 Nukleotide lang) liegt im ORF III des BDV-M, Intron II (nt 2410 bis 3703, 1293 Nukleotide lang) im ORF IV des

BDV-GP (DE LA TORRE, 1994; TOMONAGA et al., 2002). (Abbildung 3). Die primären 2,8 und 7,2 kB großen Transkripte führen zur Translation von BDV-M (BDV-M mRNA; BDV-Intron I haltige +ssRNA). Die Expression von BDV-GP setzt dagegen in der Regel das Spleißen von Intron I voraus, wodurch subgenomische RNAs mit 2,7 bzw. 7,1 kB Größe entstehen. BDV-GP mRNA ist also strenggenommen nur BDV-Intron II haltige +ssRNA, die gleichzeitig Intron I gespeißt ist. Nur ein sehr kleiner Anteil BDV-GP soll von Intron I haltiger subgenomischer RNA durch Überlesen des AUG-Codons für die BDV-M Synthese (*leaky ribosomal scanning*) hergestellt werden (SCHNEIDER et al., 1997b; JEHLE et al., 2000). Vereinfacht wird in der vorliegenden Arbeit von BDV-GP mRNA gesprochen, ohne über den genauen Spleißzustand informiert zu sein. ORF V für die BDV-L Synthese entsteht durch Spleißen von Intron II in Transkripte, die an T4 enden. Offenbar scheint auch für eine effiziente BDV-L-Synthese das zusätzliche Spleißen von Intron I nötig zu sein (SCHNEIDER, 2005). Die Nutzung des potentiellen Intron III (nt 2410 bis 4559) wird kontrovers diskutiert. Spleißen dieses Introns und Überlesen des Stoppsignals t6 soll zur Expression von zwei zusätzlichen BDV Proteinen führen. Da die *splice acceptor side* des Introns beim BDV-Isolat No/98 nicht konserviert ist, scheinen die potentiellen Genprodukte zumindest keine wichtige Aufgabe zu haben (BRIESE et al., 1994; TOMONAGA et al., 2000; CUBITT et al., 2001; PLESCHKA et al., 2001).

Im Gegensatz zu anderen nicht-segmentierten, einzelsträngiges RNA-Viren negativer Polarität hat das BDV keine spezifischen intergenetischen Regionen, sondern besitzt größtenteils überlappende ORFs (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b). Die Transkription des BDV-Genoms erfolgt vom 3'- zum 5'-Ende und folgt, wie auch bei anderen *Mononegavirales*, einem absteigendem Transkriptionsgradienten. Dadurch werden BDV-N und BDV-P von allen viralen Proteinen am meisten exprimiert, während BDV-GP nur in 1-10% der infizierten Zellen nachweisbar ist (RICHT et al., 1998; DE LA TORRE, 2002b).

An den Genomenden finden sich kurze, nicht-kodierende 3'-*leader* und 5'-*trailer*-Sequenzen. Diese komplementären Sequenzen besitzen sogenannte *inverted terminal repeats* (IRT), die Promotoren für die virale Replikation und Transkription enthalten (CUBITT et al., 1994a; SCHNEIDER et al., 2005).

Die komplementäre antigenomische RNA dient als Vorlage für die *de novo* Synthese von genomischer RNA während des Replikationszyklus (DE LA TORRE, 1994; POROMBKA et al., 2008a). Bei anderen *Mononegavirales* reguliert das Verhältnis oder die Menge jedes Virusproteins den Wechsel von Transkription zur Produktion des komplementären Antigenoms oder des Genoms. Eine regulatorische Funktion wird auch für das molekulare Verhältnis von BDV-N und BDV-P und für BDV-X angenommen (TOMONAGA et al., 2002; POENISCH et al., 2004).

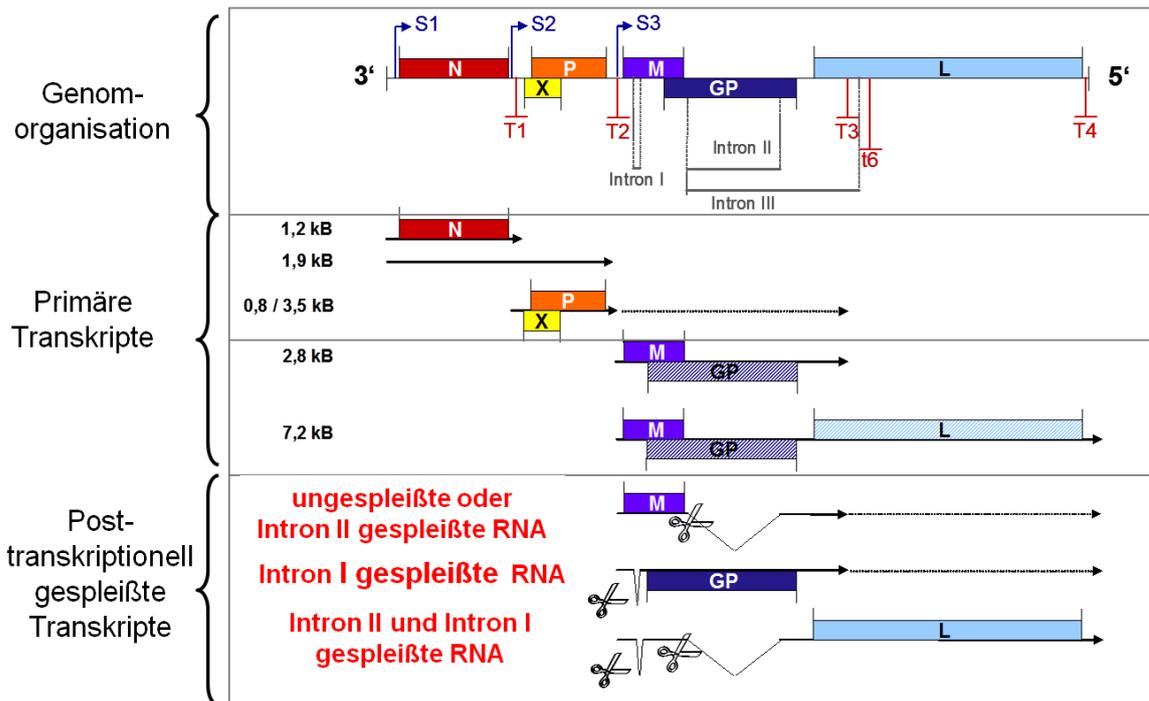


Abbildung 3: Schematische Darstellung des BDV-Genoms und seiner subgenomischen Transkripte (modifiziert aus POROMBKA, 2006, nach DE LA TORRE, 2002b)

ORFs I-V und ORF X= verschiedenfarbige Rechtecke in der BDV cRNA, sie kodieren für: N = Nukleoprotein; X = X-Protein (Nichtstrukturprotein); P = Phosphoprotein; M = Matrixprotein; GP = Glykoprotein; L = L-Protein, RNA-abhängige RNA Polymerase. Position der Startsignale = blaue Pfeile (S1-S3). Position der Stoppsignale = rote Marken (T1-T4, t6). Intron I-III = graue Marken. Nach oben offene Kerben und Scherensymbol = Fehlen der Introns in den subgenomischen RNAs (post-transkriptionell gespleißte Transkripte). Die Größe der primären Transkripte ist links neben den subgenomischen RNAs angegeben.

2.3.3 Proteine des BDV

2.3.3.1 Hüllproteine (BDV-M, BDV-GP)

Das **Matrixprotein (BDV-M)** ist ein Produkt des ORF III des BDV und besteht aus 142 Aminosäuren (BRIESE et al., 1994; CUBITT et al., 1994a; KLICHE et al., 1994; KRAUS et al., 2001). Das 16,200 kDa große Protein formt nicht-kovalent verbundene Tetramere und Octamere und zählt zu den nicht-glykosilierten Matrixproteinen. BDV-M ist an der inneren Schicht der Hüllmembran des Virions lokalisiert (KRAUS et al., 2001; KRAUS et al., 2005). Matrixproteine behüllter RNA-Viren interagieren einerseits mit dem RNP-Komplex, andererseits aber auch mit zellulären Membranen und viralen Hüllproteinen und dienen gewissermaßen als „Klebstoff“ zwischen Membran und Nukleokapsid (MODROW, 2010; LILJEROOS und BUTCHER, 2013), dies wird auch für das BDV-M vermutet (MARTIN UND HELENIUS, 1991; GAROFF et al., 1998; CHASE et al., 2007; NEUMANN et al., 2009). Für das BDV-M wird ebenso wie für die Matrixproteine des humanen Immundefizienz Virus (HIV), und die des Ebola und Lassa Virus eine Beteiligung beim Zusammenbau und der Freisetzung reifer Viruspartikel angenommen (KRAUS et al., 2001; KRAUS et al., 2005; LILJEROOS und BUTCHER, 2013). Eventuell spielt das BDV-M eine Rolle für die Aufrechterhaltung der viralen Form (GAROFF et al., 1998; KRAUS et al., 2005). Im Gegensatz zum Matrixprotein des

Tollwutvirus scheint das BDV-M die virale Transkriptionsaktivität nicht herabzusetzen (MAYER et al., 2005; CHASE et al., 2007). Sowohl *in vitro* als auch bei BDV-infizierten Lewis-Ratten findet sich BDV-M vorwiegend im Zytoplasma der infizierten Zelle, wo es seiner Funktion beim Viruszusammenbau und der Knospung nachkommen kann (KRAUS et al., 2005; CHASE et al., 2007; HERDEN, 2009).

In vitro ist BDV-M im Kern mit BDV-P und X, vermutlich im Nukleolus, kolokalisiert (CHASE et al., 2007). Möglicherweise ist es, ähnlich wie das Matrixprotein von Influenzaviren, am nukleären Export beteiligt (MARTIN UND HELENIUS, 1991; HERDEN, 2009).

Erste BDV-M-positive Zellen finden sich bei infizierten Lewis-Ratten ab Tag 7 p.i.. Die Expression erreicht ihr Maximum zwischen Tag 31 und 50 p.i. und nimmt danach wieder ab (POROMBKA et al., 2008a; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Die Abnahme der BDV-M-Expression korreliert dabei mit einer verstärkten Kernretention der kodierenden mRNA (BDV-Intron I +ssRNA) ab Tag 42 (POROMBKA et al., 2008a; HERDEN, 2009).

Generell findet sich BDV-M im infizierten Rattengehirn in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen und liegt disseminiert in allen Gehirnregionen vor. Das Protein zeigt jedoch eine Präferenz für Ammonshorn (CA3-Region), Cortex cerebri und Thalamus (WERNER-KEIŠŠ et al., 2006). Es erweisen sich allerdings über die Zeit deutliche zellspezifische Unterschiede der BDV-M-Expression. In der akuten Infektionsphase findet sich BDV-M vorwiegend in kleinen und großen Neuronen. In der chronischen Phase nimmt die Expression in Astrozyten deutlich zu, während sie in kleinen Neuronen annähernd gleich bleibt und in großen Neuronen stark abnimmt (HERDEN, 2009). Faktoren, die zu dieser verstärkten Expression in Astrozyten führen, sind derzeit nicht bekannt (HERDEN, 2009).

Das **Glykoprotein (BDV-GP)** ist ein klassisches Typ 1 Protein. Es besteht aus einer Polypeptidkette mit 503 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 57 kDa. Durch posttranslationelle N-Glykolisierung im sekretorischen Weg des endoplasmatischen Retikulums (ER) entsteht ein 94 kDa großes primäres Produkt (gp94) (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; SCHNEIDER et al., 1997a; GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; RICHT et al., 1998; EICKMANN et al., 2005). Das primäre Protein gp94 wird durch die zelluläre Protease Furin nach der Aminosäure Arginin₂₄₉ in eine amino-terminale (GP-N, 27 kDa, gp51) und eine carboxy-terminale Untereinheit (GP-C, 29 kDa, gp43) gespalten (Abbildung 4). Die Spaltung des BDV-GP erfolgt im ER bzw. im cis-Golgi-Apparat (EICKMANN et al., 2005). Nur ein Bruchteil der BDV-GP-Untereinheiten werden an die Zelloberfläche transportiert, wo die Knospung neu synthetisierter Virionen stattfindet, ein Großteil akkumuliert im ER und Golgi-Apparat (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; KOHNO et al., 1999; KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005). Die Spaltung ist essentiell zur funktionellen Aktivierung des Proteins und kann wahrscheinlich auch durch andere Subtilisin-ähnliche Endoproteasen katalysiert werden (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; RICHT et al., 1998; KIERMAYER et al., 2002; RIMA UND DUPREX, 2005).

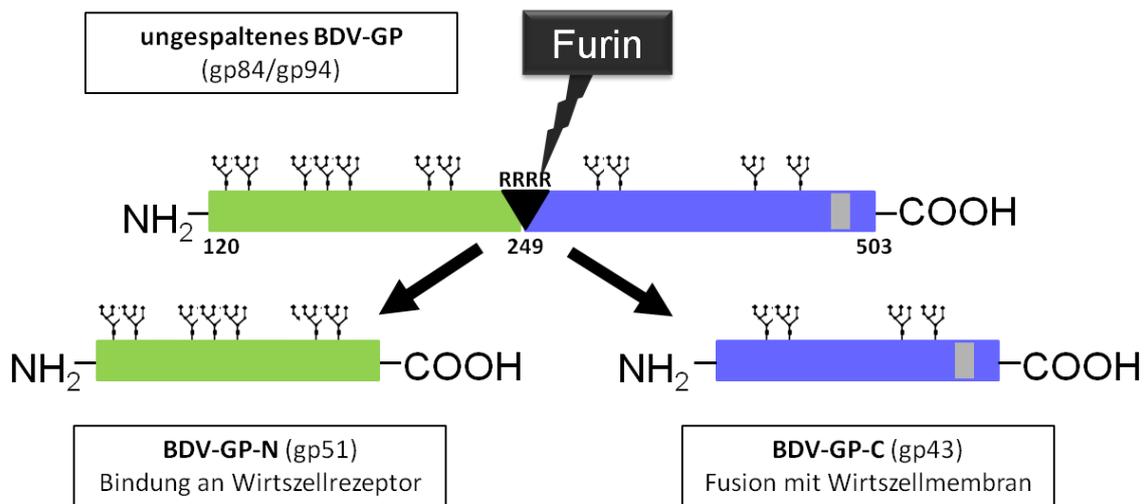


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Furin-medierten BDV-Glykoprotein-Spaltung

Die zelleigene Subtilisin-ähnliche Protease Furin spaltet das BDV-GP in ein N-terminales (BDV-GP-N) und C-terminales (BDV-GP-C) Fragment. GP-N ist für die initiale Rezeptorbindung des Virus verantwortlich, GP-C leitet die pH-abhängige Fusion mit der Wirtszellmembran ein (Endozytose). Schwarzes Dreieck= tetrabasische Furin-spaltstelle RRRR bei Aminosäureposition 249; graue Box = Transmembrandomäne; Ziffern = Aminosäureposition; baumähnliche Symbole = N-Glykane (nach RICHT et al., 1998 und KIERMAYER et al., 2002)

Nach der Spaltung scheint ein Reifungsprozess der N-Glykane stattzufinden. Der gp94 Vorläufer enthält lediglich stark mannosereiche Glykane, während auf beiden Spaltprodukten sowohl hoch mannosereiche als auch komplexe Glykane nachweisbar sind (KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005). Vermutlich ist die Glykolisierung notwendig, um die Proteine zu stabilisieren und eine exakte Faltung der Glykoproteine zu gewährleisten (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a).

BDV-GP-N ist für die initiale Bindung an einen zur Zeit noch nicht näher bekannten zellulären Rezeptor verantwortlich, konnte bisher jedoch nicht ohne weiteres auf der Oberfläche infizierter Zellen und im BDV-infizierten Rattengehirn nachgewiesen werden (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; RICHT et al., 1998; PEREZ et al., 2001; KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005). Erst durch eine Kombination aus Lektinpräzipitation und enzymatischer Deglykosylierung auf dem Western Blot gelang der Nachweis von BDV-GP-N (KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005).

BDV-GP-C ist mit seiner transmembranen Domäne in der Virushülle verankert und leitet die pH-abhängige Fusion mit der Wirtszellmembran bei saurem intrazellulärem Milieu der Endosomen ein, die in den ersten 45 Minuten der BDV-Infektion von statten zu gehen scheint (GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; RICHT et al., 1998; CLEMENTE et al., 2009). Die C-terminale GP-Untereinheit konnte bereits an der Oberfläche infizierter Zellen nachgewiesen werden (SCHNEIDER et al., 1997a; GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; PEREZ et al., 2001).

Der endgültige Aufbau reifer Virionen ist bisher nicht geklärt. Sowohl ungespaltenes BDV-gp94 als auch die Untereinheiten BDV-GP-C und BDV-GP-N wurden in infektiösen Partikeln

gefunden (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007). Im Gegensatz dazu konnten KIERMAYER et al. (2002) und EICKMANN et al. (2005) nur BDV-GP-C und BDV-GP-N in infektiösen Partikeln nachweisen. Neue rechenbasierte Erkenntnisse verweisen auf die strukturelle Ähnlichkeit des BDV-GP mit dem Glykoprotein des Tollwutvirus, einem viralen Fusionsproteinen der Klasse III (GARRY UND GARRY, 2009; HERDEN, 2009). BDV-Glykoproteine agieren als Trimere, was den korrekten Zusammenbau von 3 gespaltenen Glykoprotein-Untereinheiten voraussetzt (BAYER, 2010).

Das Glykoprotein zeigt in adulten, experimentell BDV-infizierten Lewis-Ratten deutliche zeitliche, zellspezifische und regionenspezifische Präferenzen (HERDEN, 1997; RICHT et al., 1998; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). BDV-GP wird im Vergleich zu BDV-N oder BDV-M deutlich weniger stark und sehr restriktiv exprimiert. Nur etwa 1-10 % der persistent infizierten Zellen sind immunhistologisch BDV-GP-positiv (RICHT et al., 1998; DE LA TORRE, 2002a, 2002b). Die Expression beschränkt sich hauptsächlich auf die CA3-Region des Ammonshorns, den Cortex cerebri, den Thalamus und die Amygdala (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Das Protein findet sich überwiegend im Zytoplasma großer Neurone (HERDEN, 1997; RICHT et al., 1998; HERDEN, 2009). Der erste Nachweis im infizierten Rattengehirn gelingt 7 Tage p.i., wobei das Maximum der Proteinexpression zwischen dem 18. und 28. Tag liegt. Ab Tag 31 p.i. nimmt die detektierbare Menge stetig ab (WERNER-KEIŠŠ, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). In Astrozyten konnte *in vivo* bisher kein BDV-GP nachgewiesen werden (WERNER-KEIŠŠ, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009).

Der Nachweis der für BDV-GP-kodierenden Transkripte (BDV-GP mRNA, BDV-Intron II +ssRNA) unterscheidet sich im Rattenmodell dagegen signifikant von der Proteindetektion. BDV-Intron II +ssRNA findet sich in wesentlich mehr Zellen als BDV-GP, d.h. auch in Zellen, die kein Protein exprimieren (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; POROMBKA et al., 2008a; HERDEN, 2009). Die BDV-Intron II +ssRNA liegt überwiegend intranukleär in Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen. Zytoplasmatische Signale treten lediglich bei ca. 30% der Neuronen und vorwiegend zu späteren Zeitpunkten p.i. auf (POROMBKA, 2006; POROMBKA et al., 2008a; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Die Transkripte sind disseminiert im Gehirn verteilt, wobei eine gewisse Präferenz für Ammonshorn, Cortex cerebri und Amygdala erkennbar ist. BDV-Intron II +ssRNA ist erstmals 7 dpi. zu erkennen. Das Maximum der Anzahl positiver Zellen wird am Tag 24 p.i. erreicht. Am Tag 90 p.i. nimmt die Anzahl positiver Zellen und deren Ausbreitung im Gehirn leicht ab (POROMBKA, 2006; POROMBKA et al., 2008a; HERDEN, 2009).

2.3.3.2 Proteine des Ribonukleoproteinkomplexes (BDV-N, BDV-P, BDV-L und BDV-X)

Innerhalb der NNS RNA-Viren mit linearem Genom verfügen alle Vertreter über einen transkriptionell aktiven RNP-Komplex (MURPHY UND LAZZARINI, 1974), der die kleinste infektiöse Einheit des jeweiligen Virus darstellt (GARCÍA-SASTRE UND PALESE, 1993; CUBITT et al., 1994a; CONZELMANN, 1998). Der helikale RNP-Komplex des BDV besteht aus den verschiedenen Nukleokapsidproteinen, Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), der RdRP

(„*RNA dependend RNA-Polymerase*“; L-Protein) sowie der genomischen RNA, wobei das BDV-N die Hauptkomponente des Komplexes ausmacht (MAYER et al., 2005; SCHNEIDER, 2005; CHASE et al., 2007; MODROW, 2010). Eine hohe Proteinbeladung des Genoms schützt es vor der Zerstörung durch Nukleasen und verleiht ihm Flexibilität (MODROW, 2010). Immunhistologisch zeigt sich in den Zellkernen punktförmige oder diffuse Darstellung der RNP-Proteine, nur hier sind alle Komponenten miteinander kolokalisiert. Die nukleären Strukturen stellen vermutlich den Ort der BDV Transkription und Replikation dar (CHASE et al., 2007). Beim BDV stellt sich für die Funktion des RNP-Komplexes eine Besonderheit heraus, denn seine Aktivität wird durch das intrazelluläre Verhältnis von BDV-N zu BDV-P bzw. von BDV-X zu BDV-P feinreguliert (POENISCH et al., 2004; SCHNEIDER, 2005) (siehe 2.3.6).

Das **Nukleoprotein (BDV-N)** ist wie auch bei anderen NNS RNA-Viren essentieller Bestandteil des Nukleokapsids und spielt eine wichtige Rolle bei dem nukleozytoplasmatischen Transport des Ribonukleoproteins (KOBAYASHI et al., 2001; BHELLA et al., 2002). Das Protein kommt in 2 Isoformen vor. p40 (40 kDa) besitzt ein Kern-Lokalisierungs-Signal (*nuclear localization signal*, NLS), dass bei p38 (38 kDa) fehlt (KOBAYASHI et al., 1998). Beide Isoformen binden an BDV-P, das ebenfalls potente NLSs enthält, so dass die Bedeutung der beiden N-Isoformen *in vivo* unbekannt ist. p38 könnte auch durch Interaktion mit P in den Nukleus gelangen (PEREZ et al., 2003). p38 scheint durch Blockierung der Bindungsstelle an P das zelluläre Niveau von freiem p40 zu regulieren (SCHNEIDER, 2005). Beide Isoformen enthalten ein Kern-Export-Signal (*nuclear export signal*, NES), das mit der Bindungsstelle für P überlappt (KOBAYASHI et al., 2001).

BDV-N zeigt eine frühe und konstant hohe disseminierte Verteilung im Gehirn infizierter Lewis-Ratten (NARAYAN et al., 1983a; CARBONE et al., 1991a; RICHT et al., 1994; HERDEN et al., 2000; HERDEN et al., 2005). Das Protein ist sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen zu finden und dort in Kern, Zytoplasma und Fortsätzen lokalisiert (CARBONE et al., 1991a; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN et al., 2000; HERDEN et al., 2005; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). *In vitro* liegt das BDV-N vor allem im Nukleus der infizierten Zelle vor (PYPER UND GARTNER, 1997). Der erste Proteinnachweis gelingt in der Nähe der Virusinokulationsstelle bereits am Tag 3 p.i.. Die Expression erreicht zwischen dem 31. und 42. Tag p.i. ihr Maximum und bleibt auch in der chronischen Phase bis zum 90. Tag p.i. fast unverändert hoch (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009).

Für BDV-N kodierende Transkripte, BDV-N mRNA, finden sich zu frühen Infektionszeitpunkten meist im Kern, wobei hier der Nukleolus als Ort der RNA Synthese vermutet wird (PYPER et al., 1998). Alle Zellen zeigen zu späteren Zeitpunkten p.i. auch deutliche Zytoplasmareaktionen. BDV-N mRNA ist im infizierten Rattengehirn erstmals am Tag 7 p.i. zu detektieren. Der Nachweis erreicht am Tag 24 p.i. sein Maximum. Die Transkriptmenge verringert sich bis zum Tag 90 p.i. deutlich, wobei die Zahl der BDV-N mRNA positiven Zellen sich nur geringfügig ändert und auch BDV-N konstant auf hohem Niveau nachweisbar ist (GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN et al., 2000; POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Offenbar sind die in der chonischen Phase

geringeren Transkriptmengen trotzdem noch ausreichend für die disseminierte, anhaltend hohe Expression von BDV-N. Die Halbwertszeit des Proteins ist nicht bekannt (POROMBKA, 2006). Möglicherweise ist auch das Ammonshorn als Region mit hoher Transkriptionseffizienz an der Aufrechterhaltung ausreichender Mengen BDV-N in der späten Phase der Infektion beteiligt (HERDEN, 2009).

BDV-Phosphoprotein (BDV-P) ist ein Kofaktor der viralen Polymerase und wird durch die zellulären Kinasen Protein Kinase C ϵ (PKC ϵ) und Casein Kinase II phosphoryliert (SCHWEMMLE et al., 1997; SCHWEMMLE et al., 1998; SCHNEIDER et al., 2005). Der Grad der Phosphorylierung scheint die Fähigkeit von BDV-P zur Bildung von Homo-Multimeren, die Bindung an andere Virusproteine und seine Funktion als Transkriptionsaktivator zu beeinflussen. BDV-P interagiert mit sich selber, mit BDV-X, BDV-N, BDV-M und BDV-L, wobei die BDV-P-Oligomerisation für die Polymeraseaktivität essentiell ist (SCHNEIDER et al., 2005; SCHMID et al., 2010). Das 24 kDa große Protein besitzt zwei NLSs, wobei der Phosphorylierungsgrad von BDV-P seinen Transport in den Zellkern beeinflussen könnte (SCHWEMMLE et al., 1998; SHOYA et al., 1998). Die Phosphorylierung von BDV-P ist ein negativer Regulator der Polymeraseaktivität. Dies geschieht möglicherweise über die Beeinflussung des intrazellulären Transports viraler RNPs durch BDV-P (SCHMID et al., 2010). Möglicherweise trägt das Phosphoprotein zur BDV-Pathogenese bei, indem es mit neuronalen Substraten um die Phosphorylierung durch PKC ϵ konkurriert (VOLMER et al., 2006). Die BDV-P-Phosphorylierung scheint außerdem für die virale Dissemination von Bedeutung (SCHMID et al., 2010).

Das **BDV-L (large protein, Polymerase)** ist ein 190 kDa großes Protein und hat die Eigenschaft einer RNA-abhängigen RNA Polymerase (BRIESE et al., 1994; WALKER et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2004b; SCHNEIDER et al., 2004a). Zunächst synthetisiert BDV-L verschiedene subgenomische, mit 5'-Cap Struktur versehene, polyadenylierte Transkripte. Später im viralen Vermehrungszyklus beginnt das gleiche Enzym damit positivsträngige RNA (Antigenom) der vollen Genomlänge zu generieren, die nachfolgend als Vorlage für die Synthese neuer viraler Genome benutzt wird (SCHNEEMANN et al., 1995). BDV-L interagiert mit P und wird durch zelluläre Kinasen phosphoryliert, wodurch die Funktion der Polymerase reguliert werden soll (WALKER et al., 2000). Der Transfer von BDV-L in den Nukleus als Ort der Virusreplikation scheint durch ein NSL-Motiv gesteuert zu werden (WALKER UND LIPKIN, 2002). SCHNEIDER et al. (2003) zufolge findet die Translokation in den Nukleus jedoch durch Interaktion mit BDV-P statt. Als Matrize für die RNA-Neusynthese verwendet BDV-L ausschließlich das aus RNA und Nukleoprotein bestehende Nukleokapsid (PEREZ UND DE LA TORRE, 2005).

BDV-X oder p10 ist ein Nicht-Strukturprotein, das zusammen mit BDV-P die Polymeraseaktivität reguliert, was sich aus dem Mengenverhältnis der beiden Proteine zueinander ergibt (WEHNER et al., 1997; MAYER et al., 2005; SCHWARDT et al., 2005; POENISCH et al., 2008). In Modellen konnte gezeigt werden, dass X die BDV-Replikation und Transkription durch Bindung an BDV-P hemmt (PEREZ et al., 2003; SCHNEIDER, 2005; POENISCH et al., 2008). Das nur 10 kDa große Protein findet sich sowohl im Zytoplasma als

auch im Nukleus der infizierten Zellen. Ob es über Interaktion mit dem viralen RNP via BDV-P in den Zellkern gelangt, oder ein eigenes NSL besitzt, ist noch nicht abschließend geklärt (MALIK et al., 2000; NOWOTNY et al., 2000; WOLFF et al., 2000; WOLFF et al., 2002). BDV-X konnte jedoch bisher nicht als integraler Bestandteil des RNP identifiziert werden (MAYER et al., 2005; PEREZ UND DE LA TORRE, 2005; CHASE et al., 2007).

2.3.4 Infektionszyklus

Der typische Infektionszyklus eines Virus umfasst Adsorption der Viruspartikel an ein Rezeptormolekül an der Zelloberfläche, Penetration, Transkription und Translation von viraler mRNA, Genomreplikation, Zusammenbau und Freisetzung neuer Viruspartikel (FLINT, 2009; MODROW, 2010).

Der erste Schritt des Replikationszyklus ist die Bindung des Viruspartikels an die Wirtszelle. Dieser Prozess definiert z.T. das Wirtsspektrum des Virus und seine Gewebs- und Organspezifität (Tropismus) (SMITH UND HELENIUS, 2004; FLINT, 2009; MACLACHLAN UND FENNER, 2011). Viruspartikel interagieren dabei mit Molekülen auf der Zelloberfläche, die als Attachmentfaktoren, Entryfaktoren, Rezeptoren oder Korezeptoren bezeichnet werden. (MACLACHLAN UND FENNER, 2011). Behüllte Viren binden via Transmembran-Glykoproteinen an diese Moleküle (SMITH UND HELENIUS, 2004; FLINT, 2009). Das Vorhandensein von Rezeptoren bestimmt, ob eine Zelle empfänglich für ein Virus ist. Ob die penetrierte Zelle auch eine Virusreplikation erlaubt, hängt jedoch von anderen, intrazellulären Faktoren ab (FLINT, 2009).

Die **Adsorption** der BDV-Partikel in die Zellen findet vermutlich durch einen oder mehrere bisher noch unbekannte zelluläre Rezeptoren statt (DUCHALA et al., 1989; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007; HERDEN, 2009).

Für Viren wurden bereits unzählige Rezeptoren oder Eintrittsfaktoren beschrieben. Diese reichen von ligandenbindenden Rezeptoren (wie der Chemokinrezeptor) über Signalmoleküle (z.B. CD4), Enzyme, Intergrine, Glycokonjugate bis zu N-Acetylneuraminsäure und Lipiden (SMITH UND HELENIUS, 2004; MACLACHLAN UND FENNER, 2011). Die Identifikation von Rezeptoren oder Eintrittsfaktoren wird teilweise deutlich erschwert, da manche Viren einer Familie unterschiedliche Rezeptoren benutzen. Darüber hinaus benutzen z.T. sogar unterschiedliche Stämme des gleichen Virus verschiedene Rezeptoren (z.B. Virus der Maul- und Klauenseuche). Ein Wechsel in der Rezeptorspezifität kann die Pathogenität von Viren verändern (FLINT, 2009; MACLACHLAN UND FENNER, 2011). Insbesondere für Viren mit einem breiten Wirtsspektrum, wie den Alphaherpesviren, wird vermutet, dass sie verschiedene Rezeptoren benutzen können (MACLACHLAN UND FENNER, 2011). Inwieweit dies auch für das BDV mit seinem breiten Wirtsspektrum zutrifft, ist nicht bekannt. Einige Viren, wie z.B. HIV benutzen nacheinander mehrere unterschiedliche Eintrittsfaktoren, um eine erfolgreiche Infektion zu initiieren (SMITH UND HELENIUS, 2004; MACLACHLAN UND FENNER, 2011). Dies wird auch für das BDV angenommen (DUCHALA et al., 1989; GOSZTONYI UND LUDWIG, 2001; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007, 2009a; HERDEN, 2009; HONDA et al., 2009; CLEMENTE et al., 2010). Der Rezeptor/Eintrittsfaktor

bindet das Virus nicht nur, sondern determiniert auch den weiteren Eintrittsprozess (MACLACHLAN UND FENNER, 2011).

Vermutlich wird der erste Schritt des BDV-Zelleintritts durch Interaktion von BDV-GP-N an den Wirtszellrezeptor mediiert, der einen Komplex mit anderen Molekülen formt (GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; PEREZ et al., 2001; HERDEN, 2009; HONDA et al., 2009). Da das Wirtsspektrum des BDV sehr breit ist, wird spekuliert, ob der Rezeptor ein spezifisches Protein ist oder die Bindung an Lipide oder andere ubiquitär vorkommende Komponenten zellulärer Membranen stattfindet (CLEMENTE et al., 2009; GARRY UND GARRY, 2009). HONDA et al. (2009) gelang der Nachweis einer Interaktion zwischen BDV-GP-N mit dem molekularen Begleiter BiP (*immunoglobulin heavy chain-binding protein; glucose-regulated protein 78*), der als Korezeptor für verschiedenen Viren an der Plasmamembran fungiert. Antikörper gegen BiP inhibierten die BDV-Infektiosität um ca. 70% in einer Oligodendrogliomzelllinie (OL) (HONDA et al., 2009). Da BiP keine transmembrane Region besitzt, benötigt es andere Wirtspoteine mit transmembranen Regionen auf der Zelloberfläche. So ist bekannt, dass BiP mit diversen Proteinen, wie MHC-I Molekülen, spannungsabhängigen Anionenkanälen und dem DnaJ-like Protein MTJ-1 interagiert, die alle mit dem Lipidgerüst der Plasmamembran assoziiert sind (HONDA et al., 2009). Ob einer von diesen Proteinen als Rezeptor für BDV fungiert, ist allerdings nicht bekannt (HONDA et al., 2009). Auch der Kainatrezeptor1 (KA-1) gilt als möglicher BDV-Rezeptorkandidat im ZNS (GOSZTONYI UND LUDWIG, 2001) und könnte ebenfalls mit BiP interagieren (HONDA et al., 2009). Durch einen si-RNA (silencing RNA) induziertes Screening gelang es (CLEMENTE et al., 2010) weitere potentielle Rezeptoren, Korezeptoren oder Anhaftungsfaktoren zu identifizieren. Darunter die vor allem im ZNS vorkommenden Moleküle Serotoninrezeptor 1F (HTR1F) oder die Untereinheit alpha-3 des GABA_A-Rezeptors (GABRA3). Weitere Wirtsfaktoren, die am BDV-GP-medierten Zelleintritt beteiligt sind, waren ADAM17 und Endothelinrezeptor B (EDNRB), die ebenso wie GABRA3 in Lipidausbuchtungen zu finden sind (CLEMENTE et al., 2010). Auch Cathepsin L2 (Cathepsin V) und MMP21 sollen eine Rolle beim BDV Zelleintritt spielen (CLEMENTE et al., 2010). LDLR wird ebenfalls für den BDV Zelleintritt benötigt, kann die clathrin-medierte Endozytose triggern und fungiert als Rezeptor für Rhinoviren. Ob dies auch für BDV zutrifft, bleibt abzuklären (CLEMENTE et al., 2010).

BDV wird dynaminabhängig, durch **clathrin-medierte Endozytose**, vermutlich in Bereichen mit *lipid rafts* (Bereiche der Zellmembran mit hoher Cholesterinkonzentration) in die Zelle aufgenommen (CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2009; CLEMENTE et al., 2009; GARRY UND GARRY, 2009; MODROW, 2010). Bei diesem Prozess vermittelt das N-terminale Spaltfragment des BDV-GP (BDV-GP-N) die Rezeptorbindung, das C-terminale Fragment (BDV-GP-C) leitet anschließend die pH-abhängige Fusion mit der endosomalen Membran ein (GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; PEREZ et al., 2001; HERDEN, 2009). Nach initialer Rezeptorbindung diffundiert der Rezeptor-Ligandenkomplex in der Plasmamembran zu Einziehungen, die auf ihrer Zytoplasmaseite mit Clathrin überzogen sind. Nach der Akkumulation dieser Rezeptor-Ligandenkomplexe invaginiert die clathrin-ausgekleidete

Einziehung und schnürt sich zu einem clathrinüberzogenen Vesikel ab, der den Rezeptor-Ligandenkomplex enthält (FLINT, 2009). Die Fusion zwischen viraler und zellulärer Membran findet schließlich im mild sauren Milieu (Optimum 6,0 – 6,2) der frühen Endosomen statt (CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2009; GARRY UND GARRY, 2009; FLINT, 2009; MODROW, 2010; MACLACHLAN UND FENNER, 2011).

Die freigesetzten RNPs müssen anschließend in den Nukleus der Zellen transportiert werden, wo die BDV-RNA **Replikation und Transkription** stattfindet. Der genaue Transportmechanismus ist unbekannt (CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2009). Viele Viren nutzen zelluläre Transportmechanismen, um durch den Kernporenkomplex ins Innere des Zellkerns zu gelangen (SMITH UND HELENIUS, 2004; FLINT, 2009; MODROW, 2010; MACLACHLAN UND FENNER, 2011). Dies wird auch für BDV angenommen. Möglicherweise gelangt der RNP-Komplex durch die Kern-Lokalisierungs-Signale (NLSs) von BDV-N und BDV-P aktiv in den Nukleus und verlässt ihn über Kern-Exportsignale (NES) im Matrixprotein wieder (TOMONAGA et al., 2002). Zunächst findet in der Regel bei NSS-Viren die Transkription der einzelnen mRNA-Spezies statt. Danach muss ein Umschalten zur Replikation, mit Bildung durchgehender RNA-Stränge in Plusstrangorientierung erfolgen, der als Antigenom und Matrize für die Replikation dient (MODROW, 2010). Bei einigen NSS-Viren bestimmen die Mengen an Nukleoproteinen diesen Wechsel. Liegen sie in ausreichender Menge im Zytoplasma vor, so interagieren sie mit der Leader-RNA und verhindern damit den Stopp der Transkription an den E-Konsensusregionen, die nun überlesen werden (MODROW, 2010). Für BDV ist der Mechanismus jedoch nicht geklärt. BDV muss, abhängig vom viralen Lebenszyklus in der infizierten Zelle, einen Wechsel etablieren, der die Richtung des nukleären Transportes bestimmt (TOMONAGA et al., 2002). BDV-N und seine Interaktion mit BDV-P, sowie die Produktion der Isoform p38 könnte dabei eine wichtige Rolle spielen (TOMONAGA et al., 2002). Das NES von BDV-N überlappt exakt mit der BDV-P-Bindungsstelle, so dass der nukleäre Export von BDV-N durch Bindung von BDV-P verhindert werden könnte (TOMONAGA et al., 2002). Bindung von BDV-P an das BDV-X-Protein ist durch eine mutmaßliche NES Region mediiert. Demzufolge könnte BDV-P über die Bindung an NES von BDV-N und BDV-X als nukleärer Retentionsfaktor fungieren (TOMONAGA et al., 2002).

Das Vorhandensein von p38, dem das NLS fehlt, kann die relative Anzahl von NES im Vergleich mit NLS erhöhen. Das erhöhte Vorkommen von NES könnte den nukleären Export der viralen RNPs steigern. Dieser Prozess könnte wiederum **Reifung, Zusammenbau und Freisetzung** von neuen Virionen steigern (TOMONAGA et al., 2002). BDV-M scheint ebenso wie BDV-GP essentiell für die Reifung und Freisetzung infektiöser BDV-Partikel zu sein (KRAUS et al., 2005). Der Freisetzungsprozess umfasst unter anderem den koordinierten Zusammenbau der viralen RNPs in virale Partikel durch BDV-M und den zwei BDV-GP-Spaltfragmenten (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; GONZALEZ-DUNIA et al., 1998; GONZALEZ-DUNIA et al., 2005). Der Prozess findet an der Zelloberfläche statt (KOHNO et al., 1999; EICKMANN et al., 2005). Bei einigen behüllten Viren reichern sich Glykoproteine und Matrixproteine an speziellen Membraninseln, den *lipid rafts*, der Zytoplasmamembran an,

wobei monomere Glykoproteinmoleküle sich zu Oligomeren assoziieren, um die typischen Peplomere („Spikeähnliche“ Strukturen) zu bilden. Bei Viren mit einem helikalen Nukleokapsid, zu denen auch BDV gehört, binden die Matrixproteine an die zytoplasmatische Domäne der Glykoproteintetramere und bilden eine Matrixproteinschicht aus. Die Nukleokapsidproteine erkennen das Matrixprotein, und dieses initialisiert die Knospung (*budding*) der infektiösen Viruspartikel (IMHOFF et al. 2007; WELSCH et al., 2007; MODROW, 2010; MACLACHLAN UND FENNER, 2011; MITTLER et al., 2013).

Trotz hoher Mengen viraler BDV-Proteine und RNA wird *in vivo* wenig oder gar kein infektiöses Virus freigesetzt und es finden sich nur wenige infektiöse Partikel in einer Zelle (PAULI UND LUDWIG, 1985; KOHNO et al., 1999; EICKMANN et al., 2005; GONZALEZ-DUNIA et al., 2005; HERDEN, 2009). Verschiedene Zelllinien geben dagegen unterschiedliche Mengen an BDV-Partikeln in den Zellkulturüberstand ab (CARBONE et al., 1993; BAYER, 2010).

Die initiale BDV-Infektion scheint mit Sicherheit die Interaktion des N-Terminalen Spaltfragments des BDV-GP mit einem zellulären Rezeptor zu benötigen. Wie jedoch die weitere Ausbreitung im ZNS von statten geht, wird kontrovers diskutiert (GOSZTONYI et al., 1993; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; BAJRAMOVIC et al., 2003). Ob bei der Zell-zu-Zellausbreitung grundsätzlich ganze Viruspartikel entstehen müssen oder ob analog zum Tollwutvirus infektiöse, unbehüllte Ribonukleinkomplexe (*ribonucleoprotein complex*, RNP) weitergegeben werden können, muss noch geklärt werden (GOSZTONYI et al., 1993; CUBITT UND DE LA TORRE, 1994). Die Möglichkeit einer Glykoproteinrezeptor-unabhängigen Virusausbreitung wurde *in vitro* bereits beschrieben (CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007) und wird detailliert unter 2.3.5.2 dargestellt.

2.3.5 Ausbreitung behüllter Viren

2.3.5.1 Allgemeines zur Ausbreitung behüllter Viren

Neu gebildete Virionen haben die Aufgabe, neue Wirtszellen zu infizieren und den Infektionszyklus zu wiederholen. Viele Viren geben dazu freie Viruspartikel in den Extrazellularraum ab und müssen dort eine gewisse Strecke zurücklegen, bis sie auf neue empfängliche Wirtszellen treffen. Diese kann eine unmittelbare Nachbarzelle sein, oder eine entfernt liegende Zelle, die via Zirkulation oder intraaxonal erreicht wird (FLINT, 2009; ZHONG et al., 2013). Dort wiederholt sich der Infektionszyklus. Andere Viren breiten sich durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt aus (ZHONG et al., 2013). Eine eher lokalisierte Freisetzung von Viruspartikeln an Kontaktstellen zwischen infizierter Zelle und ihrem uninfizierten Nachbarn kann dabei die Exposition im Extrazellularraum deutlich verkürzen und weniger Angriffsmöglichkeiten für das Immunsystem bieten (FLINT, 2009; ZHONG et al., 2013). Manche Viren können sich gänzlich ohne die Abgabe freier Viruspartikel in den Extrazellularraum ausbreiten. Teilweise kann ein Virustyp auf verschiedenen Ausbreitungsstrategien zurückgreifen. Herpes simplex Typ 1-Virus kann z.B. über seine Oberflächenglykoproteine, die die Fusion beim Viruseintritt in Zellen vermitteln, auch eine

Fusion benachbarter Zellen induzieren, was zur Ausbildung von Synzytien führt. Das Virus ist außerdem in der Lage sich via spezieller *Tight junctions* von einer Epithelzelle zur anderen auszubreiten. Herpes simplex Typ 1-Viren können überdies transsynaptisch an Axonendigungen von einem infizierten Neuron auf das uninfizierte Neuron übergehen (FLINT, 2009). Direkte Zell-zu-Zellausbreitung scheint auch der bevorzugte Mechanismus für die Übertragung von HIV-1 und anderen Retroviren zu sein. Wenn eine infizierte Zelle Kontakt mit einer uninfizierten Nachbarzelle aufnimmt, wird die Bildung sogenannter „virologischer Synapsen“ induziert, in denen das virale Glykoprotein, der Rezeptor CD4 und der Korezeptor CxCr4 akkumulieren. Diese Art der Virusweitergabe ist 2-3 mal effektiver als die Infektion über Aufnahme extrazellulärer Virionen. Der Prozess hängt allerdings von der glykoprotein- und rezeptormediierten Bildung von Filopodien zwischen uninfizierter und infizierter Zelle ab. Viruspartikel wandern entlang der Außenseite dieser Filopodienbrücke zur uninfizierten Zelle (SMITH UND HELENIUS, 2004; SHERER UND MOTHES, 2008; FLINT, 2009; WANG et al., 2011; ZHONG et al., 2013). Auch Vaccinaviren, die Prototypen der Pockenvirusfamilie, sind in der Lage, neu gebildete Virionen über Actinfilamentausläufer an benachbarte Zellen weiterzugeben (DOCEUL et al., 2010).

Die persistente Masernvirusinfektion des Gehirns ist mit der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis assoziiert. Die transneuronale Ausbreitung des Virus erfolgt auf anderem Weg als in nicht-neuronalen Geweben. Das Virus breitet sich ohne Freisetzung von Viruspartikeln und ohne Bindung an den viralen Rezeptor aus, lediglich ein Zell-zu-Zellkontakt wird benötigt. Vermutlich findet die Ausbreitung via RNPs über Synapsen statt. In Astrozyten induziert das Masernvirus dagegen die Bildung von Synzytien und breitet sich durch Fusion von infizierten Zellen mit uninfizierten Nachbarzellen aus (FLINT, 2009; MODROW, 2010).

Insgesamt sind die zugrundeliegenden Mechanismen für viele Viren noch weitgehend unverstanden. Die Aufklärung dieser Strategien könnte zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen (DOCEUL et al., 2010).

2.3.5.2 BDV-Ausbreitung in Zellkulturen

Das Wirtsspektrum des BDV ist auch in kultivierten Zellen extrem groß. Mit wenigen Ausnahmen lassen sich fast alle primären Zellen und die meisten Zelllinien mit BDV infizieren (DANNER et al., 1978; HERZOG UND ROTT, 1980; DE LA TORRE, 2002b). Nicht empfänglich für BDV sind dagegen immunkompetente Zellen wie Blutlymphozyten, Lymphozyten aus der Milz, Makrophagen, aber auch humane HeLa Zellen und Moskito-Shingh Zellen (DANNER et al., 1978; HERZOG UND ROTT, 1980). Die Ausbreitungsstrategien des BDV werden nach wie vor kontrovers diskutiert (GOSZTONYI et al., 1993; BAJRAMOVIC et al., 2003). Eine denkbare Ausbreitungsstrategie in Zellkulturen ist die Weitergabe von freien Viruspartikeln, die von infizierten Zellen in das Zellkulturmedium abgegeben werden. Der weitere Infektionsweg würde die rezeptorabhängige Endozytose der freien Viruspartikel beinhalten (DUCHALA et al., 1989; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007). Dieser Infektionsweg setzt allerdings die posttranslationelle, Furin-medierte Spaltung des BDV-GP in seine beiden funktionellen

Untereinheiten BDV-GP-N und BDV-GP-C voraus (RICHT et al., 1998) (siehe 2.3.3.1 und Abbildung 4).

Einige Studien lassen eine Glykoprotein-unabhängige BDV-Ausbreitung über nicht behüllte RNP vermuten (GOSZTONYI et al., 1993; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass RNP-Partikel nach Transfektion in empfängliche Zelllinien infektiös sind (HERZOG UND ROTT, 1980; PAULI UND LUDWIG, 1985; GOSZTONYI et al., 1993; CUBITT UND DE LA TORRE, 1994; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; KOHNO et al., 1999; RICHT UND ROTT, 2001; DE LA TORRE, 2002b; HERDEN, 2009). Auch CLEMENTE und DE LA TORRE (2007) zufolge kann die BDV-Ausbreitung in nicht-neuronalen Zellen unabhängig von einer posttranslationalen Prozessierung des BDV-GP stattfinden. In BDV-infizierten Furin-defizienten CHO-Zellen (DF11) konnten die Autoren eine geringe Zell-zu-Zellausbreitung des Virus nachweisen, jedoch lag die Ausbreitungseffizienz deutlich unter der von BDV in CHO-Zellen mit funktionierender Protease (CLEMENTE und DE LA TORRE, 2007).

2.3.6 Persistenzmechanismen

Wichtige Voraussetzung für die Entstehung eines persistierenden Infektionszyklus sind die Retention des Virus bzw. des viralen Genoms im Wirtsorganismus, das Vermeiden einer effektiven Viruselimination durch die antivirale Immunantwort und die Minimierung der virusinduzierten zellalterierenden Effekte, um das Überleben des infizierten Wirtes zu sichern (GILBERT et al., 1996; AHMED UND LYLES, 1997; HERDEN, 2009). Als begünstigende Faktoren für virale Persistenz können der ausgeprägte Neurotropismus des BDV, die intraaxonale Virusausbreitung, die restriktive Freisetzung maturer Viruspartikel und die für ein RNA-Virus ungewöhnlich hohe Konservierung des BDV-Genoms als mögliche Adaption an einen nicht-zytolytischen Vermehrungszyklus angesehen werden (HERDEN, 2009).

Prädisponierend für die virale Persistenz wirkt ebenfalls die Möglichkeit einer Regulation der viralen Replikation. Hierzu verwendet das BDV unterschiedliche Strategien. Beispielsweise ist das Durchlesen der Stoppsignale T3 essentiell für die Generierung primärer Transkripte, die das ORF V für BDV-L (RNA-abhängige RNA-Polymerase) enthalten. Das Überlesen der Terminations-Signale soll maximal bei 3% bzw. 5% der neu gebildeten Transkripte erfolgen (JEHLE et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2005). Variierende Anteile der 7,2 kb subgenomischen RNAs können somit an der Regulation der Replikation und Transkription beteiligt sein (SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEEMANN et al., 1995).

In Versuchen im Minireplikon-Modell (rekombinantes Virussystem) konnte der Einfluss des intrazellulären Verhältnisses von BDV-N zu BDV-P sowie von BDV-P zu BDV-X auf die Syntheseleistung der Polymerase dargelegt werden. Offenbar wird über die Regulation der Proteinexpression wiederum die Polymeraseaktivität beeinflusst (SCHNEIDER, 2005). Im akuten Erkrankungsstadium liegt der Anteil von BDV-N deutlich über dem von BDV-P, was sich positiv auf die enzymatische Aktivität von BDV-L auswirken soll. In der chronisch persistierenden Phase ist dagegen achtmal mehr BDV-P als BDV-N vorhanden, was zumindest im Modell die Syntheseleistung der Polymerase nahezu ausschaltet (WATANABE et al., 2000; POENISCH et al., 2004; SCHNEIDER, 2005; POENISCH et al., 2008). BDV-X scheint

durch Komplexbildung mit BDV-P zu einer Retention des Phosphoproteins im Zytoplasma und damit zu einer Hemmung der Aktivität des RNP-Komplexes zu führen (POENISCH et al., 2004; SCHNEIDER, 2005; POENISCH et al., 2008). Das Fehlen von BDV-X in der frühen Infektionsphase fördert offenbar die Polymerase-Aktivität. Das Protein wurde erst in persistent infizierten Zellen nachgewiesen, die damit verbundene Hemmung der Polymerase-Aktivität scheint wiederum die virale Persistenz zu begünstigen (SCHWARDT et al., 2005). Die Isoform des BDV-N, p38, ist nicht an der Bildung des RNP-Komplexes beteiligt. Dagegen fördert BDV-N p40 im Minireplikon-Modell die virale Replikation und Transkription (PEREZ et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2004b).

In einer aktuellen Studie konnte für BDV eine bisher unbekannte Virus-Wirtsinteraktion gezeigt werden. Durch Bindung von BDV-P an Histone wird die Epigenetik der Wirtszelle beeinflusst, was wiederum mit einer verminderten viralen Replikation einhergeht und die BDV-Persistenz fördert (BONNAUD et al., 2015). Möglicherweise hat sich diese Strategie im Zuge der 40 Millionen Jahre langen Koevolution von Bornaviren und deren Wirtstieren herausgebildet (BELYI et al., 2010; HORIE et al., 2010; BONNAUD et al., 2015).

Transkriptions- und Replikationsinitiationssequenzen, sogenannte Promotoren, finden sich bei NNS-RNA-Viren üblicherweise in den nicht-kodierenden Genomenden. Bei BDV fällt eine überraschende terminale Heterogenität auf, die durch eine Verkürzung der 3' bzw. 5'-Enden der genomischen RNA und der cRNA zustande kommt (PLESCHKA et al., 2001). Dieses aktive Kürzen scheint zu einer deutlich herabgesetzten Replikations- und Transkriptionsaktivität zu führen, was mit einer reduzierten und verlangsamten Virusausbreitung einhergehen soll. Dies könnte eine mögliche Strategie des BDVs zur Etablierung seines nicht-zytolytischen persistierenden Vermehrungszyklus darstellen (ROSARIO et al., 2005; SCHNEIDER, 2005; SCHNEIDER et al., 2005; DE LA TORRE, 2006; SCHNEIDER et al., 2007). Im Modell konnte dagegen gezeigt werden, dass Trimmen der 5'-Genomenden zwar zu einer deutlich herabgesetzten Replikation führen kann, die Transkriptionseffizienz aber erhalten bleibt. Dies könnte eine Erklärung für die hohe Proteinexpression bei gleichzeitig geringem Vorhandensein infektiöser Viren in der persistierenden Phase der BDV-Infektion sein (SCHNEIDER et al., 2005). Das Kürzen der BDV-Enden soll außerdem zum Entfernen von 5'-Triphosphatgruppen führen, was die IFN-Induktion unterdrückt (PLESCHKA et al., 2001). Somit könnte das BDV besser vor der körpereigenen Immunantwort geschützt sein, was wiederum eine persistente Infektion begünstigen würde (HABJAN et al., 2008). Bisher ist nicht bekannt, ob virale und/oder wirtseigene Faktoren für das Kürzen der BDV-Genomenden verantwortlich sind (persönliche Mitteilung CHRISTIANE HERDEN). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass BDV der körpereigenen Immunantwort nicht nur entkommt, sondern sie aktiv beeinflussen kann, da z.B. BDV-P durch verschiedene Mechanismen die Induktion von Interferon 1 verhindern kann (ZHAI et al., 2013).

Weitere Mechanismen zur Etablierung einer nicht-zytolytischen persistierenden Infektion betreffen die Regulation der BDV-Proteinexpression. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Spleißeffizienz viraler RNAs das Überleben der infizierten Zellen begünstigt, da

eine Überlastung des für physiologische Funktionen nötigen zellulären Spleißapparates verhindert wird (JEHLE et al., 2000; CUBITT et al., 2001). Eine weitere Schlüsselrolle für die virale Persistenz spielt das BDV-Glykoprotein. Virale Glykoproteine stellen häufig Determinanten für die antivirale Immunantwort dar. Durch die Herabregulierung der BDV-GP-Expression auf der Oberfläche der infizierten Zellen bzw. durch die Maskierung viraler Epitope mittels wirtseigener N-Glykane kann eine effektive Virusabwehr durch neutralisierende Antikörper unterlaufen werden (OLDSTONE, 1991; KIEMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005).

2.4 ZELLTROPISMUS DES BDV

BDV zeigt bei experimentell oder spontan infizierten, immunkompetenten Tieren einen ausgeprägten Neurotropismus (NARAYAN et al., 1983a; HERZOG et al., 1984; CARBONE et al., 1987; MORALES et al., 1988; CARBONE et al., 1991a; RICHT et al., 1991; ROTT UND BECHT, 1995; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; HERDEN, 2009). Das BDVirus findet sich *in vivo* bei adulten Tieren ausschließlich im ZNS, peripheren Nervensystem (PNS) und in Organen neuroektodermalen Ursprungs (HIRANO et al., 1983; NARAYAN et al., 1983a; HERZOG et al., 1984; CARBONE et al., 1987).

Bei immuninkompetenten, neonatal BDV-infizierten Lewis-Ratten breitet sich das Virus dagegen in fast alle Organe aus (HERZOG et al., 1984; MORALES et al., 1988; TOMONAGA et al., 2002). Die unterschiedliche Empfänglichkeit für BDV-Infektionen kann nicht nur durch die unterschiedliche Immunkompetenz zustande kommen, sondern könnte auf das Vorhandensein bzw. Fehlen von bisher unbekanntem BDV-spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche verschiedener Körperzellen zurückzuführen sein (HERZOG et al., 1984; CARBONE et al., 1993; RICHT et al., 1997b). Alternativ könnten die zell- und gewebespezifischen Unterschiede in der BDV-Infektion auf die Produktion von Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren wie NGF) zurückzuführen sein, die die BDV-Protein- und RNA-Produktion in diesen Zellen fördert (CARBONE et al., 1993).

Für die einzelnen BDV-Proteine und ihrer RNAs bestehen unterschiedlich regulierende und kontrollierende Mechanismen. Die BDV-Infektion wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. So besteht ein Tropismus des BDV für bestimmte Gehirnareale und Zelltypen, der sich im Verlauf der Infektion ändert. Über die Regulation der Transkription, Replikation und Translation kann die Expression viraler Proteine beeinflusst werden (WERNER-KEIŠŠ, 2006) (siehe 2.3.3).

2.4.1 Astrozyten

Das BDV zeigt in den ersten 2 Wochen nach experimenteller Infektion von Lewis-Ratten einen ausgeprägten Tropismus für Neurone, es sind nur wenige Astrozyten BDV-positiv (CARBONE et al., 1987; CARBONE et al., 1991a; RICHT et al., 1991; GOSZTONYI et al., 1993; BAUTISTA et al., 1994; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; GONZALEZ-DUNIA et al., 2005; HERDEN et al., 2000, 2005; WERNER-KEIŠŠ, 2006). Im chronischen Stadium der Infektion sind

dagegen im gesamten Gehirn verteilt, etwa ab Tag 23 p.i., auch zunehmend Astrozyten BDV-positiv (CARBONE et al., 1987; CARBONE et al., 1991a; STAEHEL et al., 2001; OVANESOV et al., 2008). WERNER-KEIŠŠ (2006) und POROMBKA (2008) konnten zeigen, dass schon ab 7 Tagen p.i. BDV-spezifisches Antigen und RNA in einzelnen Astrozyten gefunden werden können. Interessanterweise konnte BDV-M bevorzugt in Astrozyten, aber auch in Neuronen, Oligodendrozyten und Ependymzellen nachgewiesen werden (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Dabei fand eine Verschiebung der bevorzugten Zelltypen von großen Neuronen in der akuten Phase hin zu Astrozyten und kleinen Neuronen in der chronischen Infektionsphase statt. Die Anzahl positiver Astrozyten nahm im Verlauf der Infektion zu (WERNER-KEIŠŠ, 2006). BDV-GP fand sich im Gegensatz zur BDV-GP mRNA dagegen nie in Astrozyten, sondern immer nur im Zytoplasma großer Neurone (WERNER-KEIŠŠ, 2006).

2.4.2 Neurone, Oligodendrozyten und andere Gehirnzellen

Neurone sind die ersten Zielzellen im Frühstadium der Infektion, (HIRANO et al., 1983; WERNER-KEIŠŠ, 2006; POROMBKA, 2006; HERDEN 2009). Im weiteren Verlauf sind BDV-Protein, -RNA und Virusantigen auch in Ganglienzellen (z.B. im Trigeminalganglion), Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen und Schwannschen Zellen nachweisbar (NARAYAN et al., 1983b; HERZOG et al., 1984; CARBONE et al., 1987; MORALES et al., 1988; CARBONE et al., 1991a; RICHT et al., 1991; ROTT UND BECHT, 1995; HERDEN, 2000, 2009; HERDEN et al., 2005; WERNER-KEIŠŠ, 2006). Vereinzelt positive Zellen können auch in der Leptomeninx gefunden werden (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Die genomische BDV-RNA liegt im Zellkern, die mRNA findet sich sowohl im Kern als auch im Zytoplasma (CARBONE et al., 1991a; RICHT et al., 1991; CUBITT UND DE LA TORRE, 1994; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Mikrogliazellen werden nicht durch BDV-infiziert (OVANESOV et al., 2006; OVANESOV et al., 2008).

2.4.3 Neonatale Infektion von Epithelzellen

Interessanterweise bestehen bei Ratten altersabhängige Unterschiede in der Gewebeverteilung des BDV. Bei neonatal infizierten Ratten kann infektiöses Virus und virales Antigen in den Zellen fast aller Organe sowie in Tränen, Speichel und Urin gefunden werden. Das Virus gelangt über Nervenendigungen in die jeweiligen Epithelzellen (HERZOG et al., 1984; MORALES et al., 1988). SAUDER und STAEHEL (2003) konnten dagegen nur im Urin infektiöses BDV nachweisen. Nicht infiziert werden bei immuninkompetenten Lewis-Ratten periphere Blutzellen, lymphatische Organe, Endothelzellen sowie Keimzellen (HERZOG et al., 1984; MORALES et al., 1988; HERDEN, 2009). Die neonatal infizierten Tiere zeigen eine lebenslange Viruspersistenz ohne selber zu erkranken bzw. typische Entzündungsreaktionen zu zeigen, vermutlich als Folge einer klonalen Deletion in BDV-spezifischen T-Zellen im Thymus (CARBONE et al., 1991b; RUBIN et al., 1995). Im Gegensatz zu Lewis-Ratten kann im Uterus, den Hoden und Nebenhoden der als natürliches Reservoir diskutierten Feldspitzmäuse BDV-Antigen nachgewiesen werden, so dass hier eine sexuelle bzw. vertikale Übertragung möglich erscheint (PUORGER et al., 2010).

2.5 ANTIVIRALE INTERVENTIONSSTRATEGIEN

2.5.1 Prophylaxe- und Therapieansätze bei Bornascher Krankheit

Bisher gibt es für BD keine überzeugenden Therapie- und Prophylaxemöglichkeiten. Eine lapinisierte Lebendvaccine wurde über viele Jahre in Ostdeutschland eingesetzt. Aufgrund der fraglichen Effizienz der Impfung, der möglichen Begünstigung der BD-Immunpathogenese nach Impfung und der Gefahr der Etablierung persistenter Virusträger wurde die Impfung 1992 eingestellt (RICHT et al., 2000). Einige Studien beschäftigen sich seitdem mit der Entwicklung neuer BD-Impfstoffe. So gab es bei Ratten Versuche mit intrazerebral verabreichtem, zellkulturattenuiertem BDV, die bei hohen Inokulationsdosen einen Schutz boten (OLDACH et al., 1995; FURRER et al., 2001a). Auch rekombinante Impfstoffe kamen in Studien zum Einsatz. Ein rekombinantes, BDV-N exprimierendes Vaccinavirus sowie ein BDV-N exprimierendes Parapoxvirus-Vektorsystem wurde erfolgreich zur Immunisierung von Ratten eingesetzt (LEWIS et al., 1999; HENKEL et al., 2005).

Zur Behandlung der BD wurden verschiedene Therapieansätze ausprobiert. Amantidinsulfat, ein Medikament zur antiviralen Therapie bei Influenza A-Infektionen, wurde *in vitro* und *in vivo* gegen BDV eingesetzt. Die Wirksamkeit wird jedoch kontrovers diskutiert (CUBITT UND DE LA TORRE, 1994; STITZ et al., 1998; RICHT et al., 2000). Ribavirin inhibiert die Transkription und Replikation verschiedener BDV-Stämme in unterschiedlichen Zelllinien (MIZUTANI et al., 1998; JORDAN et al., 1999). Der Nutzen *in vivo* bleibt fraglich. Nach Injektion in Gehirnentrikel infizierter Ratten zeigten sich zwar weniger Entzündungszellinfiltrate und ein milderer Verlauf der Erkrankung, die Effekte sind aber vermutlich auf die antimitotische Wirkung auf Mikroglia zurückzuführen. Ribavirin zeigte bei BDV-infizierten Ratten keinen Effekt auf die virale Last (SOLBRIG et al., 2002). Gerbils tolerieren höhere Ribavirin-Dosen als Ratten. In einer Studie konnte durch den Einsatz von hohen Ribavirin-Dosen die BDV-Vermehrung und -Ausbreitung in den Gerbilgehirnen reduziert werden (LEE et al., 2008). 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C) inhibiert die BDV Replikation in Zellkulturen und *in vivo*. Bei BDV-infizierten Ratten zeigte sich auch eine Verbesserung der klinischen Symptome (BAJRAMOVIC et al., 2002). Der DNA-Polymerase-Inhibitor Ara-C scheint beim BDV als kompetitiver Inhibitor von Cytidin zu wirken und die BDV-Polymeraseaktivität herabzusetzen (BAJRAMOVIC et al., 2002; VOLMER et al., 2005). Ein verwandtes Cytosin Nukleosid, das 2'-fluor-2'-Deoxycytidin (2'-FdC) zeigt *in vitro* eine ähnliche antivirale Aktivität und könnte aufgrund seiner geringeren Zytotoxizität Vorteile gegenüber Ara-C haben (BAJRAMOVIC et al., 2004). Filtration der Zerebrospinalflüssigkeit wurde bisher bei zwei Pferden mit BD erfolgreich eingesetzt (RICHT et al., 2000). Insgesamt gibt es für die BD aufgrund der Immunpathogenese jedoch noch keine Therapie, die sich durchgesetzt hat (RICHT et al., 2000).

2.5.2 Furin und Furin-Inhibitor MI-0701

2.5.2.1 Furin und andere Subtilisin-ähnliche Pro-Protein-Konvertasen (SPCs)

Furin gehört zu den Subtilisin-ähnlichen Pro-Protein-Konvertasen („subtilisin-like“ oder „subtilisin-related pro-protein convertase“, SPC) (ROUILLÉ et al., 1995; BERGERON et al., 2000; BECKER et al., 2010), die in der Lage sind, Vorläuferproteine an spezifischen, carboxyterminalen Sequenzen paariger basischer Aminosäuren zu spalten (BARR et al., 1991; CHAN et al., 1992; HALLENBERGER et al., 1992; DENAULT et al., 1995; SEIDAH UND CHRÉTIEN, 1999; BERGERON et al., 2000; BASAK, 2005; BECKER et al., 2010). Die Spaltstelle für Furin besteht aus der übereinstimmenden Erkennungssequenz Arg/Lys/His-(X)_n-X/Lys/Arg-Arg)↓ (n= 1 oder 3; X kennzeichnet jede Aminosäure außer Cystein) (BERGERON et al., 2000; BASAK, 2005).

Nach der Nomenklatur von CHAN et al. (1992) werden beim Säugetier sieben SPCs unterschieden (SPC1 – SPC7). Furin gehört neben dem „paired amino acid converting enzyme“ (PACE; BARR et al., 1991; KIEFER et al., 1991; ROEBROEK et al., 1998; BERGERON et al., 2000) zur Gruppe der SPC1. In zahlreichen Studien zur gewebespezifischen Verteilung der SPCs konnte gezeigt werden, dass Zellen bzw. Gewebe in der Regel eine Mischung aus verschiedenen SPCs enthalten (BERGERON et al., 2000). Im Gehirn von Säugetieren konnten bis auf SPC5 bisher alle bekannten SPCs nachgewiesen werden, wobei nur SPC1, SPC4 und SPC7 auch in Gliazellen gefunden wurden (SCHÄFER et al., 1993; DONG et al., 1995; SEIDAH et al., 1996; BERGERON et al., 2000).

Furin wird in allen Körpergeweben in unterschiedlichem Maß exprimiert. Im Gehirn konnte es sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachgewiesen werden (SCHÄFER et al., 1993; DONG et al., 1995; SEIDAH et al., 1996; WERNER-KEIŠŠ, 2006). Im trans-Golgi Netzwerk der Zellen findet Furin die für seine biologische Aktivität wichtige Kalziumkonzentration und einen neutralen pH-Wert (HALLENBERGER et al., 1992; BERGERON et al., 2000).

Das Enzym ist in zahlreiche physiologische Prozesse involviert und verantwortlich für die Reifung inaktiver Vorläuferproteine (REMACLE et al., 2008; IZIDORO et al., 2009). Es gilt *in vivo* als lebensnotwendiges Enzym, da es grundlegende Proteine in allen Zellen spaltet, scheint aber nicht essentiell für das Überleben von etablierten Zelllinien zu sein (BERGERON et al., 2000). Furin spaltet beispielsweise Pro-Endothelin-1 (DENAULT et al., 1995), Pro-von-Willebrand-Faktor (WISE et al., 1990), Insulin Pro-Rezeptor (MONDINO et al., 1991), Pro-β-nerve growth factor, Pro-transforming growth factor β1 (DUBOIS et al., 1995) und ist für die normale Entwicklung von Maus-Embryonen unentbehrlich (ROEBROEK et al., 1998). Das Enzym spielt auch eine Rolle bei zahlreichen pathologischen Prozessen, wie z.B. viralen und bakteriellen Infektionen, Tumorgenese, Alzheimer, Diabetes mellitus und Atherosklerose (THOMAS, 2002; BASAK, 2005).

RICHT et al. 1998 konnten für das BDV nachweisen, dass die Spaltung des 94 Kilodalton großen Glykoprotein-Vorläufermoleküls an der Aminosäure Arginin an Position 249 für

dessen biologische Aktivierung nötig ist (Abbildung 4). Auch für andere Viren konnte die Bedeutung der Glykoproteinspaltung für die virale Ausbreitung gezeigt werden (BOLT UND PEDERSEN, 1998; VOLCHKOV et al., 1998; VOLCHKOV et al., 2000; BASAK, 2005). So scheint die proteolytische Spaltung der erste Schritt in der Aktivierung der Fusionsproteine zu sein und wird von einer Konformationsänderung gefolgt, die zur Exposition der Fusionsdomäne führt (VOLCHKOV et al., 1998). Die Spaltung resultiert häufig auch in der Exposition hydrophober Sequenzen, die wiederum die Fusion der Virushülle mit Membranen der Zielzelle induzieren (HALLENBERGER et al., 1992). Somit stellt die proteolytische Aktivierung viraler Glykoproteine einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar (VOLCHKOV et al., 1998). Eine Furin-abhängige Glykoproteinspaltung konnte auch für die Hüllglykoproteine des Ebola- und Marburg-Virus, des Masernvirus sowie für das HIV-1-Virus gezeigt werden. Auch für aviäres Influenzavirus vom Subtyp H5 und H7, Newcastle disease virus und Chikungunya Virus ist die Spaltung Voraussetzung für die Glykoprotein-Reifung und Fusionsaktivität (HALLENBERGER et al., 1992; STIENEKE-GRÖBER et al., 1992; MORIKAWA et al., 1993; GARTEN et al., 1994; BOLT UND PEDERSEN, 1998; VOLCHKOV et al., 1998; VOLCHKOV et al., 2000; BASAK, 2005; OZDEN et al., 2008). *In vivo* können möglicherweise auch andere SPCs eine Rolle bei der BDV-GP-Spaltung spielen (RIMA UND DUPREX, 2005). Die HIV-1 GP-Spaltung kann sowohl durch Furin (SPC1) als auch durch SPC4 erfolgen (HALLENBERGER et al., 1992; MORIKAWA et al., 1993; DECROLY et al., 1994). Gleiches gilt für das GP des Marburg Virus, das durch Furin oder SPC6 (PC5, PC6) gespalten werden kann (VOLCHKOV et al., 2000).

2.5.2.2 SPC-Inhibitoren und der Furin-Inhibitor MI-0701

SPC-Inhibitoren können in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. reine Peptide, 2. peptidmimetische Inhibitoren (substratanaloge Peptide) und 3. nicht-proteinbasierte chemische Verbindungen (BASAK, 2005; BECKER et al., 2010).

Furin-spezifische Inhibitoren, wie z.B. der peptidmimetische Furininhibitor decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketone (decRVKRcmk), können die BDV-Glykoproteinspaltung und damit die glykoproteinabhängige Virusausbreitung blockieren (HALLENBERGER et al., 1992; GARTEN et al., 1994; RICHT et al., 1998; BAJRAMOVIC et al., 2003; OZDEN et al., 2008). In BDV-infizierten Neuronen konnte nach Zugabe von decRVKRcmk keine Virusausbreitung in benachbarte Zellen mehr nachgewiesen werden (GARTEN et al., 1989; BAJRAMOVIC et al., 2003). Auch *in vivo* scheint die transneuronalen BDV-Ausbreitung glykoproteinabhängig zu sein (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). Peptidmimetische Inhibitoren haben allerdings den Nachteil, sehr anfällig für Proteolyse zu sein und weisen deshalb nur eine sehr begrenzte Stabilität auf, die ca. 4-8 Stunden für Chloroalkylketonen beträgt (HALLENBERGER et al., 1992; BECKER et al., 2010).

BECKER et al. (2010) gelangen es einen Furin-Inhibitor (MI-0701) zur Inhibition der Glykoprotein-Spaltung zu synthetisieren, der eine wesentlich höhere Stabilität aufweist. MI-0701 ist ein substratanaloges Peptid des Furins, bei dem ein nachgeahmtes decarboxyliertes Arginin in die P1-Position eingebaut wurde. Es handelt sich um ein 4-Amidino-Benzylamid-Derivat, mit der chemischen Formel $C_{35}H_{55}N_{15}O_4$, welches ein Molekulargewicht von 749,91

besitzt (Abbildung 5) (BECKER et al., 2010; BAYER, 2010; HARDES et al., 2015). Dem Peptid fehlt die C-terminale Carboxylgruppe, deshalb ist es nicht anfällig für den Abbau durch Carboxypeptidasen. Eine N-terminale Acetylierung wirkt zusätzlich stabilisierend gegen Aminopeptidasen. Einen weiteren Vorteil bietet die nur sehr gering ausgeprägte Zytotoxizität, so dass *in vitro* kein Einfluss auf die Zellviabilität zu verzeichnen ist (BAYER, 2010; HARDES et al., 2015).

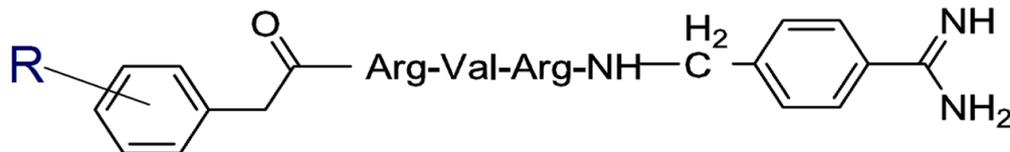


Abbildung 5: Furin-Inhibitor MI-0701

Struktur des Furin-Inhibitors MI-0701 zur Inhibition der Glykoprotein-Spaltung. MI-0701 ist ein substratanaloges Peptid des Furin, bei dem ein nachgeahmtes decarboxyliertes Arginin in die P1-Position eingebaut wurde (BECKER et al., 2010)

MI-0701 wurde bereits erfolgreich zur Hemmung der BDV-Glykoproteinspaltung in permanent BDV-infizierten Vero- und MDCK-Zellen eingesetzt (BAYER, 2010; LABITZKE, 2011; HARDES et al., 2015). In Anwesenheit des Inhibitors verringerte sich konzentrationsabhängig der Anteil an BDV-GP-C, während sich die Menge an ungespaltenem BDV-GP erhöhte (BAYER, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass MI-0701 die Ausbreitung des BDV in benachbarte Zellen verhindert. In einem Fusionstest konnte der Furin-Inhibitor die Fusionsaktivität des Virus signifikant um nahezu 100% reduzieren (BAYER, 2010). Dies führt zu dem Schluss, dass die Spaltung des BDV-Glykoproteins in BDV-infizierten Vero- und MDCK-Zellen essenziell für die Zell-zu-Zellausbreitung des Virus ist (BAYER, 2010; LABITZKE, 2011).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERSUCHSPLANUNG

Die primären corticalen Astrozytenkulturen wurden zunächst hinsichtlich ihrer Reifungs- und Differenzierungsmarker getestet (3.9.3). Dadurch sollten die Eignungen und Grenzen dieser Kulturen zur Analyse persistierender Virusinfektionen des ZNS erarbeitet werden. Das Schema des Versuchsaufbaues ist in Abbildung 6 dargestellt.

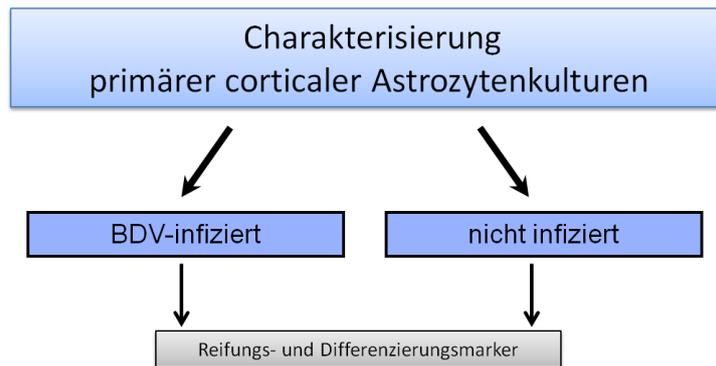


Abbildung 6: Schema des Versuchsaufbaues der Charakterisierung der primären corticalen Astrozytenkulturen

In weiteren Schritten wurde die Expression der BDV-Proteine N (Nukleoprotein), M (Matrixprotein) und GP (Glykoprotein) und die für die Proteine kodierenden mRNAs in einer Kinetik untersucht. Dadurch sollte unter anderem geklärt werden, ob zellspezifische Regulationsmechanismen in Astrozyten zur BDV-Persistenz beitragen. Die einzelnen Arbeitsschritte und dafür angewandten Methoden sind in Abbildung 7 schematisch dargestellt.

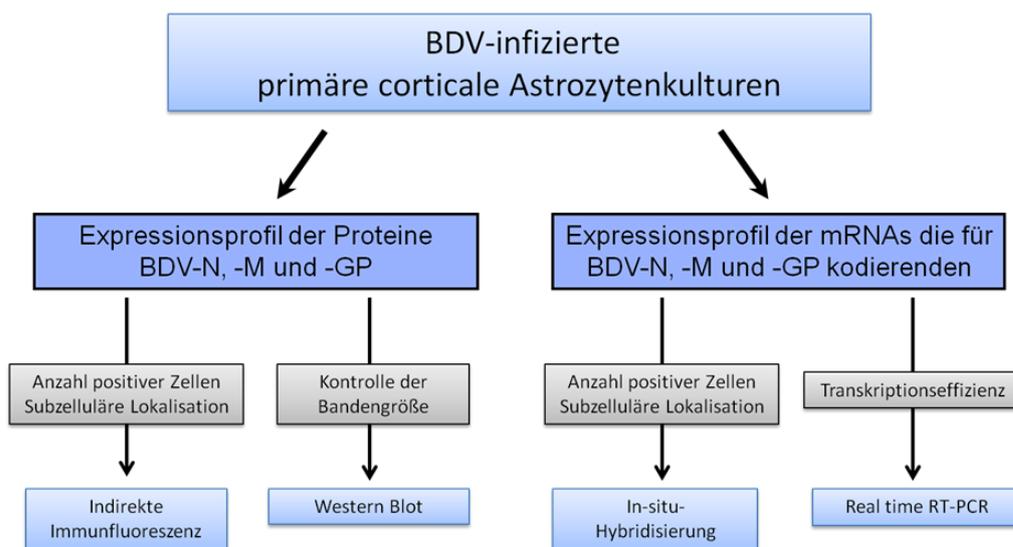


Abbildung 7: Schema der Untersuchung der BDV-Proteine und ihrer mRNAs in primären corticalen Astrozytenkulturen

In weiteren Versuchen wurden die glia-glialen Ausbreitungsstrategien des BDV untersucht. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Die funktionelle Rolle des Glykoproteins bei der Virusausbreitung wurde durch Zugabe des Furin-Inhibitors MI-0701 untersucht, der die Spaltung des Proteins in seine funktionellen Untereinheiten verhindert. (3.14). Außerdem wurden die BDV-infizierten Primärkulturen auf das Vorhandensein von infektiösen Viruspartikeln im Zellkulturüberstand hin untersucht (3.13).

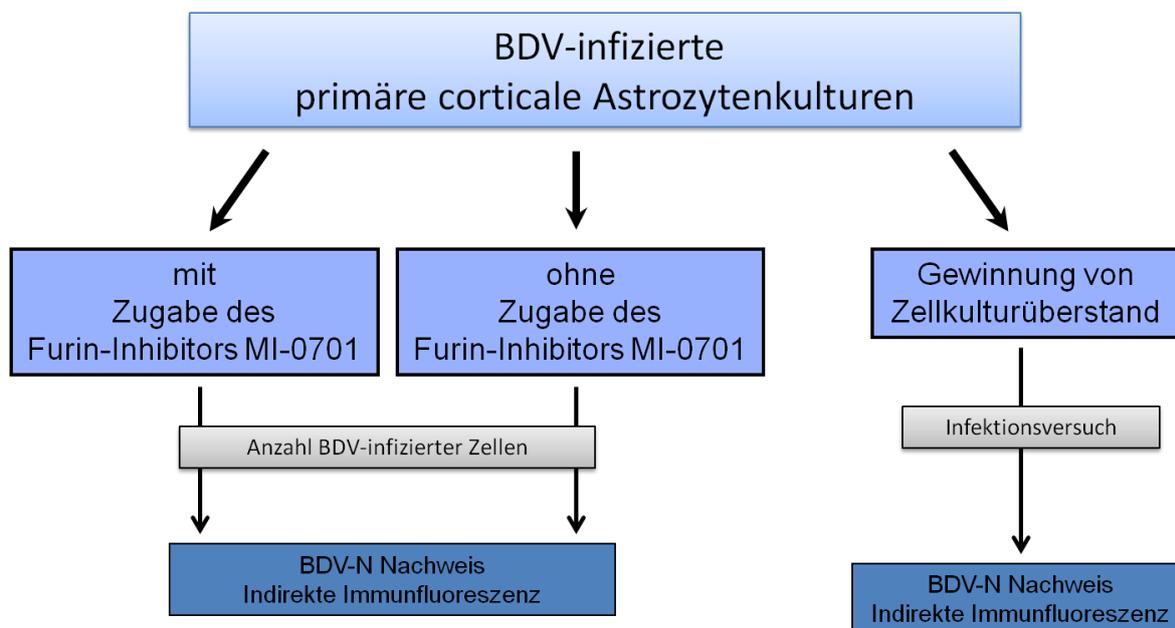


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs für die Ausbreitungsstrategien des BDV in primären corticalen Astrozytenkulturen

3.2 VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere wurden Lewis-Ratten aus dem Zentralen Tierlabor der Justus-Liebig Universität Gießen verwendet.

3.2.1 Tiere zur Präparation primärer corticaler Astrozytenkulturen

Als Ausgangsmaterial für die Präparation primärer astrozytärer Zellkulturen des Cortex cerebri (im Folgenden primäre Astrozytenkulturen genannt) dienten neonatale, 0-1 Tage alte Lewis-Ratten (Az.-Nr.: GI 18/4 V54-19c 20/15 c und Az. GI 18/4 Nr. A 4/2010). Die Tiere wurden unmittelbar vor Präparation der einzelnen Gehirne durch Dekapitation mit einem Scherenschlag getötet.

Tabelle 19 (Anhang) gibt eine Übersicht über die Anzahl der verwendeten Tiere für die jeweilige Astrozytenpräparation.

3.2.2 Kontrolltiere

Als Positivkontrollen für die Untersuchung der Astrozytenreifungs- und -differenzierungsmarker wurden Gefrierschnitte von Gehirnen neonataler (0 Tage alt) und adulter Lewis-Ratten (42 Tage alt) verwendet.

Die Tiere wurden mittels Dekapitation getötet. Im Falle der adulten Tiere erfolgte vor der Dekapitation eine Betäubung mittels Isofluran®. (Az. GI 18/4 Nr. A 4/2010 vom 25.02.2010). Neonatale Tiere wurden wie unter 3.2.1 beschrieben, getötet.

Die Gehirne wurden direkt nach der Tötung entnommen und median in zwei Hälften geteilt. Eine Gehirnhälfte wurde transversal in 5 Ebenen zerteilt, wie bei WERNER-KEIŠŠ (2006) beschrieben.

Nach Einbetten in Tissue-Tec® O.C.T.™-Compound (OCT) wurde das Gewebe unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert (siehe Tabelle 20, Anhang). Die Herstellung der Gefrierschnitte ist unter 3.8.2 beschrieben.

3.3 IN VITRO KONTROLLMATERIAL

Permanent mit BDV-H1766 infizierte MDCK-Zellen dienten in der indirekten Immunfluoreszenz (3.9.4 und 3.9.6), im Western-Blot (3.10.7) sowie in der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (3.11.3) als Positivkontrollen für den Nachweis der jeweiligen BDV-Proteine beziehungsweise der für sie kodierenden mRNAs. Die MDCK-Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Sibylle Herzog, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

Als weiteres Kontrollmaterial wurden zu 94% mit BDV-H24 (5/25/92) infizierte primäre Astrozytenkulturen verwendet, die auf ihre Reifungs- und Differenzierungsmarker und die BDV-Ausbreitung getestet wurden (siehe 3.7.3, 3.7.4 und 3.9.3). Sie dienten als zusätzliche Kontrollen in der indirekten Immunfluoreszenz zum Nachweis des BDV-Matrix- und BDV-Glykoproteins (3.9.4) und in der real-time PCR (3.12.5). Die Zellen wurden außerdem für den Versuch zur Untersuchung der glia-glialen BDV-Ausbreitung verwendet (siehe 3.14).

3.4 VIRUSPRÄPARATION

Zur Infektion der primären corticalen Astrozytenkulturen wurde eine dreimal in adulten Lewis-Ratten passagierte Viruspräparation des Gießener Stammes H24 (5/25/92) verwendet. Das Material wurde freundlicherweise von Prof. J.A. Richt Diagnostic Medicine/Pathobiology Department, Manhattan, Kansas, USA zur Verfügung gestellt. Der Virustiter betrug 6×10^5 TCID₅₀. Die Titerbestimmung wurde freundlicherweise von Frau Dr. Sibylle Herzog, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen durchgeführt. Zur Infektion wurde eine *multiplicity of infection* (MOI, dt. Multiplizität der Infektion) von 0,1 verwendet.

3.5 ALLGEMEINE VIROLOGISCHE ARBEITSSCHRITTE

Die Arbeiten mit BDV unterliegen laut Vorgabe des Regierungspräsidiums Gießen den S2-Bestimmungen nach Biostoff-Verordnung. Zusätzlich zu den Allgemeinen Hygienemaßnahmen beim Arbeiten mit Zellkulturen wurden für die Arbeiten mit BDV-Virussuspension oder BDV-infizierten Zellkulturen die in Tabelle 17 (Anhang) aufgeführten Vorgaben streng eingehalten.

3.6 PRÄPARATION UND BDV-INFEKTION PRIMÄRER CORTICALER ASTROZYTEN

3.6.1 Optimierung der Präparationsmethode

Die Präparation wurde in Anlehnung an MCCARTHY und DE VELLIS (1980) durchgeführt und in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer, Institut für Human-Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen optimiert (AHLEMEYER et al., 2013) (3.2.1). Initial wurden drei unterschiedliche Methoden zur Vereinzelung der Zellen aus den präparierten Cortices cerebri (im Folgenden Cortices bzw. singular Cortex genannt) bezüglich ihrer Zellausbeute miteinander verglichen. Zunächst wurden die Gehirnhemisphären ausschließlich mechanisch dissoziiert (Methode A), wie bei MCCARTHY und DE VELLIS (1980) beschrieben. Bei Methode B wurden die Gewebestücke vor der mechanischen Dissoziation für 20 Minuten bei 37°C mit 0,1% Papain vorverdaut. Bei Methode C wurden die Gehirne vor mechanischer Dissoziation für 15 Minuten bei 37°C mit 0,25% Trypsin-EDTA vorverdaut (Tabelle 2). Die Zelldichte der Kulturen wurde täglich, bis zum Erreichen der Konfluenz unter dem Invertmikroskop IX70 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) überprüft. Die Gewinnung von Untersuchungsmaterial erfolgte mit der Methode, die die höchste Zellausbeute ergab (3.6.2).

Tabelle 2: Methoden zur Vereinzelung der Zellen aus den präparierten Cortices

Methode	Zelldissoziation	Gewebevorverdau
A	X	-
B	X	0,1 % Papain; 20 min bei 37°C
C	X	0,25% Trypsin-EDTA; 15 min bei 37°C

Zelldissoziation = Dissoziation der Zellen mittels Cell dissociation sieve-Tissue grinder Kit® und Screen 200 mesh Netz (beides Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) mit einem Porendurchmesser von 73,7 µM

3.6.2 Präparation

Alle Gehirne eines Rattenwurfes wurden nacheinander präpariert, das Material wurde gepoolt und weiterverarbeitet. Die Präparation der primären Zellkulturen erfolgte zügig und unter sterilen Bedingungen. (siehe Abbildung 9).

MATERIAL UND METHODEN

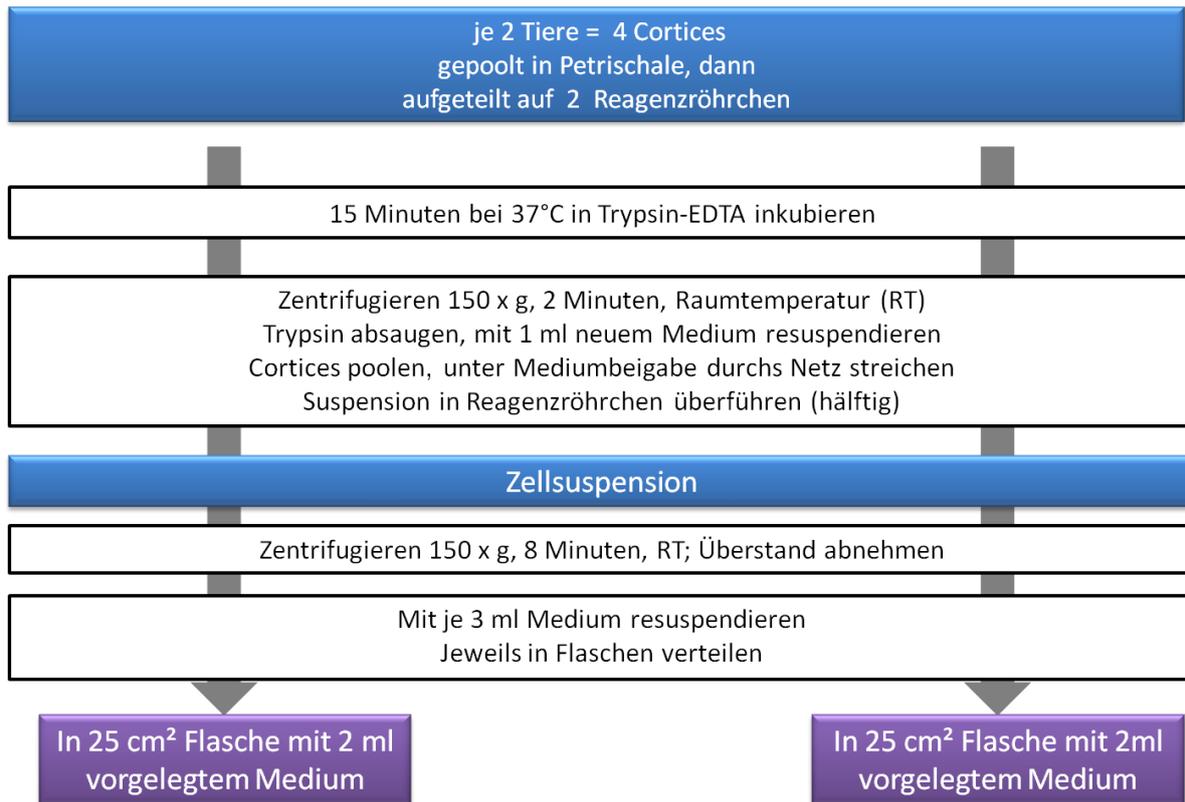


Abbildung 9: Schema Versuchsaufbau Astrozytenpräparation

Astrozytenpräparation am Beispiel eines Rattenwurfes mit 4 Tieren. Am Ende werden die Cortices von jeweils 2 Tieren auf eine Zellkulturflasche aufgeteilt. RT = Raumtemperatur; Medium = DMEM low glucose (1g/l), Gibco

1. Präparation der Gehirne: Die Neonaten wurden nach Desinfektion des Halsbereiches mit 70%igem Ethanol durch Dekapitieren mittels Scherenschlag getötet. Nach Entfernen der Schädeldecke wurde das Gehirn entnommen.
2. Präparation von Cortices frontalis und parietalis: Kleinhirn und Hirnstamm wurden abgesetzt. Mittels zweier feiner Pinzetten wurden die Meningen im Bereich der Cortices so weit wie möglich entfernt. Anschließend wurden die Großhirnhemisphären median geteilt und eventuell noch vorhandene Hirnhäute vorsichtig abpräpariert. Nacheinander wurden die Cortices beider Großhirnhälften präpariert (Cortex frontalis und parietalis im Zusammenhang). (siehe Abbildung 10) und bis zur weiteren Verarbeitung in eine sterile Plastikpetrischale mit vorgelegtem Zellkulturmedium gelegt.

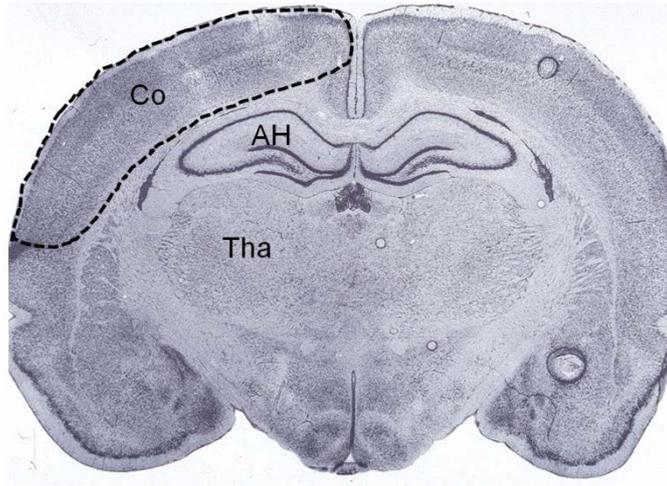


Abbildung 10: Regionen im Rattengehirn (PAXINOS and WATSON, 1998; modifiziert nach POROMBKA, 2006)

Co = Cortex cerebri (zur Präparation der primären corticalen Astrozytenkulturen verwandt); AH = Ammonshorn; Tha = Thalamus

3. Trypsinverdau: Jeweils 2-3 Cortices cerebri wurden in 15 ml Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) mit jeweils 2 ml Trypsin-EDTA (PAA, Paschingen, AT) überführt und für 15 Minuten in einem 37°C warmem Wärmebad inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 150 x g für 2 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das vorverdaute Gewebe mit jeweils 2 ml Zellkulturmedium (DMEM low glucose) resuspendiert und das Gewebe weiter zerkleinert.
4. Zelldissoziation mittels Cell dissociation sieve (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen): Das Metallsieb des Gewebezerkleinerungskits (200 mesh; Porengröße 73,7 µm) wurde über ein steriles Becherglas gehängt und mit etwas Zellkulturmedium angefeuchtet. Die Medium-Zellsuspension aus Schritt 3 wurde nun nach und nach über das Netz gegeben. Sichtbare Gewebestücke wurden durch vorsichtiges Stampfen und Drehen mit einem Glaspistill durch das Netz gestrichen.
5. Die in Schritt 4 gewonnene Zellsuspension wurde in 15 ml Reagenz- und Zentrifugenröhrchen überführt und bei 150 x g 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit ca. 4 ml Medium resuspendiert und die Zellen durch vorsichtiges Hoch- und Runterpipettieren vereinzelt.
6. Anlegen der Zellkultur: Die Resuspension wurde je nach Versuchsvorhaben auf 25 oder 75 cm² Falcon-Zellkulturflaschen (MAGV GmbH, Rabenau) mit vorgelegtem 37°C warmem Zellkulturmedium verteilt. Als Minimum wurden pro Präparation zwei Flaschen gewonnen. Die Flaschen wurden sofort in einen Begasungsbrutschrank Typ B16 (Heraeus Instruments, Bereich Thermotech, Hanau) überführt und bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert.

7. Waschen der Zellen: Nach 24 Stunden wurden die Zellen unter einem Invertmikroskop IX70 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) beurteilt. Anschließend erfolgt eine Waschung mit 4°C kalter, einfach konzentrierter phosphatgepufferter Salzlösung, 1 x PBS (9.3.1). Dies diente der Entfernung von Zelltrümmern, nicht angehafteten Zellen und Neuronen. Nach der Waschung mit 1 x PBS (9.3.1) wurden die Zellen mit Zellkulturmedium für Astrozyten (9.3.1) versetzt und erneut bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Ein Teil der Zellen wurden noch am gleichen Tag mit BDV-infiziert (siehe 3.6.4).
8. Wachstumsphase bis zur ersten Passage: Die Zellen wurden täglich unter dem Invertmikroskop IX70 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) kontrolliert. Das Zellwachstum wurde mit der Digitalkamera Nikon D200/300 (Nikon GmbH, Düsseldorf) dokumentiert. Alle 3-4 Tage erfolgt ein Mediumwechsel bis zur Konfluenz der Zellen. (3.7.1). Die Zeit bis zum Erreichen der Konfluenz lag je nach Aussaatdichte zwischen 6-9 Tagen.
9. Erste Passage: Nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen wie unter 3.7.2 beschrieben, passagiert und je nach anzuwendender Methode auf die entsprechenden Zellkulturflaschen oder Multiwell-Platten gesplittet (siehe Tabelle 21, Anhang).

3.6.3 Reinheit der Astrozytenkulturen

Die Untersuchung auf nicht-astrozytäre Zellen in der Kultur wurde freundlicherweise von Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer, Institut für Human-Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt (AHLEMEYER et al., 2013). Die Expression der Neuronenmarker MAP-2 und der Oligodendrozytenmarker CNPase wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz am Tag 28 und Tag 42 nach Präparation getestet. Außerdem wurden mittels real-time PCR die mRNA Level für Mtap2 (Neuronen) und Cnp (Oligodendrozyten) mit dem mRNA Level des Astrozytenmarkers GFAP verglichen.

3.6.4 BDV-Infektion

Nach der Waschung mit kaltem 1 x PBS (9.3.1) wurden die Zellen für mindestens 4 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Bestimmung der Multiplicity of Infection

Als *Multiplicity of infection* (MOI, dt. Multiplizität der Infektion) wird das zahlenmäßige Verhältnis von infektiösen Agenzien zu deren Zielzellen beschrieben. Die MOI lässt sich berechnen, indem die Zahl der Viren durch die Zahl der Zellen geteilt wird. Bei einer MOI von 1 werden genauso viele Viruspartikel eingesetzt wie sich Zellen in der Kultur befinden. Zur Berechnung der MOI kann folgende Formel angewendet werden (FLINT, 2009).

$$MOI = \frac{\text{Volumen(Virus)} \times \text{Konzentration (Virus)}}{\text{Volumen (Zellkultur)} \times \text{Konzentration (Zellkultur)}} = \frac{V_v \times C_v}{V_z \times C_z}$$

1. Zellzählung: Die Zellen in den Kulturflaschen wurden mittels einer in das Okular des Invertmikroskopes eingesetzten Netzmikrometerplatte (U-OCMSQ 10/10; Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) gezählt. Die Netzmikrometerplatte begrenzt bei 400-facher Vergrößerung ein Zählfeld von 0,0625 mm² (0,25 x 0,25 mm) (CZASCH, 2001; GRÖTERS, 2004) Bei Verwendung des 10-fach Okulars und eines 10er Objektivs (100fache Vergrößerung) entspricht das Zählfeld der Netzmikrometerplatte demnach 1 mm² (1 x 1 mm). Bei 100-facher Vergrößerung wurde pro Flasche die Gesamtzahl der Zellen an in 5 zufällig ausgewählten Lokalisationen ausgezählt und der Mittelwert gebildet, um die Zellzahl pro 25 cm² oder pro 75 cm² Zellkulturflasche zu bestimmen.

2. Berechnung der MOI: Unter Zuhilfenahme der Formel: $MOI = \frac{V_v \times C_v}{V_z \times C_z}$ wurde ausgehend von einer Viruskonzentration von 6×10^5 TCID₅₀/ml und einem Volumen der Zellkultur von 25 oder 75 cm² die für eine MOI von 0,1 benötigte Virusmenge berechnet.

3. Ansetzen der Virusverdünnung: Die errechnete Menge Virussuspension wurde mit Zellkulturmedium auf eine Gesamtmenge von 2 ml für eine 25 cm² Flasche, bzw. 8 ml für eine 75 cm² Flasche verdünnt, so dass der Boden der Zellkulturflaschen gerade von der Virussuspension bedeckt ist.

4. Infektion: Zur Adsorption der Viruspartikel wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Virussuspension abgenommen.

5. Nach einer einmaligen Waschung mit 1 x PBS (9.3.1) wurden die Flaschen mit Zellkulturmedium aufgefüllt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

3.7 ZELLKULTURTECHNIK

3.7.1 Medienwechsel

Das Zellkulturmedium wurde alle 3-4 Tage komplett erneuert. Die Zellmorphologie und Zelldichte wurden vor jedem Mediumwechsel mikroskopisch kontrolliert.

Für die primären Astrozytenkulturen wurde DMEM low Glucose (1g/l) verwendet (9.3.1). Als Medium für die MDCK-Zellen wurde DMEM high Glucose (4,5 g/l) benutzt (9.3.1).

3.7.2 Subkultur adhärenter Zellen (Passagieren)

Die als Positivkontrollen verwendeten BDV-infizierten MDCK-Zellen wurden wöchentlich im Verhältnis 1:10 gesplittet. Primärkulturen wachsen aufgrund ihrer natürlichen Wachstumshemmung lediglich bis zum Erreichen der Konfluenz. Im Zuge der Präparation (3.6.2) und für einige weiterführende Untersuchungen wurden auch die primären Astrozyten passagiert. Die Zellmorphologie und Zelldichte der Astrozyten wurden vor jeder Passage mikroskopisch kontrolliert.

1. Ablösen der Zellen: Nach Abnahme des Zellkulturmediums und Waschen mit 1 x PBS (9.3.1) erfolgte eine Inkubation der Zellen mit Trypsin-EDTA (PAA, Paschingen, AT) für 8 Minuten bei 37°C im Begasungsbrutschrank Typ B16.

2. Die Trypsinierungsreaktion wurde mit einer definierten Menge Fetal bovine serum (FBS)-haltigem Zellkulturmedium (9.3.1) abgestoppt und die Zellen durch Hoch- und Herunterpipettieren weiter vereinzelt. 200 µl dieser Resuspension wurden zur Zellzählung mit 400 µl 0,36%igem Trypanblau (9.3.1) vermischt.
3. Zellzählung und Vitalitätstest: 20 µl der Zell-Trypanblau-Mischung wurde in eine Neubauer-Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) überführt und der Mittelwert der Zellen pro Eckquadrat bestimmt. Mit Hilfe der Formel $Zellzahl/ml = Mittelwert\ der\ Zellen\ pro\ Eckquadrat \times 10000 \times 3$ kann bei bekannter Menge der Resuspension die Gesamtzahl der Zellen bestimmt werden. Durch folgende Formel wurde der Anteil lebender Zellen bestimmt:
$$\% \text{ lebender (ungefärbter) Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \times 100$$
4. Der Rest der Resuspension wurde in ein 15 ml Falcon Tube überführt und bei 150 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen.
5. War die Gesamtzahl der Zellen bekannt, konnte das Zellpellet in einer vorher berechneten Menge Zellkulturmedium resuspendiert werden, um eine bestimmte Animpfkonzentration (Zellen/cm²) zu erzielen. In Tabelle 18 sind die Animpfkonzentrationen der Zellen in den jeweils verwendeten Zellkultursystemen dargestellt.

3.7.3 Einfrieren von Zellen

1. Zunächst wurden die konfluent gewachsenen Kulturen entsprechend den Punkten 1. – 4. unter 3.7.2 passagiert und die Gesamtzahl der Zellen bestimmt.
2. Die Resuspension der Zellen erfolgte zügig in Einfriermedium (9.3.1), die Zelldichte betrug mindestens $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml.
3. Je 1 ml der Resuspension wurde in Kryoröhrchen Nunc Cryo Tube™ Vials, 1,8 ml (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) überführt. Die Kryoröhrchen wurden zügig in einen mit Isopropylalkohol befüllten Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container (Thermo Fischer Scientific, Langenselbold) gestellt und über Nacht langsam auf -20°C abgekühlt.
4. Die Lagerung erfolgte in einem Kryocontainer mit -196°C kaltem Flüssigstickstoff.

3.7.4 Auftauen von Zellen

1. Die unter 3.7.3 beschriebenen Kryoröhrchen wurden zügig aus dem Flüssigstickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt.
2. Sobald die Zell-Einfriermedium-Mischung flüssig war, wurden sie in 8 ml 37°C warmem Zellkulturmedium (siehe unter 9.3.1) verdünnt und für 10 Minuten bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml neuem Zellkulturmedium resuspendiert.

3. 200 µl der Resuspension wurden für Zellzählung und Vitalitätstest entnommen (siehe 3.7.2), der Rest der Zellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche kultiviert.
4. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel (3.7.1), um die nicht angehefteten Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

3.7.5 DAPI-Test zum Nachweis von Mycoplasmen

Zum Nachweis einer Mycoplasmenkontamination der Zellkulturen wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen im Rahmen der Immunfluoreszenzuntersuchungen mit DAPI® gefärbt (3.9). Die Auswertung fand mit dem Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80i, der Kamera DS-Qi1Mc und der dazugehörigen Software NIS-Elements BR 3.10, SP3 (Nikon GmbH, Düsseldorf) statt. Das Mikroskop besitzt unter anderem einen DAPI Filter. Im Falle einer Mycoplasmenkontamination würde man neben den gefärbten Zellkernen eine „puderzuckerartige“ Hintergrundfärbung erkennen, die die Mycoplasmen-DNA darstellt.

3.8 GEWINNUNG VON UNTERSUCHUNGSMATERIAL

3.8.1 Material für Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

3.8.1.1 Vorbehandlung der Multitest-Objektträger und Deckgläschen

Um eine bessere Zellanhaftung zu erreichen, wurden Deckgläschen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und Multitest-Objektträger® (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) zunächst mit 10%igem Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) vorbehandelt (siehe 9.3.2). Dieser Schritt dient der Denaturierung von Proteinen, die eventuell an der Oberfläche vorhanden sein könnten. Anschließend wurden Objektträger und Deckgläschen 1 Stunde bei 160°C sterilisiert.

3.8.1.2 Aussäen der Zellen auf Multitest-Objektträgern und 24-Well Platten

Es wurden SDS-vorbehandelte **Multitest-Objektträger®** (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) mit 10 Kreisen á 6 mm Durchmesser verwendet, die wie unter 3.8.1.1 beschrieben vorbehandelt wurden.

Die Zellen wurden, wie unter 3.7.2 dargestellt, passagiert und mit einer Zelldichte von umgerechnet $7,1 \times 10^4$ Zellen/cm² auf Multitest-Objektträger ausgesät. Die Aussaatdichte entsprach somit 2×10^4 Zellen pro Well, die sich in 30 µl Zellkulturmedium befanden. Die Objektträger wurden in sterile Plastikpetrischalen gelegt und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach einer Anheftungszeit von ca. 24 Stunden bei nachfolgender PFA-Fixierung und ca. 48 Stunden bei Acetonfixierung wurden die Objektträger wie unter 3.9.1 beschrieben, mittels Aceton oder mit 4% PFA fixiert (siehe 3.9.1).

Die Aussaatdichte auf Deckgläschen in **24-Well-Platten** (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen) betrug $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm², was $2,85 \times 10^5$ Zellen pro Well entsprach. Die relativ hohe Aussaatdichte wurde gewählt, um sehr schnell einen konfluenten Zellmonolayer zu erhalten. Durch dieses Vorgehen sollte eine BDV-Ausbreitung, die überwiegend durch Teilung BDV-infizierter Zellen von staten geht, weitestgehend vermieden werden (3.13 und

3.14). Die 24- Well-Platten wurden bis zur Zellfixierung mit 4% PFA (3.9.1) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

3.8.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurde Tissue-Tec® O.C.T.™-Compound (OCT) eingebettetes Gehirnmateriale nicht infizierter Lewis-Ratten verwendet (3.2.2). Die Gewebe wurden in einem Kryotom (Frigocut 2700, Reichert-Jung GmbH, Nußloch) in 15 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Super Frost Plus® Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen. Das Material wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.8.3 Material für Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Zellpellets wurden wie bei LABITZKE (2011) beschrieben, aus 75 cm² Zellkulturflaschen, gewonnen.

3.8.4 RNA- und Proteinlysate für real-time PCR (qPCR) und Western Blot (WB)

Zur simultanen Isolation von RNA und Proteinlysaten aus einer Zellkulturprobe wurde das AllPrep RNA/Protein Kit® (Qiagen GmbH, Hilden) verwendet.

Als Material wurden pro untersuchtem Zeitpunkt (Tag 21, 28 und 42 p.i.), sowohl von nicht infizierten als auch von BDV-infizierten Astrozyten, konfluent gewachsene Monolayer von etwa $7,3 \times 10^5$ Zellen verwendet, die in 6-Well Platten kultiviert wurden. Alle Proben einer Versuchsreihe wurden zunächst mittels Lysispuffer lysiert, homogenisiert und bei -70°C asserviert. Anschließend erfolgte die gleichzeitige Protein- und RNA-Aufreinigung sämtlicher Proben. Als Positivkontrollen wurden Protein- und RNA- Lysate BDV-infizierter MDCK-Zellen und von zu 94% mit BDV-H24 (5/25/92) infizierten primäre Astrozyten gewonnen (3.3).

Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Abweichend davon wurde mit der Kultivierung der Zellen auf 6-Well Platte mehr Zellen als im Protokoll angegeben verwendet. Die Menge des Lysispuffers (Puffer APL) wurde entsprechend der höheren Zellmenge auf 400 µl verdoppelt. Die Säulchen, mit denen Proteine für eine anschließende Lektinfällung von Glykoproteinen (BDV-GP) gewonnen werden sollten, wurden mit Puffer GDK-1 (9.3.4) equilibriert. Die Proteinaufreinigungssäulchen für die Gewinnung von Proteinen für den β-Actin-, BDV-N- und BDV-M-Nachweis wurden mit Homogenisationspuffer (9.3.4) equilibriert. Wie vom Hersteller angegeben, können RNA-stabilisierende Komponenten des Lysispuffers Präzipitate mit SDS formen, deshalb wurde, sofort nach Aufreinigung der Proteine mittels des mitgelieferten Protein Cleanup Säulchens, eine zusätzliche Acetonaufreinigung der eluierten Totalproteine vorgenommen. Aufgereinigte Proteine, die einer Lektinfällung unterzogen werden sollten (3.10.1), wurden in Puffer GDK-1 (9.3.4) resuspendiert. Proteine, die ohne vorherige Lektinpräzipitation für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (3.11.2) und anschließend im Western-Blot benutzt werden sollten, wurden in Homogenisationspuffer (9.3.4) resuspendiert. Die Proteinproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° aufbewahrt.

Die aufgereinigte RNA wurde zur weiteren Verwendung in der spezifischen Reversen Transkription (RT) (3.12.2) bei -80°C aufbewahrt. Vor ihrem Einsatz in der real-time PCR wurde mittels photometrischer Messung die Extinktion der Nukleinsäuren bestimmt (3.12.1.2).

3.8.5 Zellkulturüberstand zum Nachweis von infektiösem BDV

Das Medium von BDV-infizierten Astrozyten wurde am Tag 27 p.i. gewonnen und bis zur weiteren Verwendung (3.13) bei -80°C eingefroren. Als Negativkontrolle wurde Medium gleichaltriger, nicht infizierter Astrozyten asserviert. Als Positivkontrolle diente die zur Infektion der Astrozyten verwendete, virushaltige Suspension (siehe unter 3.6.4), die nach Beendigung der Inkubation der Zellen ebenfalls bei -80°C eingefroren wurde.

3.9 INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ (IF)

Der Nachweis der Astrozytenreifungs- und Differenzierungsmarker sowie der Nachweis BDV-spezifischer Antigene erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz modifiziert nach KRUDEWIG (2006), WASIERI 2009 und Dianova (Immunologie: Fluoreszenz Topics. Ein Handbuch für Immunfluoreszenz). Für die jeweiligen Primär- und Sekundärantikörper wurden zunächst die geeigneten Verdünnungen und die Blockingseren getestet (LABITZKE, 2010).

3.9.1 Etablierung unterschiedlicher Fixierungsmethoden

Zunächst wurde für alle Antikörper eine Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) (9.3.2) gewählt. Für die BDV-spezifischen Antikörper wurde außerdem eine Acetonfixierung durchgeführt.

Fixierung mittels 4%igem Paraformaldehyd (PFA)

Zur Darstellung der Reifungs- und Differenzierungsantigene der Astrozyten, sowie dem Nachweis des BDV-N wurden die Zellen nach 5-minütigem Waschen mit 1 x PBS (9.3.1) mit frisch angesetztem 4%igem Paraformaldehyd (PFA) (9.3.2) für 25 Minuten fixiert. Die getrockneten Multitest-Objektträger oder Deckgläschen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Fixierung mittels Aceton

Zum Nachweis der BDV-Proteine BDV-N, BDV-M und BDV-GP wurden die Zellen nach jeweils 5-minütigem Waschen mit 1 x PBS und Aqua bidest. für 30 Minuten in eiskaltem Aceton bei -20°C fixiert. Die getrockneten Multitest-Objektträger wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.9.2 Seren und Antikörper

- Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper finden sich in Tabelle 3.

- Sekundäre Antikörper

Zur Darstellung der Primärantikörper wurden mit Cyanin-Fabstoffen gekoppelte Sekundärantikörper verwendet. Die verwendeten Sekundärantikörper finden sich in Tabelle 4.

- Blockingseren

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden Blockingseren aus der Spezies verwendet, aus der die jeweils verwendeten Sekundärantikörper stammten. Für einige Antikörper wurden abweichend davon andere Blockingseren benutzt, deren Verwendung und geeignete Verdünnung in Vorversuchen etabliert worden war (LABITZKE, 2010).

Tabelle 3: Primärantikörper für die Indirekte Immunfluoreszenz, deren Herkunft, Klonalität, Verdünnung und die verwendeten Positivkontrollen

Primärantikörper	Klonalität und Spezifität Hersteller	Lokalisation	Verdünnung Blocking	Positivkontrolle
Astrozytenreifung– und Differenzierung				
Kaninchen-anti-GFAP	polyklonal bovines GFAP (RM) DacoCytomation (Glostrup, Dänemark)	IZ	1:50 in 1% PBS-BSA 100% ZS	Gehirn Ratte 42 Tage
Maus-anti-Vimentin	monoklonal porzines Vimentin Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)	IZ	1:50 in 5% PBS-BSA 10% ZS	Gehirn Ratte 42 Tage
Kaninchen-anti-S100 β	polyklonal bovines S100 (Geh) DacoCytomation, (Glostrup, Dänemark)	IZ	1:100 in 1% PBS-BSA 100% ZS	Gehirn Ratte 42 Tage
Maus-anti-Nestin	monoklonal RM Rattenembryo Millipore GmbH (Schwallbach)	IZ	1:50 in 1% PBS-BSA 20% SS	Gehirn neonatale Ratte
Maus-anti-A2B5 ¹	monoklonal Retina embr. Hühner Millipore GmbH (Schwallbach)	OF	1:100 in 1% PBS-BSA 5% ZS	Gehirn Neonatale Ratte
Meerschweinchen-anti-GLAST	polyklonal Ratten GLAST Millipore GmbH (Schwallbach)	IZ	1:1000 in 1% PBS-BSA 100% ZS	Gehirn Ratte 42 Tage
Meerschweinchen-anti-GLT-1	polyklonal Ratten GLT-1 Millipore GmbH (Schwallbach)	IZ	1:500 in 1% PBS-BSA 100% ZS	Gehirn Ratte 42 Tage

MATERIAL UND METHODEN

Primärantikörper	Klonalität und Spezifität Hersteller	Lokalisation	Verdünnung Blocking	Positivkontrolle
BDV-Infektion				
Kaninchen-anti-BDV-Rattenserum	polyklonal Serum BDV-inf. Ratte (Herzog)	IZ/OF	1:50 in 1% PBS-BSA ohne Blocking	BDV-inf. MDCK-Zellen
Maus-anti-BDV-N Bo18	monoklonal 38/40 kD BDV-N (Herzog)	IZ	1:100 in 1% PBS-BSA 0,2% PBS-BSA	BDV-inf. MDCK-Zellen
Kaninchen-anti-BDV-M GA01/01	polyklonal 16 kD BDV-M (Garten)	IZ	1:400 in 1% PBS-BSA 0,2% PBS-BSA	BDV-inf. MDCK-Zellen
Kaninchen-anti-BDV-GP-C; α -gp2	polyklonal C-terminales Peptid (Garten)	OF IZ	1:400 in 1% PBS-BSA 0,2% PBS-BSA	BDV-inf. MDCK-Zellen

Lokalisation = Antigenlokalisation; IZ = intrazellulär; OF = Oberfläche der Zelle; PBS = *phosphate buffered saline*; BSA = bovines Serumalbumin; PBS-BSA = in 1 x PBS verdünntes BSA; Geh. = Gehirn; RM = Rückenmark; ZS = Ziegenserum; SS = Schweineserum; BDV-inf. = BDV-infiziert; GFAP = Saures Gliafaserprotein (*glia fibrillary acidic protein*); ¹:*neuron cell surface antigen (A2B5)*; GLAST = *glial glutamate aspartat transporter*; GLT-1 = *glial glutamate transporter*; BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-Ag = BDV-Antigen; BDV-M = BDV-Matrixprotein; BDV-GP-C = C-terminaler Abschnitt des BDV-Glykoproteins; die BDV spezifischen Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. Wolfgang Garten, Institut für Virologie, Philips-Universität Marburg und Frau Dr. Sibylle Herzog, Institut für Virologie, Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen zur Verfügung gestellt

Tabelle 4: Sekundärantikörper und DNA-Darstellung für die indirekte Immunfluoreszenz, ihre Verdünnung und ihr Absorptions- und Emissionsmaximum

Sekundärantikörper	Herkunft	Verdünnung	Abs _{Max}	Em _{Max}	Farbe
Cy™2 anti-Kaninchen IgG (H+L)*	Ziege	1:150 in 1 x PBS	492	510	grün
Cy™3 anti-Maus IgG (H+L)*	Ziege	1:100 in 1 x PBS	550	570	rot
Cy™2 anti-Meerschweinchen IgG (H+L)*	Ziege	1:150 in 1 x PBS	492	510	grün
Cy™3 anti-Ratte IgG (H+L)*	Ziege	1:400 in 1 x PBS	550	570	rot
DAPI		1:500 in 1 x PBS	358	461	blau

Cy = Cyanin-Fabstoffen gekoppelte Sekundärantikörper; *: Hersteller Dianova GmbH, Hamburg; IgG = Immunglobulin G; H = schwere (heavy) Polypeptidkette eines Immunglobulinmoleküls; L = leichte (light) Polypeptidkette eines Immunglobulinmoleküls; DAPI = DNA-interkalierender Farbstoff; Hersteller Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe; 1 x PBS = einfachkonzentrierte phosphatgepufferte Kochsalzlösung; Abs_{Max} = Absorptionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffs; Em_{Max} = Emissionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffs

3.9.3 Nachweis astrozytärer Reifungs- und Differenzierungsmarker

BDV-infizierte und nicht-infizierte primäre Astrozytenkulturen wurden in einer Kinetik auf ihre Reifungs- und Differenzierungsmarker hin untersucht (Tabelle 3) (AHLEMEYER et al., 2013). Die Untersuchungen fanden 7, 28 und 42 Tage nach Präparation der Zellen statt. In einer zweiten Präparation wurden sowohl bei BDV-infizierten als auch bei nicht infizierten Zellen die Zeitpunkte 28 und 42 nach Präparation untersucht. Die Antikörper wurden jeweils im Doppelansatz aufgetragen. Um die Zellreifung und -differenzierung zu einem sehr späten Zeitpunkt zu untersuchen, wurden exemplarisch 300 Tage alte Astrozyten getestet, die zudem für 1,5 Monate kryokonserviert waren.

Die Durchführung der Immunfluoreszenz fand wie bei AHLEMEYER et al. (2013) beschrieben statt. Abweichend davon war für den Antikörper A2B5 keine Permeabilisierung der Zellen mit TritonX-100 nötig. Die als Positivkontrollen verwendeten Gefrierschnitte wurden ab Schritt Nr. 4 in in einem Coverplate™-System (Thermo Fischer Scientific, Langenselbold) durchgeführt.

1. Zur Permeabilisierung der Zellen und Gefrierschnitte erfolgte eine Waschung mit 0,25% igem TritonX-100 für 20 Minuten bei 37°C in einer Standkuvette.
2. Zur Entfernung des Detergenz folgte eine Waschung mit 1 x PBS für 3 x 5 Minuten in einer neuen Standkuvette.
3. Nach Abtrocknen der Objektträger wurden die Vertiefungen der Multitest-Objektträger® mit einem Fettstift, DakoCytomation Pen (DakoCytomation GmbH, Hamburg) umrandet.
4. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden 25 µl Blockingserum (siehe Tabelle 3) pro Vertiefung der Multitest-Objektträger® und 100 µl pro Gefrierschnitt im Coverplate™-System eingesetzt und die Objektträger für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert.
5. Die Multitest-Objektträger® wurden in einer Standkuvette 3 x 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Bereiche zwischen den Löchern vorsichtig abgetrocknet. Die Waschung der Gefrierschnitte erfolgt in den Coverplate™-Systemen.
6. 25 µl (bzw. 100 µl für Gefrierschnitte) des in 1% PBS-BSA (1%ige Bovines Serumalbumin-Lösung in 1 x PBS) verdünnten Primärantikörpers wurden pro Vertiefung der Multitest-Objektträger® aufgetragen und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Verdünnungen der Primärantikörper finden sich in Tabelle 3.
7. Die Multitest-Objektträger® wurden in einer Standkuvette 3 x 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen, um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt.

8. Die Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper wurden wie in Tabelle 4 beschrieben in 1 x PBS verdünnt und pro Vertiefung 25 µl bzw. 100 µl pro Coverplate™-System aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Dunkeln.
9. Die Multitest-Objektträger® wurden in einer Standküvette 3 x 5 Minuten mit 1 x PBS gewaschen, um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Objektträger erneut in eine feuchte Kammer überführt.
10. Die DAPI®-Stammlösung (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) wurde vor Gebrauch 1:500 in 1 x PBS verdünnt. Die Gebrauchslösung wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.
11. Die Multitest-Objektträger® wurden in eine Standküvette überführt. Die Zellen und Schnitte wurden im Dunkeln 2 x 5 Minuten mit 1 x PBS und 1 x 5 Minuten mit Aqua bidest. gewaschen.
12. Nach 20 minütiger Trocknung im Dunkeln wurden die Objektträger luftblasenfrei mit Entellan in Toluol® (Merck, KGGA Darmstadt) eingedeckt.

3.9.4 Nachweis von BDV-N, BDV-M und BDV-GP

Die Expression und intrazelluläre Lokalisation von BDV-N, BDV-M und BDV-GP wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 (3.9.2) aufgeführt. Die Antikörper wurden jeweils im Doppelansatz aufgetragen. In einer ersten Präparation wurden die Zeitpunkte 14, 28 und 42 Tage nach Infektion (post infection, p.i.) untersucht. In weiteren Präparationen wurden die Tage 28 und 42 p.i. wiederholt.

Die Durchführung der Immunfluoreszenz fand wie unter 3.9.3 beschrieben statt. Abweichend davon wurde keine zusätzliche Permeabilisierung der Zellen mit TritonX-100 durchgeführt.

3.9.5 Nachweis astrozytärer Reifungs- und Differenzierungsmarker und BDV-N auf 24-Well Platten

Die Expression der Astrozytenreifungsmarker bei lange nicht passagierten Zellen (3.9.3), die Testung der Infektiosität des Zellkulturüberstandes (3.13) und Untersuchung der Rolle des Glykoproteins bei der glia-glialen BDV-Ausbreitung (3.14) wurde bei Astrozyten in 24-Well Platten (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen) durchgeführt. Die indirekte Immunfluoreszenz wurde wie unter 3.9.4 angegeben durchgeführt. Abweichend davon erfolgte die gesamte Prozedur in einer 24-Well Platte. Es wurden jeweils 500 µl 1 x PBS und 0,25% Triton-X für Waschschrte bzw. zur Permeabilisierung verwendet. Die Mengen des Blockingserums, der Primär- und Sekundärantikörperverdünnung sowie der DAPI-Gebrauchslösung betragen jeweils 200µl.

3.9.6 Kontrollen der indirekten Immunfluoreszenz

Als Positivkontrolle für den Nachweis der **Reifungs- und Differenzierungsantikörper** wurden Gehirnschnitte neonataler und adulter Lewis-Ratten verwendet (3.2.2 und 3.8.2). Als Negativkontrolle wurde statt den Primärantikörpern 1% PBS-BSA inkubiert.

Die Spezifität der Immunfluoreszenz-Reaktion zum Nachweis der **BDV-spezifischen Antigene** wurde durch Inkubation der Antikörper auf nicht infizierten, gleichaltrigen Zellen aus derselben Präparation überprüft. Zusätzlich wurden die jeweils verwendeten Sekundärantikörper ohne vorherige Inkubation der Primärantikörper verwendet. Als Positivkontrolle dienten permanent BDV-infizierten MDCK-Zellen und zu 94% mit BDV infizierte, langzeitkultivierte Astrozyten (3.3).

Die indirekte Immunfluoreszenz zur **Testung der Zellkulturinfektiosität** wurde gleichzeitig mit der Untersuchung der glia-glialen BDV-Ausbreitung (siehe unter 3.14) durchgeführt, bei der durch IF die BDV-N Expression nachgewiesen wurde. Dieser BDV-N Nachweis wurde für die IF Untersuchung der mit Überstand inkubierten Zellen als Positivkontrolle benutzt.

Um sicherzustellen, dass eine mechanische Reizung durch die erst kurz zurückliegende Passage der Zellen auf die Multitest-Objektträger® (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) nicht zu einer Aktivierung oder Dedifferenzierung der Zellen und möglicherweise veränderter Markerexpression geführt haben könnte (YANG et al., 2009; PUSCHMANN et al., 2010; YANG et al., 2010), wurde die Expression der Antigene außerdem bei Astrozyten in Multiwell-Platten überprüft. Diese Zellen wurden 21 Tage vor Fixierung auf die Multiwell-Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Fixierung waren sie 52 Tage alt (AHLEMEYER et al., 2013). Das Immunfluoreszenzprotokoll ist unter 3.9.5 beschrieben.

Zur Untersuchung der Spezifität der Reifungs- und Differenzierungsantikörper wurden zusätzlich zu den oben genannten Kontrollen die Expression von GFAP, Vimentin, Nestin und β -Actin mittels Western Blot überprüft. Die Intensität der Banden (Integrated Density) wurde semi-quantitativ mit dem Programm QuantityOne® (Bio-Rad, Echingen) durchgeführt. Als weitere Kontrolle wurde die relative mRNA-Expression von GFAP, Vimentin und Nestin bestimmt, indem die Zielgene gemäß der Methode von PFAFFL (2001) gegen ein Referenzgen (Rn18S) normalisiert wurden. Die Untersuchungen wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer, Institut für Human-Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt (AHLEMEYER et al., 2013).

3.9.7 Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz

Die Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz fand mit dem Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80i, der Kamera DS-Qi1Mc und der dazugehörigen Software NIS-Elements BR 3.10, SP3 (Nikon GmbH, Düsseldorf) statt. Das Mikroskop erlaubt durch seine Multikanal-Aufzeichnungsfunktion die aufeinanderfolgende Aufnahme der unterschiedlichen Fluoreszenzkanäle (siehe Tabelle 4).

Pro Well eines Multitest-Objektträgers® beziehungsweise pro Deckgläschen einer 24 Well Platte wurden mindestens 3 Aufnahmen mit einem 20er Objektiv aus willkürlich

ausgewählten Lokalisationen gemacht. Die Zellzahl sollte etwa zwischen 80 und 300 Zellen liegen. Die Zelldichte wurde vor Anfertigung eines Fluoreszenzfotos anhand der Menge der DAPI gefärbten Zellkerne abgeschätzt. Insgesamt wurden pro Loch eines Multitest-Objektträgers bzw. pro Deckgläschen mindestens 300 Zellen ausgewertet. D.h. durch Doppelansatz wurden mindestens 600 Zellen pro Antikörper untersucht.

Zunächst wurden die **Reifungs- und Differenzierungsantikörper** BDV-infizierter und nicht infizierter Kulturen auf Multitest®-Objektträgern untersucht. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ. Die Auswertung der Reifungs- und Differenzierungsantikörper in 24 Well Platten erfolgte ebenfalls semiquantitativ. Die semiquantitative Auswertung wurde exemplarisch durch quantitative Auszählung positiver Zellen einer Versuchsreihe überprüft.

Der Nachweis der **BDV-spezifischen Antigene** BDV-N, BDV-M und BDV-GP fand ebenfalls in zwei unabhängigen Präparationen statt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ.

Für eine semiquantitative Auswertung der Zellen wurde die Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld bei Aufnahme mit einem 20er Objektiv beurteilt. Die Stärke der Fluoreszenzreaktion wurde nicht bewertet.

Der Nachweis der Antigene wurde bei 200-facher Vergrößerung wie folgt bewertet:

- 0 = keine Reaktion
- 1 = < 30% positive Zellen
- 2 = < 80% positive Zellen
- 3 = > 80% positive Zellen

Schließlich wurde der arithmetische Mittelwert aus den Gesichtsfeldern gebildet. Es wurden auch Übergänge (z.B. 0,5 oder 1,5) angegeben.

Für Testung der **Infektiosität des Zellkulturüberstandes** und **Untersuchung der Rolle des Glykoproteins bei der glia-glialen BDV-Ausbreitung** wurde die Zahl der BDV-N positiven Astrozyten quantitativ bestimmt. Für die quantitative Auswertung wurde die Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld bei Aufnahme mit einem 20er Objektiv mit Hilfe der Taxonomiefunktion der Software NIS-Elements BR 3.10, SP3 gezählt und der arithmetische Mittelwert aus allen ausgezählten Gesichtsfeldern gebildet.

3.10 WESTERN BLOT (WB)

Mittels Western Blot wurde die Expression von BDV- N, BDV-M und BDV-GP zu den Zeitpunkten 21, 28 und 42 p.i. in primären Astrozytenkulturen untersucht.

Für die Untersuchung wurde Material aus zwei unabhängigen Zellkulturpräparationen verwendet. Eine Übersicht über die verwendeten Proben gibt Tabelle 22. Da für den Glykoproteinnachweis zunächst eine Lektinfällung nötig war (siehe 3.10.1) wurde BDV-GP nicht aus denselben Proteinproben wie BDV-N und BDV-M nachgewiesen (siehe 3.8.4).

3.10.1 Lektinpräzipitation

Wie aus Voruntersuchungen an BDV-infizierten MDCK-Zellen bekannt, war eine Detektion des BDV-Glykoproteins mittels Western Blot nur nach vorheriger Anreicherung des Proteins mittels Lektinpräzipitation möglich (BAYER, 2010).

Für die Lektinpräzipitation wurde Con A Sepharose™ 4B (GE Healthcare, Life Science, Uppsala, Schweden), wie bei BAYER (2010) und LABITZKE (2011) beschrieben, verwendet. Concavalin A ist hier an Sepharose 4B gekoppelt.

1. Waschen der in Ethanol gelagerte Con-A-Sepharose 2 x in Puffer GDK-1 (9.3.4): pro Proteinprobe wurde 50 µl gut durchmischte Con-A-Sepharose in ein Eppendorfgefäß überführt, bei 4500 g für 2 Minuten zentrifugiert, der Ethanol-Überstand abgenommen und durch ein gleiches Volumen GDK-1 Puffer ersetzt (9.3.4). Nach Durchmischen wurden die Proben erneut für 2 Minuten bei 4500 g zentrifugiert. Der Waschschrift wurde 1 x wiederholt und die Con-A-Sepharose nach Abnehmen des Überstandes erneut mit der ursprünglich hinzugefügten Menge GDK-1 Puffer versetzt.
2. Den Proteinproben (3.8.4) wurde je 50 µl gewaschene Con-A-Sepharose™ zugesetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, um die Bindung der Glykoproteine an die Con-A-Sepharose-Kugeln zu ermöglichen.
3. Die Proben wurden 2 x mit je 1 ml Puffer GDK-1 (9.3.4) und 1 x mit 1 x PBS (9.3.1) gewaschen. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben bei 4500 x g für 2 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen.
4. Nach Zugabe von je 16 µl 5 x SDS Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol (9.3.4) wurden die Proben bei 95°C für 10 Minuten erhitzt.
5. Nach Zentrifugation bei 16000 x g für 10 Minuten (Zentrifuge C5415, Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf) wurde der Überstand mit den nun von der Con-A-Sepharose gelösten Glykoproteinen abgenommen und bis zur weiteren Verwendung im Western Blot bei -20°C lagern.

3.10.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bradfordbestimmung diente der Bestimmung der Gesamtproteinmenge. Sie wurde für den BDV-N und BDV-M Nachweis vorgenommen und war durch die vorangegangene Lektinfällung für den BDV-GP Nachweis nicht möglich.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde mittels Bradford Reagent (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1. Die Proteinproben wurden auf eine Konzentration von 20 µg Gesamtprotein unter Verwendung von 5 x SDS Probenpuffer (9.3.4) eingestellt und bei 95°C für 8 Minuten erhitzt.
2. Die Proben wurden nach kurzem Abkühlen vorsichtig in die Geltaschen eines 12%igen Polyacrylamidgels pipettiert (9.3.4). Als Proteinmarker wurde je Gel 5 µl des Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in eine Tasche aufgetragen.
3. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V (konstant), 120 mA (pro Gel 60 mA) in einer Mini-PROTEAN® II™ Kammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) unter Zuhilfenahme der Stromquelle PowerN PAC 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) für 60 Minuten in 1 x Laufpuffer (9.3.4).

3.10.4 Transfer von Proteinen auf eine Blottingmembran (Western Blot)

Der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF, Immobilon P; Millipore, Schwalbach) oder Nitrozellulosemembran (Protran® Nitrozellulose Transfer Membran; Whatman GmbH, Dassel) erfolgte durch Elektroblotting.

Für BDV-N gelang der Nachweis auf PVDF-Membranen. Bei Verwendung der Antikörper gegen BDV-M und BDV-GP wurden zur Detektion Nitrozellulosemembranen verwendet, um Hintergrundreaktionen zu minimieren.

1. Nach Anfeuchten der Spezialfilterpapiere (Whatman Gel-Blotting-Papier GB003; Schleicher & Schnell, Dassel) und der Blottingmembranen in Transferpuffer wurde das Trenngel für 30 Sekunden im jeweils verwendeten Transferpuffer equilibriert.
2. PVDF-Membranen wurden kurz in 70% Ethanol eingeweicht, mit Aqua bidest. gespült und in 1 x NuPAGE® Transfer Buffer (9.3.4) überführt.
3. Nitrozellulose-Membranen wurden direkt in Transferpuffer „Marburg“ (9.3.4) überführt.
4. Angefeuchtetes Spezialfilterpapier, Blottingmembran, Trenngel und ein weiteres Spezialfilterpapier wurde luftblasenfrei auf die ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtete Platin-Anode einer Transblot® SD Semi-dry Transferkammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) gelegt.
5. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 180 mA (konstant) und 15 V für 55 Minuten im Halbtrockenverfahren nach KYHSE-ANDERSEN (1984). Die erforderliche Stromstärke errechnete sich aus der Größe der Gele. Als Faustregel wird $1,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel angenommen.

3.10.5 Immunodetektion von Proteinen auf Blottingmembranen

Zur Detektion der Proteine wurden spezifische Primärantikörper verwendet, die mittels alkalischer Phosphatase-konjugierter Sekundärantikörpern indirekt nachgewiesen werden können. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Auflistung der Antikörper für den Western Blot, ihre Klonalität und Spezifität, erwartete Bandengröße und Verdünnung

Antikörper	Klonalität und Spezifität Herkunft	Verdünnung	erwartete Bandengröße	Membran
Primärantikörper				
Maus-anti-BDV-N Bo-18	monoklonal 38/40 kDa BDV-N (Garten)	1:1000 ¹	38 / 40 kDa	PVDF NZ
Kaninchen-anti-BDV-M 128	polyklonal BDV-M Protein (AS 128-142) (Garten)	1:3000 ¹	16 kDa	NZ
Kaninchen-anti- α gp2	polyklonal BDV-GP-C (AS 287-302) (Garten)	1:1000 ¹	43 kDa (C-term.) 84/94 kDa (ges.)	NZ
Maus-anti- β -Actin	monoklonal β -Isoform des Actins (N-terminal) Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	1:4000 ¹	42 kDa	PVDF NZ
Maus-anti-GFAP	monoklonal gereinigtes porzines GFAP (RM) Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	1:500 ¹	50 kDa	PVDF NZ
Sekundärantikörper				
Ziege-anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert	Aufgereinigtes Kaninchen IgG Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	1:20000 in TBST		PVDF NZ
Ziege-anti-Maus IgG, AP-konjugiert	Aufgereinigtes Maus IgG Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen	1:20000 in TBST		PVDF NZ

BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-M = BDV-Matrixprotein, BDV-GP-C = C-terminaler Abschnitt des BDV-Glykoproteins; (Garten): die BDV spezifischen Antikörper wurden freundlicherweise von Prof. W. Garten, Institut für Virologie, Philips-Universität Marburg zur Verfügung gestellt; AS = Aminosäure, N-terminal = N-terminaler Abschnitt des Proteins, IgG = Immunglobulin G, ¹Verdünnung Primär-Antikörper in 5% Magermilchpulver in TBST (siehe 9.3.4); Membran = zur Detektion verwendete Blottingmembran; PVDF = Polyvinylidenfluorid; NZ = Nitrozellulose

3.10.5.1 Immunodetektion auf PVDF-Membranen

1. Die Membran wurde für ca. 5 Minuten getrocknet und dann beschriftet. Die Laufspur mit dem Proteinmarker Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) wurde abgeschnitten und über Nacht dunkel und trocken aufbewahrt.
2. Nach kurzem Einweichen der PVDF-Membran in 70% Ethanol und in Aqua bidest., erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde in 10 % Magermilchpulver in TBST (9.3.4) auf einem Rüttler.
3. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte verdünnt in 5 % Magermilchpulver in TBST (9.3.4) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.
4. Nach Waschen in kühl-schrankkaltem TBST (9.3.4) für 3 x 10 Minuten, wurde der Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert.
5. Die Membranstreifen mit dem Proteinmarker wurden nach kurzem Spülen in 70% Ethanol und Aqua bidest. in 1:7500 verdünntem Precision Protein™ StrepTactin AP Conjugate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in TBST ebenfalls für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert.
6. Alle Membranen wurden abschließend für 2 x 10 Minuten in TBST (9.3.4) und 10 Minuten in TBS gewaschen (9.3.4).

3.10.5.2 Immunodetektion auf Nitrozellulose-Membranen

Abweichend zur Behandlung der PVDF Membran darf die Nitrozellulosemembran keinesfalls austrocknen.

1. Die Membranstreifen mit Proteinmarker Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) wurden abtrennt und über Nacht bei 4°C in 10% Magermilchpulver in TBST (9.3.4) gelagert.
2. Die Sichtbarmachung der Laufspuren auf der restlichen Membran erfolgte für 5 Minuten in Ponceau S-Lösung (9.3.4) auf dem Rüttler.
3. Nach Beschriften der Laufspuren und Schneiden der Membran, erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen in 10 % Magermilchpulver in TBST (9.3.4) für 1 Stunde auf einem Rüttler.
4. Die Inkubation der Primär- und Sekundärantikörper entsprachen den Punkten 3. und 4. unter (3.10.5.1).
5. Die Membranstreifen mit dem Proteinmarker wurden 10 Minuten in kühl-schrankkaltem TBST (9.3.4) gewaschen und anschließend in 1:7500 verdünntem Precision Protein™ StrepTactin AP Conjugate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) in 1 x TBST für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler inkubiert.

6. Alle Membranen wurden für 2 x 10 Minuten in TBST (9.3.4) und 10 Minuten in TBS gewaschen (9.3.4).

3.10.6 Chemilumineszenzdetektion

Bei der Chemilumineszenzdetektion handelt es sich um einen Prozess, bei dem die an den Sekundärantikörper gebundene Alkalische Phosphatase (AP) mit einem Chemilumineszenz-Substrat reagiert. Dieses emittiert ein Lichtsignal, das auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann. Die Nachweisgrenze liegt bei 10 pg Protein.

1. Die Inkubation der Nitrozellulosemembran erfolgte für 5 Minuten in 10 ml Immun-Star AP Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) und 500 µl Enhancer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Die PVDF-Membran wurde ohne Zugabe des Enhancers im Immun-Star AP Substrate inkubiert.
2. Die Membranstreifen mit den aufgetrennten Proteinen und die Membran mit dem Proteinmarker wurden luftblasenfrei zwischen zwei Overheadfolien in eine Röntgenkassette eingelegt.
3. Ein Kodak BioMax® MR Film (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) wurde in einer Dunkelkammer auf die Membran gelegt und für 10 - 30 Sekunden belichtet.
4. Die Filme wurden für 10 – 30 Sekunden unter Sichtkontrolle in der Entwicklerlösung Kodak Dental Readymix Developer (Pluradent AG & Co KG, Offenbach) inkubiert, in Leitungswasser geschwenkt und anschließend 10 Minuten in der Fixierlösung Dental Readymix Fixer (Pluradent AG & Co KG, Offenbach) fixiert. Abschließend wurde der Film nochmals kurz in Leitungswasser geschwenkt, mit Aqua bidest. ab gespült und zum Trocknen aufgehängt.

3.10.7 Kontrollen des Western Blots

Als Positivkontrollen für den Nachweis von BDV-N, BDV-M und BDV-GP dienten Proteinlysate aus permanent mit BDV-infizierten MDCK-Zellen (3.3). Um die Frage zu beantworten, ob Astrozyten das BDV-Glykoprotein überhaupt synthetisieren, wurden außerdem Proteinlysate langzeitkultivierter, zu 94% BDV-infizierter Astrozyten (3.3) getestet.

Als Negativkontrolle wurden Proteinlysate aus nicht infizierten primären Astrozytenkulturen verwendet, die jeweils zu den gleichen Testzeitpunkten gewonnen wurden wie die infizierten Proben.

3.11 IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (ISH)

In der ISH wurde mit Hilfe von Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Sonden BDV-spezifische RNAs nachgewiesen. Verwendet wurden negativ orientierte (-ss) RNA-Sonden, die vorwiegend positiv orientierte mRNAs (+ss) detektieren, die für die Virusproteine BDV-N, BDV-M und BDV-GP kodieren. Die Detektion der BDV-N +ssRNA diente als Referenz für die virale Transkriptionseffizienz (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). BDV-N +ssRNA

(BDV-N mRNA) kodiert ausschließlich für BDV-N (BRIESE et al., 1994; SCHNEEMANN et al., 1994; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997; KOBAYASHI et al., 1998; HERDEN, 2009). Die primären, unreifen Transkripte der dritten Transkriptionseinheit werden dagegen durch alternatives Spleißen der enthaltenen Introns modifiziert, um die Expression von BDV-M, BDV-GP und BDV-L zu regulieren (CUBITT et al., 1994b; DE LA TORRE, 1994; SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1994b; JEHLE et al., 2000; TOMONAGA et al., 2000; DE LA TORRE, 2002b; TOMONAGA et al., 2002; SCHNEIDER, 2005). Durch ISH kann lediglich der jeweils intronhaltige RNA-Abschnitt detektiert werden. Über den genauen Spleißzustand der jeweiligen mRNA kann keine Aussage getroffen werden. So kodiert BDV-Intron I haltige +ssRNA mit und ohne zusätzlich enthaltenem BDV-Intron II für BDV-M. BDV-Intron II haltige +ssRNA kodiert jedoch nur bei effizientem Spleißen von BDV-Intron I für BDV-GP. Die Sonden für BDV-Intron II +ssRNA weisen somit sowohl die für BDV-GP kodierenden mRNAs als auch unreife, Intron I-haltige RNAs nach. Dies gilt auch für den Nachweis der BDV-Intron I +ssRNA (HERDEN, 2009). Der Übersicht halber wird in der vorliegenden Arbeit trotzdem der Begriff „BDV-M mRNA“ für BDV-Intron I haltige +ssRNA und „BDV-GP mRNA“ für BDV-Intron II haltige +ssRNA verwendet.

Aus dem BDV-Intron II-Bereich wurde der für den C-terminalen Abschnitt kodierende Bereich verwendet. Der C-terminale BDV-GP-Genanteil entsprach dabei dem translatierten Peptidabschnitt der für die Herstellung des Anti-BDV-GP-Antikörpers (3.9.2 und 3.9.4) verwendet wurde (HERDEN, 2009). Für BDV-N wurde außerdem die genomische, negativ orientierte -ssRNA dargestellt.

Der Nachweis der Sonden erfolgte mittels gegen Digoxigenin (DIG) gerichtete Antikörper, die an eine alkalische Phosphatase gekoppelt sind (LABITZKE, 2011). Durch diese wurde eine HNPP (2-hydroxy-3-Naphthoesäure-2'-Phenylanilidphosphat)/ Fast Red TR (4-Chloro-2-Methylbenzen-diazonium-Hemizink-Chloridsalz) Farbreaktion katalysiert (HNPP *fluorescent Detection Set*, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Dabei wurde das HNPP zu HNP dephosphoryliert und lagerte sich zusammen mit dem Fast Red TR als fluoreszierendes Präzipitat ab. Der Farbkomplex wird mit einer Wellenlänge von 553 nm angeregt und fluoresziert im orange-roten Bereich zwischen 565 und 620 nm mit einem Maximum bei 584 nm (Fluoreszenz In-situ-Hybridisierung, FISH).

Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 6 aufgeführt.

3.11.1 Sondenherstellung

Die Herstellung der DIG-RNA-Sonden erfolgte gemäß den Protokollen von GRÖTERS et al. (2005) und LABITZKE (2011). Die für die *in vitro*-Transkription benötigte BDV-spezifische DNA wurde in einer PCR vervielfältigt. Als Matrize für die Herstellung dienten Plasmide mit den entsprechenden Inserts (siehe Tabelle 6). Die Plasmide basieren auf dem Vektor pCR[®]4-TOPO[®] (Life Technologies GmbH, Darmstadt), welcher die BDV-spezifischen Sequenzen enthält (WERNER-KEIŠŠ, 2006; POROMBKA, 2006). Nach Aufreinigung der DNA erfolgte die *in vitro*-Transkription unter Verwendung des DIG RNA Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim) sowie der entsprechenden T7 oder T3 DNA-abhängigen RNA-Polymerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Die Sonden standen bereits zur Verfügung.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten ISH-Sonden, ihre Orientierung und Größe und die für die Herstellung verwendeten Plasmide

Sonde	Orientierung	Plasmid-ID	Sondengröße	erkennt
BDV-N s	sense	Plasmid III BDV-N outer	342 nt	-ssRNA (vRNA)
BDV-N as	antisense			+ssRNA (mRNA)
BDV-GP-C as	antisense	Plasmid III BDV-GP-C	484 nt	+ssRNA (mRNA)
BDV Intron I neu as	antisense	Plasmid V Intron I-NEU	88 nt	+ssRNA (mRNA)

ISH: In-situ-Hybridisierung; Sonden = interne Bezeichnung der ISH-Sonden; Orientierung = Polarität der Sonde; -ssRNA = negativ orientierte RNA (antisense Polarität); +ssRNA = positiv orientierte RNA (sense Polarität); Plasmid-ID = interne Bezeichnung des Plasmids; vRNA = virale RNA (genomische RNA); mRNA = messenger RNA; BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-GP-C = C-terminaler Abschnitt des BDV-Glykoproteins; BDV Intron I = Intron I haltige mRNA, für BDV-M kodierend; nt = Nukleotide;

3.11.2 Durchführung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

Material: Für die FISH zum Nachweis BDV-spezifischer +ssRNA und der -ssBDV-N-RNA, wurden Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete (FFPE) Zellpellets (3.8.3) von BDV-infizierten primären Astrozytenkulturen vom Tag 28 und 42 p.i. verwendet. Es wurde Material aus zwei unabhängigen Zellkulturpräparationen verwendet. Als Negativkontrollen dienten FFPE-Zellpellets von nicht infizierten primären Astrozytenkulturen.

Die FISH wurde mit den in Tabelle 6 (3.11.1) aufgelisteten Sonden durchgeführt (ZURBRIGGEN et al., 1993; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; LABITZKE, 2011). Falls nicht anders angegeben, erfolgten die Inkubationsschritte bei Raumtemperatur.

1. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol für 3 x 5 Minuten. Anschließend in Isopropanol, 96%iger Ethanol und 70%iger Ethanol für jeweils 5 Minuten inkubieren.
2. Waschen mit DEPC-Aqua bidest. (9.3.3) für 5 Minuten und 1 Minute. Anschließend Inkubation in 1 x PBS (9.3.1) für 5 Minuten.
3. Aufschluss der Zellmembranen durch Inkubation mit 0,2M HCl (9.3.3) für 20 Minuten.
4. Waschen mit 2x SSC + 5mM EDTA (9.3.3) bei 50°C für 2 x 30 Minuten.
5. Proteolytische Behandlung des Gewebes mit 0,5 µg/ml Proteinase K-Lösung (9.3.3) für 15 Minuten bei 37°C.
6. Abstoppen der enzymatische Reaktion durch Zugabe von 0,2%igem Glycin-PBS (9.3.3) für 5 Minuten.
7. Nachfixieren der Schnitte in 4%PFA (9.3.2) für 4 Minuten.
8. Waschen in 1 x PBS (9.3.1) 2 x 1 Minute, dann Inkubation in 1 x PBS + 5mM MgCl₂ für 15 Minuten.

9. Acetylierung in 0,25% Acetanhydrid in 0,1 M Triethanolamin, pH 7,5 (9.3.3) für 10 Minuten.
10. 2 x 1 Minute in 1 x PBS waschen, dann für 15 Minuten in 1 x PBS inkubieren (9.3.1).
11. Prähybridisierung der Schnitte mit Prähybridisierungsmix (PHB-Mix, 9.3.3) für mindestens 1 Stunde bei 52°C.
12. Hybridisierung über Nacht bei 52°C in einer feuchten Kammer mit Hybridisierungsmix (HB-Mix, 9.3.3). Schnitte mit 35 µl HB-Mix überschichtet, mit Gel-bond®-Film bedecken und sorgfältig mit Fix-o-gum® abgedichten. Menge der RNA-Sonde pro 100 µl HB-Mix für alle eingesetzten Sonden: 5 µl.
13. Entfernen des Gel-bond® Films und Fix-o-gums®, danach Posthybridisierungswaschung mit 6 x SSC + 45% Formamid (9.3.3) für 2 x 15 Minuten bei 42°C. Im Anschluss 2 x 5 Minuten in 2 x SSC (9.3.3) waschen.
14. Verdau nicht gebundener RNA-Sonden durch Inkubation mit RNase-Lösung (9.3.3) für 30 Minuten bei 37°C.
15. 2 x 5 Minuten mit 2 x SSC (9.3.3) bei Raumtemperatur und 2 x 15 Minuten mit 0,2 x SSC (9.3.3) bei 50°C waschen.
16. Waschen der Schnitte für 1 Minute in Puffer 1 (9.3.3).
17. Inkubation für 30 Minuten in Puffer 2 (Blockingpuffer) (9.3.3).
18. Abtrocknung der Objektträger, Erneuern der Umrandung der Schnitte mit einem Fettstift (DAKO-Pen®, DAKO Cytomation, Hamburg). Auftragen von 300 µl Anti-DIG-Antikörper-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und Inkubation für 2 Stunden in einer feuchten Kammer.
19. 3 x 10 Minuten in Puffer 3 (9.3.3) und 2 x 10 Minuten in Puffer 4 (9.3.3) waschen.
20. HNPP/Fast Red TR Mix (9.3.3) frisch ansetzen. Pro Schnitt 100 µl der Farblösung auftragen und im Dunkeln für 30 Minuten inkubieren. Inkubation 2 x wiederholen. Zwischen den einzelnen Inkubationsintervallen Waschen der Pellets jeweils für 5 Minuten in Puffer 3. Abstoppen der Färbereaktion durch Waschen in Aqua bidest. für 10 Minuten.
21. Kernfärbung mit DAPI® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe): Nach zweimaligem Waschen mit 1 x PBS (9.3.1) Schnitte für 10 Minuten im Dunkeln mit je 300 µl einer 1:500 in PBS verdünnten DAPI®-Lösung (9.3.2) inkubieren.
22. Waschen der Schnitte für 2 x 5 Minuten in 1 x PBS (9.3.1) und 1 x 5 Minuten in Aqua bidest.. Trocknung für ca. 20 Minuten. Die Schritte erfolgen im Dunkeln.
23. Eindecken der Schnitte von Hand mit Entellan in Toluol® (Merck KGaA, Darmstadt) und Deckglas.
24. Lagerung der Schnitte im Dunkeln bei 4°C.

3.11.3 Kontrollen der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung

Als Negativkontrollen dienten Zellpellets von nicht infizierten primären Astrozyten, die parallel zu den infizierten Zellpellets gewonnen und mit den jeweiligen DIG-RNA-Sonden inkubiert wurden.

Zum Nachweis der Spezifität der Reaktion wurde von jedem Zellpellet ein Schnitt ohne Zusatz einer DIG-RNA-Sonde nur mit HB-Mix inkubiert.

Als Positivkontrolle wurden Zellpellets BDV-infizierter MDCK-Zellen verwendet. Um eine unspezifische Bindungsreaktion der Sonden an den MDCK-Zellen auszuschließen wurden zusätzlich zu den BDV-infizierten Positivkontrollen die Sonden auch auf nicht infizierten MDCK Pellets inkubiert. Als Referenz für die virale Transkriptionseffizienz wurde BDV-N +ssRNA nachgewiesen. Der Nachweis von BDV-N –ssRNA (genomischer RNA) diene als weitere Kontrolle.

3.11.4 Auswertung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung

Die Auswertung der FISH wurde analog zur Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz mit dem Fluoreszenzmikroskop Eclipse 80i, der Kamera DS-Qi1Mc und der dazugehörigen Software NIS-Elements BR 3.10, SP3 (Nikon GmbH, Düsseldorf) in der Multikanal-Aufzeichnungsfunktion durchgeführt.

Rote Reaktionsprodukte, die sich in einer Ebene mit den Zellen befanden und in den nicht infizierten Zellpellets nicht vorhanden waren, wurden als positive und spezifische Reaktion gewertet (POROMBKA, 2006; LABITZKE, 2011).

Intranukleäre Präzipitate: Die Signale stellten sich als rundliche Granula dar, die einzeln oder mehrfach im Zellkern vorhanden waren.

Intrazytoplasmatische Präzipitate: Es fanden sich sowohl diffuse Zytoplasmaanfärbungen als auch granuläre Präzipitate.

Zur semiquantitativen Auswertung wurden mindestens 3 Aufnahmen mit einem 20er Objektiv aus zufällig ausgewählten Lokalisationen gemacht. Für eine semiquantitative Auswertung der Zellen wurde die Anzahl positiver Zellen pro Gesichtsfeld bei Aufnahme mit einem 20er Objektiv beurteilt. Die Stärke der Fluoreszenzreaktion wurde nicht bewertet.

Der Nachweis der RNAs wurde bei 200-facher Vergrößerung wie folgt bewertet:

0	keine Reaktion
1	< 30% positive Zellen
2	< 80% positive Zellen
3	> 80% positive Zellen

Schließlich wurde der arithmetische Mittelwert aus den Gesichtsfeldern gebildet. Es wurden auch Übergänge (z.B. 0,5 oder 1,5) angegeben.

3.12 REAL-TIME PCR (qPCR, quantitative PCR)

Die real-time PCR diente der Quantifizierung von für BDV-N, BDV-M und BDV-GP kodierenden m-RNAs in den BDV-infizierten primären Astrozytenkulturen 21, 28 und 42 Tage p.i..

Die real-time PCR wurde als two-step-PCR durchgeführt (POROMBKA, 2006; POROMBKA et al., 2008a; POROMBKA et al., 2008b).

Für die Quantifizierung wurde die Amplifikation der Zielsequenz einer unbekannt Probe mit einer Standardkurve mit bekannter Konzentration derselben Zielsequenz (homologer Standard) verglichen. Die Herstellung der Standardverdünnungsreihen erfolgte in Anlehnung an das von POROMBKA (2006) etablierte Protokoll. Es wurden logarithmisch verdünnte DNA-Mengenstandards in den Verdünnungsstufen 10^9 – 10^1 DNA-Kopien/10 µl hergestellt.

3.12.1 Herstellung der Standardverdünnungsreihen

Zur Herstellung der Standardverdünnungsreihen für die für BDV-N, BDV-M BDV-GP-C kodierenden Gene sowie der mRNAs der Housekeeping-Gene GAPDH, SDHS und HPRT standen Plasmide mit den entsprechenden Inserts zur Verfügung. (Tabelle 7) (POROMBKA, 2006). Die Plasmide wurden mittels TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Life Technologies GmbH, Darmstadt) hergestellt und mittels One Shot® TOP10 Chemically Competent-E.coli-Bakterien vermehrt (POROMBKA, 2006).

Tabelle 7: Plasmide zur Herstellung von Standardverdünnungsreihen

Zielsequenz	Plasmid-ID	Insertgröße M13R–M13F	Referenz Acc.-No.; Pos.
BDV-N	Plasmid III, BDV-N outer	507 bp	AF158629; 87-428
BDV-Intron I	Plasmid I, BDV-M	439 bp	AF158632; 4-275
BDV-GP-C	Plasmid III, BDV-GP-C	649 bp	AF158633; 821-1304
GAPDH	Plasmid II, GAPDH	247 bp	NM017008; 972-1053
SDHS	Plasmid II, SDHS	260 bp	AB072907; 535-629
HPRT	Plasmid III, HPRT	251 bp	X62085; 179-264

Plasmid-ID = Interne Bezeichnung des Plasmids; M13R = M13 reverse Primer; M13F = M13 forward Primer; Größe M13R-M13F = Basenpaargröße des DNA-Amplifikats + 165 bp Vektoranteil des pCR.4®-TOPO-Sequenzierungsvektors, Invitrogen; Acc.-No. = GenBank® Accession-Nummer; Pos. = Amplifikatposition in der veröffentlichten Sequenz. GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; SDHS = Succinat-dehydrogenase Komplex, subunit A; HPRT = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase I

3.12.1.1 PCR zur Amplifikation der spezifischen Plasmid-Inserts

Zur Vervielfältigung der Plasmid-Inserts wurde das QIAGEN® Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) mit der HotStarTaq® DNA Polymerase verwendet.

MATERIAL UND METHODEN

Die Plasmide (Tabelle 7) wurden dem Reaktionsansatz in einer Konzentration von 0,1 ng/μl zugegeben und M13 forward und M13 reverse Primer verwendet. Der Reaktionsansatz findet sich in Tabelle 8.

Tabelle 8: PCR-Reaktionsansatzes zur Herstellung von Standardverdünnungsreihen

Reagenz	Konz. Stamm-Lsg.	Volumen	Endkonz. 50μl PCR-Ansatz
2x Qiagen Multiplex PCR Master Mix*	2 x	25,0 μl	1 x
DEPC-Wasser		18,0 μl	
M13 reverse Primer	10 μM	2,5 μl	0,5 μM
M13 forward Primer	10 μM	2,5 μl	0,5 μM
Plasmid-DNA aus Tabelle 7	0,1 ng/μl	2,0 μl	0,1 ng/50 μl
Gesamt		50,0 μl	

*Bestandteil des QIAGEN® Multiplex PCR Kits; Konz. Stamm-Lsg. = Konzentration der Stammlösung; Endkonz. 50μl PCR-Ansatz = Endkonzentration im 50 μl PCR-Reaktionsansatz

Die Amplifikation fand in einem Multicycler® PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) statt. Die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Reaktionsbedingungen

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	15 Minuten	95°C	-
Denaturierung	1 Minute	94°C	35 x
Primeranlagerung	1 Minute	55°C	
Elongation	1 Minute	72°C	
Finale Elongation (Herstellung 3'-ATP-Überhang)	10 Minuten	72°C	-
Kühlen	bis Entnahme	4°C	-

Zur Überprüfung der korrekten Amplifikation (spezifisches DNA-Insert + 165 bp Plasmid-DNA = Größe M13 forward – M13 reverse) wurde eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zusammen mit einem DNA-Größenmarker durchgeführt (2%iges Agarosegel) (9.3.5). Die Nukleinsäurevisualisierung erfolgte mit Midori-Green® DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) unter UV-Licht bei 312 nm in einem UV-Transluminator (Vilber Loumant, Torcy, Frankreich). Das Agarosegel wurde mit dem Geldokumentationssystem (Kodak 1.0 „Digital Imaging“) fotografiert.

3.12.1.2 Aufreinigung der DNA und photometrische Messung

Zur Aufreinigung der DNA wurden Montage™ PCR Centrifugal filter Devices (Carl Roth, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet und die gereinigte DNA eluiert. Mittels spektralphotometrischer Messung wurde die Extinktion der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ausgehend von einer Küvettendicke von 1 cm entspricht die Extinktion von 1 annähernd einer Konzentration von 50 µg DNA bzw. 40 µg RNA in 1 ml Volumen. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäuren und soll bei ca. 1,8 für DNA und 2,0 für RNA liegen.

3.12.1.3 Bestimmung der DNA-Kopienzahl

Die DNA-Kopienzahl pro µl der aufgereinigten PCR-Produkte wurde nach folgender Formel bestimmt (aus: Roche, Molecular Biochemicals, Technical Note No. LC 11/2000 und POROMBKA (2006))

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{6 \times 10^{23} (\text{Kopien/mol}) \times \text{DNA - Konzentration}^* (\text{g}/\mu\text{l})}{\text{MG} (\text{g/mol})^{**}}$$

* = Konzentration der aufgereinigten DNA aus 3.12.1.2 ** = Molekulargewicht der DNA aus 3.12.1.2

Das Molekulargewicht (MG) der DNA errechnete sich aus der Basenpaargröße des Amplifikats (Größe des Plasmidinserts von M13 forward – M13 reverse, Tabelle 7) multipliziert mit dem generellen MW der DNA von 660 Dalton pro Basenpaar (D/bp).

Die DNA wurde mit Aqua bidest. auf eine Stockkonzentration von 10⁹ DNA-Kopien/ 10µl eingestellt. Aus der Stocklösung wurden unter Verwendung von Aqua bidest. serielle Verdünnungen in 10er Stufen (log₁₀ Verdünnungsreihe) bis zur Verdünnung 10¹ DNA-Kopie/ 10 µl hergestellt. Von den so gewonnenen Verdünnungsstufen wurden jeweils 11 µl Aliquots hergestellt und bis zur weiteren Verwendung in DNA LoBind® Gefäßen (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf) bei -20°C gelagert.

3.12.2 Spezifische Reverse Transkription (spezifische RT)

Die Reverse Transkription der unter 3.8.4 gewonnenen RNA wurde mittels QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) in einem Multicycler® PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) durchgeführt. Abweichend vom Protokoll des Herstellers wurde ein zusätzlicher Schritt zur Primeranlagerung an die RNA durchgeführt (POROMBKA, 2006).

Die RNA-Stammlösung aus den primären Astrozytenkulturen (3.8.4) wurde zunächst mit Aqua bidest auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt und von dieser RNA-Gebrauchslösung je 6 µl in die RT eingesetzt, so dass pro Reaktion insgesamt 150 ng RNA umgeschrieben wurde (POROMBKA, 2006). Tabelle 23 gibt eine Übersicht über die verwendeten RNAs.

Die RT erfolgte mit spezifischen Antisense-Primern, so dass ausschließlich RNA positiver Polarität (+ssRNA, mRNA) in cDNA umgeschrieben wurde (POROMBKA, 2006). Die Primer

BDV-N as (p333), BDV-Intron I as (p351), BDV-GP-C as (p342), GAPDH as (p339), SDHS as (p322) und HPRT as (p324) (siehe Tabelle 10) wurden in einer Konzentration von 15 pmol/ μ l zugegeben. Für jede in der real-time PCR zu untersuchende RNA wurde somit ein separater 20 μ l RT-Reaktionsansatz hergestellt. (Tabelle 11).

Als Negativkontrollen wurden für jeden antisense-Primer DEPC-Aqua bidest. statt RNA eingesetzt. In einer Vorarbeit (POROMBKA, 2006) konnte gezeigt werden, dass die Effizienzen der spezifischen RT-Reaktionen jeweils übereinstimmen.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 10: Sequenz und Orientierung aller Primer und TaqMan®-Sonden (POROMBKA et al., 2008a)

Primer	Primer-ID	Basensequenz (5`- 3`)	Amp.	Acc.-No.; Pos.
BDV-spezifische Primer und TaqMan® Sonden				
BDV-N s	p332	CGG GTA TAG GGC ATG AGA AGG ATA	96 bp	AF158629 134-229
BDV-N as	p333	CAA GGC TGG GCG TTA CTG TAT G		
BDV-N probe		CGC CGT GAC TGG TCT AAC AAT GCC ACT		
BDV-Intron I s	p350	ATT CAA AAC ATT CCT ATG TGG AGC T	100 bp	AF158632 5-104
BDV-Intron I as	p351	TTC CGT GAA GTC CCT CCT ACA AA		
BDV-Intron I probe		AGG TAA TCG TCC CTG GAT GGC CCA CAC		
BDV-GP-C s	p153	AGT AGA TTA CAA TGG GCG GAA GTA C	134 bp	AF158633 1005-1138
BDV-GP-C as	p154	CCC CAG ACC CTA CTG TCC CTA		
BDV-GP-C probe		ACC GAA CCA CAT GAC CCG CTT TAG CCC		
BDV-M s *	p348	AAT TCA AAG CAT TCC TAT GTG GAG C	274 bp	AF158632 4-275
BDV-M as*	p349	ATA CGG ACA GTG AGT TGA GTG TTA G		
Primer für zelluläre Standardverdünnungsreihen				
GAPDH s	p338	GGT CTA CAT GTT CCA GTA TGA CTC T	82 bp	NM017008 972-1053
GAPDH as	p339	GTT GAT GAC CAG CTT CCC ATT CT		
GAPDH probe		CGG CAA GTT CAA CGG CAC AGT CAA GGC		
SDHS s	p321	TTG GTG GAC AGA GCC TCA AGT	95 bp	AB072907 535-629
SDHS as	p322	CAA GGT GTG TAA GAG TGA GTG GC		
SDHS probe		TCC GAT CAG CGA CAC AGC AAC ACC GA		
HPRT s	p323	AGA TGT CAT GAA GGA GAT GGG AGG	86 bp	X62085 179-264
HPRT as	p324	CCA GCA GGT CAG CAA AGA ACT TAT A		
HPRT probe		CCT TCA GCA CAC AGA GGG CCA CAA TGT		

Probe = TaqMan® Sonde; Primer-ID = interne Bezeichnung des Primers; Amp. = Basenpaargröße des DNA-Amplifikats; Acc.-No. = GenBank® Accession-Nummer; Pos. = Amplifikatposition in der veröffentlichten Sequenz; * = Verwendung zur Herstellung des Plasmids BDV-M (siehe 3.12.1); bp = Basenpaare; BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-Intron I = Intron I haltige mRNA, kodiert für BDV-M; BDV-GP-C: C-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; SDHS = Succinatdehydrogenase Komplex, subunit A; HPRT = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase I

Die einzelnen Arbeitsschritte der RT wurden auf Eis wie folgt durchgeführt:

1. Elimination genomischer DNA: pro Reaktion wurde 2 µl des *g-DNA wipeout* Puffers mit 6 µl RNase-freiem Wasser versetzt. Nach Zugabe von je 6 µl RNA wurde gevortext

MATERIAL UND METHODEN

und kurz zentrifugiert. Der Ansatz wurde dann für 2 Minuten bei 42°C auf dem Heizblock Accublock™ Mini (Labnet International Inc., Edison, USA) inkubiert und danach auf Eis abgekühlt.

2. Aufschmelzen von Sekundärstrukturen der RNA und Primeranlagerung: je 1 µl spezifischer as-Primer wurden hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren wurden die Proben für 5 Minuten bei 70°C in einem Thermocycler 60 (bio-med GmbH, Oberschleißheim) inkubiert und anschließend sofort auf Eis transferiert.
3. Herstellung des RT-Reaktionsansatzes: Der RNA-Primer-Mix wurde zu je 1 µl Quantiskript® Reverse Transkriptase und 4 µl Quantiskript® RT Puffer gegeben und dann kurz gevortext und zentrifugiert.

Tabelle 11: RT-Ansatz

Reagenz	Konz. Stamm-Lsg.	Volumen	End-Konz. 20 µl MM
1) Reaktionsansatz zur Elimination genomischer DNA (gDNA Eliminationsansatz)			
<i>gDNA Wipeout Buffer</i>	7 x	2 µl	1 x
RNase-freies Wasser		6 µl	
RNA aus 3.8.4	25 ng/µl	6 µl	150 ng
2) RNA-Primer Mix			
gDNA-Eliminationsansatz aus 1)		14 µl	
spezifischer as-Primer (Tabelle 10)	15 µM	1 µl	0,75 µM
3) RT-Mastermix			
Quantiskript® Reverse Transkriptase		1 µl	
Quantiskript® RT Buffer	5 x	4 µl	1 x
4) 20 µl RT-Reaktionsansatz			
RT-Mastermix aus 3)		5 µl	
RNA-Primer-Mix aus 2)		15 µl	
Gesamt		20 µl	

Konz. Stamm-Lsg.= Konzentration der Stammlösung; End-Konz. 20 µl MM = Endkonzentration im 20 µl RT-Mastermix; RT = reverse Transkription; gDNA = genomische DNA; Wipeout Buffer = „Zerstörungspuffer“

Der RT-Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei 42°C, für 3 Minuten bei 95°C und anschließend für 4°C bis zur Entnahme der Proben inkubiert. Die Amplifikation fand in einem Multicycler® PTC 200 (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) statt. Die so gewonnenen cDNA Proben wurden 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bei -20°C in DNA LoBind® Gefäßen (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf) bis zur weiteren Verwendung asserviert.

3.12.3 Real-time PCR

Die optimalen Reaktionsbedingungen für die real-time PCR wurden in Anlehnung an das von POROMBKA (2006) etablierte Protokoll angepasst.

Tabelle 12: Konzentrationen der Primer und TaqMan-Sonden in der real-time PCR

Primer	Primer-ID*	Konzentration Primer	Konz. TaqMan®-Sonde*
BDV-N s	p332	200 nM	200nM
BDV-N as	p333	300 nM	
BDV-Intron I s	p350	300 nM	100 nM
BDV-Intron I as	p351	300 nM	
BDV-GP-C s	p343	300 nM	200 nM
BDV-GP-C as	p342	300 nM	
GAPDH s	p338	100 nM	100 nM
GAPDH as	p339	100 nM	
SDHS s	p321	300 nM	200 nM
SDHS as	p322	300 nM	
HPRT s	p323	300 nM	200 nM
HPRT as	p324	300 nM	

s = sense Primer; as = antisense Primer; Primer-ID = interne Bezeichnung des Primers; Konz. = Konzentration; * = Primer- und Sondensequenz siehe Tabelle 10); BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-Intron I = Intron I haltige mRNA, kodiert für BDV-M; BDV-GP-C: C-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; SDHS = Succinat- dehydrogenase Komplex, subunit A; HPRT = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase I

3.12.4 Reaktionsansatz für die real-time PCR

Die Quantifizierung der BDV-spezifischen cDNA wurde mittels Rotor-Gene® Probe PCR Kit (Qiagen, Hilden) und 5'-FAM-3'-TAMRA-markierte TaqMan®-Sonden (Eurogentec SA, Seraing, Belgien) in einem Thermocycler Rotor-Gene® Q (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Die Kopienzahlen der BDV-spezifischen Transkripte wurden anhand einer Standardkurve mit bekannter Konzentration derselben Zielsequenz errechnet. Die Standardkurve für das jeweilige Transkript wurde durch Amplifikation der Mengenstandards in den Konzentrationen 10^8 - 10^5 DNA-Kopien/ μ l für BDV-N beziehungsweise 10^7 - 10^4 DNA-Kopien/ μ l für alle anderen Transkripte erstellt. Zur Normalisierung der BDV-spezifischen Kopienzahlen wurden zusätzlich die Kopienzahlen von zellulären cDNAs (*housekeeping genes*) bestimmt. Tabelle 12 gibt eine Übersicht über die verwendeten Primerpaare und TaqMan®-Sonden.

Zur Korrektur möglicher intraexperimenteller Schwankungen wurde jede Probe als Duplikat in die real-time PCR eingesetzt.

Eine Übersicht des real-time PCR-Reaktionsansatzes und der jeweiligen Konzentrationen der Einzelkomponenten gibt Tabelle 13.

Tabelle 13: Real-time PCR-Reaktionsansatz

Reagenz	Konz. Stamm-Lsg.	Volumen
Real-time PCR-Mastermix		
2 x Mastermix buffer	2 x	12,5 µl
sense Primer	15 µM	siehe Tabelle 12
antisense Primer	15 µM	
TaqMan®-Sonde	50 µM	
Wasser		ad 15 µl
25 µl real-time PCR-Reaktionsansatz		
Mastermix		15 µl
1:10 verdünnte cDNA		10 µl
Gesamt		25 µl

Konz. Stamm-Lsg = Konzentration der Stammlösung; End-Konz. 25 µl = finale Konzentration im real-time PCR Reaktionsansatz

Zunächst erfolgt im Rotor-Gene® Q (Qiagen, Hilden) eine Aktivierung der HotStarTaq Plus® DNA Polymerase bei 95°C für 3 Minuten. Im Anschluss folgen 40 Zyklen, die jeweils aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 3 Sekunden und einem kombinierten Anlagerungs- und Elongationsschritt bei 60°C für 10 Sekunden bestehen. Die Aufzeichnung der Fluoreszenz erfolgt in der letztgenannten Phase.

3.12.5 Kontrollen für die real-time PCR

Die jeweiligen BDV-Mengenstandards wurden als Positivkontrollen und zur Korrektur möglicher interexperimenteller Schwankungen als Inter-Run Calibratoren (IRC) benutzt. Zusätzlich wurden als weitere Positivkontrolle langzeitkultivierte, zu 94% BDV-infizierte Astrozyten verwendet. Als Negativkontrollen wurde für jedes Primerpaar anstelle der cDNA DEPC-Wasser zugegeben (No template controle, NTC). Zum Ausschluss einer BDV-Kontamination während der Zellkultivierung und RNA-Isolierung wurde RNA aus nicht infizierten primären Astrozytenkulturen vom Tag 42 gewonnen. Die RNA wurde mittels BDV-N as Primer (p333) in spezifische cDNA umgeschrieben und diese in der real-time PCR eingesetzt.

3.12.6 Quantifizierung und Normalisierung der Genexpression

Die absolute Quantifizierung der Amplifikation der BDV mRNAs erfolgte mit dem Rotor-Gene® Q Thermocycler (Qiagen, Hilden) und der dazu gehörenden Software Rotor-Gene® Software 2.0.2. (Qiagen, Hilden). Die Aufzeichnung des Fluoreszenzsignals, das von dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) emittiert wurde, fand während des kombinierten Anlagerungs- und Elongationsschrittes der PCR statt.

Der Threshold wurde von der Software des Gerätes automatisch gesetzt. Unter dem Begriff *threshold cycle* (Schwellenwert-Zyklus, C_t) versteht man den PCR-Zyklus, in dem die Amplifikationskurve eines PCR-Produktes den Threshold kreuzt, also erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Der C_t Wert ist umgekehrt proportional zum Expressionslevel des Genes (Qiagen Benutzerhandbuch Rotor-Gene® Q; qPCR Guide Eurogentec). Ist die Ausgangsmenge des Genes bekannt (Startkopienzahl), kann die Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den C_t -Wert konstruiert werden. Durch die Geradengleichung $x = (Ct - B)/M$ kann an der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden (http://de.wikipedia.org/wiki/Real_Time_Quantitative_PCR und Qiagen Benutzerhandbuch Rotor-Gene® Q; qPCR Guide Eurogentec). Die Kopienzahl der Proben wurde durch die Software automatisch kalkuliert.

In Anlehnung an die bei VANDESOMPELE et al. 2002 und POROMBKA, et al. 2006, 2008 beschriebene geNorm-Methode wurde aus den kalkulierten Kopienzahlen der Referenzgene durch Berechnung ihres geometrischen Mittelwertes für jede Probe zunächst ein spezifischer Normalisierungsfaktor bestimmt. Die *genes of interest* (GOI) wurden standardisiert, indem der höchste relative Wert gleich 1 gesetzt wurde. Diese Werte wurden durch den jeweils für die Probe errechneten Normalisierungsfaktor geteilt, um die normalisierte und standardisierte BDV-spezifische Kopienzahl zu erhalten. Anschließend wurden die normalisierten und standardisierten Einzelwerte mit dem geometrischen Mittelwert aller GOIs (z.B. aller von der Software errechneten BDV-N-Kopienzahlen) multipliziert, um normalisierte absolute BDV-spezifische Kopienzahlen zu bekommen.

3.13 INFECTIOSITÄT DES ZELLKULTURÜBERSTANDES

Ob und in welchem Maße eine Virusfreisetzung in primären Astrozytenkulturen stattfindet, war bisher nicht bekannt und wurde deshalb in einem Infektionsversuch untersucht.

Zu Testung der Infektiosität des Zellkulturüberstandes wurde dieser am Tag 27 p.i. von BDV-infizierten primären Astrozyten gewonnen und auf nicht infizierte Astrozyten gegeben. Diese wurden nach 21 und 42 Tagen mittels indirekter Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein einer BDV-Infektion untersucht. Im Versuch wurden jeweils Duplikate untersucht.

1. Das Medium von BDV-infizierten, primären Astrozytenkulturen am Tag 27 p.i. wurde abgenommen und bei -70°C asserviert. Als Negativkontrolle wurde Medium gleichalter, nicht infizierter Zellen verwendet.

2. Nicht infizierte Astrozyten wurden, wie unter 3.8.1.2 beschrieben, auf SDS-beschichteten Deckgläschen (3.8.1.1) in 24-Well Platten (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen) ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert.
3. Nach Auftauen des asservierten Zellkulturmediums aus Schritt 1. erfolgte eine Zentrifugation für 2 x 10 Minuten bei 4500 x g, um darin enthaltene Zellreste zu entfernen.
4. Der Zentrifugationsüberstand wurde im Verhältnis 1:2 mit frischem Zellkulturmedium vermischt und jeweils 0,5 ml für 48 Stunden auf nicht infizierte Astrozyten gegeben.
5. Der Überstand wurde abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank, ein Mediumwechsel alle 3-4 Tage.
6. Zellfixierung erfolgte zu den Zeitpunkten 21 und 42 Tage p.i. mit 4% PFA in Zellkulturmedium (3.9.1).

Die Infektion und die Ausbreitung in der Kultur wurde, wie unter 3.9.5 beschrieben, mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Als Primärantikörper dient der gegen das BDV-N gerichtete monoklonale Antikörper Bo-18 aus der Maus. Als Negativkontrolle für den Sekundärantikörper wurden Duplikate von mit BDV-Überstand behandelten Zellen verwendet, die statt des Primärantikörpers ausschließlich mit Blockingserum inkubiert wurden. Die Auswertung des Versuchs wurde wie unter 3.9.7 beschrieben, vorgenommen.

3.14 UNTERSUCHUNG DER ROLLE DES GLYKOPROTEINS BEI DER GLIA-GLIALEN BDV-AUSBREITUNG

3.14.1 Versuchsaufbau

Nicht infizierte Astrozyten wurden im Verhältnis 100:1 mit zu 94% BDV-infizierten Astrozyten auf Deckgläschen in 24-Well-Platten (Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen) kokultiviert. Die Subkultur der Zellen erfolgt wie unter 3.8.1.2 beschrieben. Eine hohe Aussaatdichte sollte die BDV-Ausbreitung über Teilung der infizierten Zellen minimieren. Sie beträgt für die nicht infizierten Zellen $1,49 \times 10^5$ Zellen/cm² und für die BDV-infizierten Zellen $1,5 \times 10^3$ Zellen/cm².

Die Untersuchung erfolgte anhand von zwei unabhängigen Zellpräparationen. Tabelle 14 zeigt den Versuchsaufbau. Es wurden jeweils Duplikate für die Zeitpunkte 2, 5, 9 und 23. Tag nach Mischen der Zellen ausgesät. Eine Hälfte der Zellen wurde unter Zugabe des Furin-Inhibitors MI-0701 in einer Konzentration von 10 µM kultiviert, die andere Hälfte ohne (Tabelle 14). Jeden 3. Tag erfolgte ein Medium- und Inhibitorwechsel (siehe 3.7.1). Die Zellen wurden wie unter 3.9.1 beschrieben, mittels 4% PFA fixiert. Nach der Fixierung wurden die Deckgläschen bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Die Infektion und die Ausbreitung in der Kultur wurde, wie unter 3.9.5 beschrieben, mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht.

Tabelle 14: Versuchsaufbau zur Untersuchung der glia-glialen BDV-Ausbreitung

Tag 2	Tag 5	Tag 9	Tag 23
+ Inhibitor	+ Inhibitor	+ Inhibitor	+ Inhibitor
ohne Inhibitor	ohne Inhibitor	ohne Inhibitor	ohne Inhibitor

+ Inhibitor: Zugabe von 10 µM Furin-Inhibitor MI-0701 jeden 3. Tag. Ohne Inhibitor: Kultivierung der Zellen ohne Zugabe des Furin-Inhibitors.

3.14.2 Kontrollen des Ausbreitungsversuchs

Als Negativkontrolle dienten die oben beschriebenen, bis Tag 23 kokultivierten Zellen, denen kein Inhibitor zugegeben wurde. In der indirekten Immunfluoreszenz wurden sie anstelle des Primärantikörpers ausschließlich mit 1% PBS-BSA inkubiert.

Als weitere Negativkontrolle wurden gleichaltrige, nicht infizierte Astrozyten aus der jeweiligen Präparation verwendet. In der indirekten Immunfluoreszenz wurden sie sowohl mit Primär- als auch mit Sekundärantikörper inkubiert.

3.14.3 Auswertung des Ausbreitungsversuchs

Die Kulturen wurden auf die Größe der BDV-infizierten Zellinseln hin untersucht. Der Ausbreitungsversuch wurde weiterhin quantitativ wie unter 3.9.7 beschrieben, ausgewertet.

3.15 STATISTIK

Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen. Es wurde das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1 (BMDP Statistical Software, Inc.) verwendet.

Die Ergebnisse der Astrozytenreifung- und Astrozytendifferenzierung vom Tag 28 und Tag 42 p.i. wurden bezüglich der Gruppe (BDV-infiziert versus nicht infiziert) und dem Zeitpunkt p.i. mittels explorativer zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholungen (bezüglich Infektion und Tag) unter Verwendung des Programms BMDP2V untersucht. Im Anschluss erfolgte eine explorative zweifaktorielle Varianzanalyse ohne Berücksichtigung von Messwiederholungen bezüglich der Gruppenunterschiede (BDV-infiziert versus nicht infiziert) und den Zeitpunkten 7, 28 und 42 p.i.. Untersucht wurden jeweils die Haupteffekte (Gruppe und Zeitpunkt p.i.) und die Wechselwirkungen von Gruppe und Zeitpunkt p.i.

Die Expression von BDV-N, BDV-M und BDV-GP sowie ihrer korrespondierenden mRNAs wurde mit dem Programm StatXact 10 (STATCON, Witzenhausen) mittels Kruskal-Wallis Test auf Gruppenunterschiede verglichen. Anschließend erfolgte ein Gruppenvergleich der BDV-N-, BDV-M- und BDV-GP-Proteinexpression getrennt nach Tagen (28 und 42 dpi.). Dies wurde auch für die korrespondierenden mRNAs durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels exaktem Friedman-Test. Im Anschluss wurde untersucht, ob eine Wechselwirkung

zwischen Protein- oder mRNA Expression und Tag besteht. Hierzu wurde eine explorative zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen für Tag 28 und 42 durchgeführt (Programm BMDP2V).

Der Einfluss des Inhibitors MI-0701 auf die BDV-Ausbreitung wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse bezüglich des Faktors BDV-N-Expression untersucht. Es kam das Programm BMDP 7D zum Einsatz.

Bei der Bewertung der Signifikanz wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1 ETABLIERUNG UND OPTIMIERUNG DER PRIMÄREN CORTICALEN ASTROZYTENKULTUREN

4.1.1 Morphologie der primären corticalen Astrozyten

Die Morphologie der Zellen wurde nach der Präparation täglich unter dem Invertmikroskop überprüft und fotografisch dokumentiert (Abbildung 25, A-F)

Am 1. DIV, ca. 24 Stunden nach Zellkulturpräparation, lagen die Zellen alle einzeln. Es waren viele kleine runde, abgekugelte Zellen vorhanden. Dazwischen fanden sich etwas größere runde Zellen sowie größere längliche Zellen. Weiterhin fanden sich einige größere, flache, dreieckige bis polygonale astrozytenähnliche Zellen sowie einzelne Zellen mit mehreren Fortsätzen (Abbildung 25, A).

Am 3. DIV waren deutlich weniger kleine runde Zellen zu sehen und es waren vermehrt größeren polygonalen Zellen zu finden. Diese Zellen (nachfolgend Astrozyten genannt) lagen überwiegend einzeln. An einigen Stellen der Kulturflasche bildeten sie dagegen kleinere Zellinseln. Die Zellen wiesen dabei zum Teil lange Fortsätze auf, mit denen sie miteinander in Kontakt traten (Abbildung 25, B) Am 5. DIV, wurden die zusammenhängenden Zellinseln größer (Abbildung 25, C).

Am Tag 7 nach Präparation waren die Astrozyten nahezu konfluent gewachsen und wiesen eine flache polygonale Struktur auf (Abbildung 25, D). Stellenweise lagen die Astrozyten dichter beieinander, dazwischen fanden sich jedoch auch immer wieder Bereiche, in denen der Monolayer Lücken aufwies und die Zellen weiter auseinander lagen. Während der Kultivierung, die zwei Passagen umfasste, lagen die Astrozyten deutlich enger zusammen (Abbildung 25, E+F). Zwischen diesen dicht gewachsenen Zellen fanden sich multifokal verteilte, kleine, zellfreie Inseln. Vereinzelt waren Einzelzellen und sehr selten Zellinseln als zweite Zelllage auf dem Monolayer zu finden (Abbildung 25, F (Pfeil)). Die Morphologie der Astrozyten veränderte sich auch bei Langzeitkultivierung und nach Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen nicht.

Die BDV-infizierten Astrozyten zeigten im Vergleich zu gleichaltrigen nicht infizierten Kulturen keine morphologischen Unterschiede.

4.1.2 Zusammensetzung der Zellkulturen

Die Untersuchung auf nicht-astrozytäre Zellen wurde freundlicherweise von Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer, Institut für Human-Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Wie mittels indirekter Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte, exprimierten am 28. und 42. DIV 95-98% der Zellen GFAP und sind somit als Astrozyten anzusprechen. Als weitere Zellen fanden sich MAP-2 positive Neuronen und CNPase-positive Oligodendrozyten. Weiterhin wurden mittels real-time PCR die GFAP-m-RNA, und m-RNAs für den neuronalen Markers Mtap2 und den Oligodendrozytenmarkers

Cnp untersucht. Die mRNA Level für Mtap2 und Cnp waren 500 Mal niedriger als der mRNA Level des Astrozytenmarkers GFAP (AHLEMEYER et al., 2013).

4.1.3 Einfluss der Präparationsmethode auf die Zellausbeute

In einem Vorversuch wurden zunächst drei verschiedene Zellkulturpräparationsmethoden hinsichtlich ihrer Zellausbeute miteinander verglichen. (siehe 3.6). Bei der ersten Methode wurde ausschließlich eine mechanische Dissoziation der Gehirnhemisphären vorgenommen. Bei den anderen Methoden wurde das Gewebe zusätzlich zur mechanischen Dissoziation mit 0,1 % Papain bzw. 0,25% Trypsin-EDTA vorverdaut.

Am Tag 6 nach Präparation (6. DIV, *days in vitro*) waren die Astrozyten, die bei Präparation mit Trypsin-EDTA vorverdaut wurden, zu einem fast konfluenten Monolayer gewachsen, der nur vereinzelte kleine Lücken aufwies (Abbildung 25, D). Die mit Papain vorbehandelten Astrozyten und die unvorbehandelten Zellen zeigten am 6. DIV noch deutlich größere Lücken im Monolayer. Nach 7-8 DIV waren auch diese Zellkulturen zu einem fast konfluenten Monolayer herangewachsen.

4.1.4 Geeignete Zellkultursysteme für primäre corticale Astrozyten

Im Rahmen der Etablierung der Astrozytenkulturen wurden zunächst unterschiedliche Zellkultursysteme für die nachfolgenden Versuche getestet. Entscheidungsfaktoren für oder gegen die Verwendung eines Zellkultursystems waren neben dem Wachstumsverhalten der Astrozyten auch die benötigten Zellmengen sowie die Praktikabilität in der Handhabung während der Kultivierung und der nachfolgenden Anwendung in der Indirekten Immunfluoreszenz. Eine Übersicht über die verwendeten Zellkultursysteme gibt Tabelle 21 in Kapitel 9.4.

Als geeignet erwiesen sich **Falcon-Zellkulturflaschen** (MAGV GmbH, Rabenau) ohne zusätzliche Beschichtung. **Glaswaren** mussten dagegen zunächst einer Oberflächenbehandlung unterzogen werden, damit sich die Astrozyten bei der späteren Zellfixierung mit Aceton oder 4% PFA nicht ablösten. Deckgläschen (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) und Multitest-Objektträger® (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach) wurden mittels 10%igem Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) vorbehandelt und anschließend sterilisiert. Ein Versuch, die Deckgläschen mit Poly-L-Lysin vorzubehandeln, brachte gegenüber SDS-Vorbehandlung keine Vorteile.

Für die Untersuchung der Reifungs- und Differenzierungsantikörper und den Nachweis der BDV-Proteine (3.9.3 und 3.9.4) wurden **Multitest-Objektträger®** mit 10 Kreisen á 6 mm Durchmesser verwendet. Diese boten insbesondere bei begrenztem Ausgangsmaterial, wie bei Primärzellkulturen, den Vorteil, dass bei Verwendung von relativ wenigen Zellen (in der vorliegenden Arbeit 2×10^4 Zellen/Kreis) auf viele unterschiedliche Antigene untersucht werden kann. Die Handhabung der Objektträger in der nachfolgenden Immunfluoreszenz war relativ einfach. Nachteilig war jedoch, dass keine Dauerkultivierung möglich ist. Die Zellen können nach Passage maximal 24 Stunden auf dem Objektträger belassen werden.

Zur Untersuchung der Rolle des BDV-Glykoproteins bei der glia-glialen BDV-Ausbreitung (3.14), der Überprüfung der Expression der Astrozytenreifungsmarker (3.9.3) und der Testung der Infektiosität des Zellkulturüberstandes (3.13) war dagegen die Kultivierung der Zellen über einen längeren Zeitrahmen unerlässlich. Hierzu eignen sich **runde, SDS vorbehandelte Deckgläschen in 24-Well-Platten**. Weitere Vorteile dieses Systems waren die relativ einfache Handhabung während der Kultivierung, der moderate Zellverbrauch von $2,85 \times 10^5$ Zellen pro Well und die Möglichkeit, dem Medium Substanzen zuzusetzen und es regelmäßig austauschen zu können. Der Zellverbrauch von $2,85 \times 10^5$ Zellen pro Well kann sich allerdings bei frühen Untersuchungszeitpunkten als nachteilig erweisen, wenn sich die Zellen nach Präparation noch nicht ausreichend vermehrt haben und deshalb nicht genügend Material vorhanden ist. Ein weiterer Nachteil war schwierige Handhabung der dünnen Glasdeckgläschen bei der nachfolgenden Immunfluoreszenz. Teilweise lösten sich Zellen nach Fixierung mit 4% PFA ab.

Die Kultivierung der Zellen auf **Deckgläschen in 10 cm² Petrischalen** verbrauchten dagegen mit bis $1,9 \times 10^6$ sehr viele Zellen, da pro Deckgläschen nur auf ein Antigen getestet werden kann. Vorteilhaft war hier die relativ einfache Handhabung bei der Kultivierung und nachfolgender Immunfluoreszenz. Die Zellanhaftung war durchgehend gut.

Lab-Tek® II Chamber-Slides™ waren für die Kultivierung von primären Astrozyten nicht geeignet. Die Zellen wuchsen lediglich in den Randbereichen der Kammern. Die Kultivierung von MDCK-Zellen gelang dagegen unter den gleichen Bedingungen problemlos.

Für RNA und Proteinisolation wurden sowohl **6-Well Platten** als auch **10 cm² Petrischalen** verwendet. Eine Dauerkultivierung war bei beiden Systemen möglich, die Handhabung der 6-Well-Platten gestaltete sich aber etwas einfacher als die der einzelnen Petrischalen. Die Vor- und Nachteile der verschiedenen Zellkultursysteme sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15: Vor- und Nachteile verschiedener Zellkultursysteme

Zellkultursystem	Methode	Vorteile	Nachteile
24-Well Platte*	IF	Handhabung bei Kultivierung	hoher Zellverbrauch
		Langzeitkultivierung mgl.	Handhabung bei IF
		Substanzzugabe mgl.	z.T. schlechte Anhaftung
Multitest®-Objektträger*	IF	geringer Zellverbrauch	keine Langzeitkultivierung
		Handhabung bei Kultivierung	keine Substanzzugabe mgl.
		Handhabung bei IF	-
Deckgläschen in 10 cm ² Petrischalen*	IF	Handhabung bei Kultivierung	sehr hoher Zellverbrauch
		Handhabung bei IF	-
Lab-Tek® II Ch.-Slides™	IF	Handhabung bei Kultivierung	kein Astrozytenwachstum
		Handhabung bei IF	hoher Zellverbrauch
6-Well Platte	WB, qPCR	Handhabung bei Kultivierung	-
		Handhabung bei RNA/Protein-Isolation	
10 cm ² Petrischalen	qPCR	Handhabung bei RNA-Isolation	-

IF = Indirekte Immunfluoreszenz; die mit * gekennzeichneten Zellkultursysteme wurden mit 10% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) vorbehandelt; WB = Western Blot; qPCR = quantitative PCR (real-time PCR); Lab-Tek® II Ch.-Slides™ = Lab-Tek® II Chamber-Slides™; mgl. = möglich

4.1.5 Etablierung der geeigneten Fixierungsmethode für den Nachweis der BDV-spezifischen Antigene

4.1.5.1 Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA)

Die Zellfixierung mit 4% Paraformaldehyd (4% PFA) ergab hinsichtlich der Zellanhaftung und der Morphologie der Astrozyten sehr gute Ergebnisse (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27).

Der Nachweis der Reifungs- und Differenzierungsmarker funktionierte mit den PFA-fixierten Zellen problemlos. Der anti-BDV-N-Antikörper Bo-18 sowie das polyklonale Kaninchen-anti-BDV-Rattenserum ergaben bei PFA-fixierten BDV-infizierten Zellen eine eher diffuse Anfärbung des Zytoplasmas.

Die indirekte Immunfluoreszenz für BDV-M und BDV-GP funktionierte dagegen bei PFA-fixierten, BDV-infizierten Zellen nicht.

4.1.5.2 Fixierung mit Aceton

Bei Verwendung von acetonfixierten Zellen ließen sich die BDV-N und BDV-M klar nachweisen. Es fanden sich punktförmige Fluoreszenzsignale, zu späteren Infektionszeitpunkten auch eine diffuse Anfärbung des Zytoplasmas (Abbildung 30).

BDV-GP ließ sich auch nach Acetonfixierung nicht darstellen.

4.1.6 Kryokonservierung und Langzeitlagerung der primären corticalen Astrozyten

Um die Einsatzmöglichkeiten der primären corticalen Astrozytenkulturen auch im Hinblick auf eine längerfristige Verwendung der Zellen auszuloten, wurden 58 Tage alte (ca. 8 Wochen alte) Zellen für 1,5 Monate eingefroren. Nach Auftauen (3.7.4) und Kultivierung für weitere 8 Monate wurden sie erneut auf ihre Zellreifungsmarker untersucht. Von Interesse war hier insbesondere, ob sich hinsichtlich astrozytärer Zellreifungs- und Differenzierungsmarker Unterschiede zu den frisch präparierten und nicht eingefrorenen Zellen ergeben (3.9.3 und 3.9.7). Über 80% der Astrozyten waren positiv für GFAP, S100 β , Vimentin und Nestin. GLT-1 wurde von 30-80% der Zellen exprimiert, GLAST wurde dagegen nur von etwa 30% der Zellen exprimiert.

Die BDV-Infektion wurde durch Nachweis von BDV-N in der indirekten Immunfluoreszenz getestet (3.9.7). Auch nach Einfrieren waren die Zellen im Durchschnitt zu 94% BDV-infiziert.

4.1.7 Untersuchung auf Mycoplasmen

Die Untersuchung auf eine eventuelle Mycoplasmenkontamination der Kulturen erfolgte, wie unter 3.7.5 beschrieben, im Rahmen der Immunfluoreszenzuntersuchungen der Kulturen mittels DAPI[®] Test. Mycoplasmen-DNA ließ sich zu keinem Zeitpunkt darstellen.

4.2 NACHWEIS DER ASTROZYTENREIFUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSMARKER MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESCENZ

Die primären corticalen Astrozyten wurden auf Reifungs- und Differenzierungsmarker untersucht. Dadurch sollte geklärt werden, was für eine Zellpopulation *in vitro* vorliegt. Außerdem sollten ihre Eignungen und Grenzen für weiterführende Versuche überprüft werden.

Eine weitere Fragestellung war, ob die BDV-Infektion einen Einfluss auf die Reifung und Differenzierung der primären Astrozytenkulturen haben könnte.

Hierfür wurden sowohl BDV-infizierte als auch nicht infizierte Kulturen zu den Zeitpunkten 7 DIV (n=1 pro Zeitpunkt), 28 und 42 DIV (n= jeweils 2 pro Zeitpunkt) untersucht. Exemplarisch wurden auch 52 Tage alte, 3 Wochen nicht passagierte, nicht infizierte Astrozyten getestet (n=1).

4.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises der Astrozytenreifungs- und differenzierungsmarker-Expression mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Astrozytenreifungsmarker Vimentin, GFAP, S100 β und Nestin in den primären Astrozytenkulturen in fast allen Zellen nachweisbar waren. Die Expression blieb zu allen Untersuchungszeitpunkten auf konstant hohem Niveau. Bei keinem der Marker war über den Untersuchungszeitraum eine deutliche Veränderung der Expression zu verzeichnen (Vimentin $p=0,59$; GFAP $p=0,39$; S100 β $p=0,71$; Nestin $p=0,78$). Insgesamt unterschied sich der Nachweis von Vimentin, GFAP, S100 β und Nestin in Bezug auf die Anzahl positiver Zellen nicht merklich voneinander. Es ergab sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede bezüglich der Expression dieser Marker in BDV-infizierten und nicht infizierten astrozytären Kulturen (Vimentin $p=0,52$; GFAP $p=1,0$; S100 β $p=0,92$; Nestin $p=0,39$) (Abbildung 11, Abbildung 12, Abbildung 26 und Abbildung 27). Vimentin, GFAP und S100 β waren auch bei 52 Tage alten, 3 Wochen lang nicht passagierten Kulturen in über 80% der Zellen nachweisbar. Lediglich beim Nestinnachweis unterschieden sich diese Kulturen deutlich von den kürzlich passagierten Zellen. Nestin war bei den lange nicht passagierten, nicht infizierten Zellen nur in wenigen Zellen nachweisbar, die Intensität der Fluoreszenz war schwach. A2B5 war dagegen zu keinem Zeitpunkt in BDV-infizierten oder nicht infizierten Kulturen nachweisbar, unabhängig von ihrem Alter oder vorheriger Zellkulturpassage ($p=1,0$). Die Intermediärfilamente Vimentin, GFAP und Nestin waren sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellfortsätzen als fädige bis zuckerwatteähnliche Strukturen darstellbar. Zum Teil zeigte sich auch eine eher diffuse oder leicht fleckige Farbreaktion (Abbildung 28). Auffällig war dabei, dass sich mittels Nestin-Nachweis insbesondere sehr lange astrozytäre Fortsätze darstellen ließen, mit denen die Zellen zum Teil über eine relativ große Distanz miteinander in Verbindung standen. GFAP und Vimentin wurde dagegen überwiegend in kürzeren bis mittellangen Fortsätzen exprimiert. Der S100 β -Nachweis war durch eine diffuse bis fleckige Anfärbung von Zytoplasma und Fortsätzen gekennzeichnet (Abbildung 28). Das Calcium-bindende Peptid fand sich insbesondere auch in kurzen dünnen Fortsätzen, die teilweise fädige Verspannungen zwischen benachbarten Astrozyten bildeten.

Die Astrozytendifferenzierungsmarker GLAST und GLT-1 unterschieden sich in ihrer Expression voneinander. GLAST war zu allen Untersuchungszeitpunkten in deutlich mehr Zellen exprimiert. Der Nachweis nahm über die Zeit leicht ab, jedoch ohne statistisch signifikant zu sein ($p=0,44$). GLT-1 wurde dagegen von deutlich weniger Zellen exprimiert, wobei der Nachweis über die Zeit leicht anstieg. Auch hier ließ sich keine statistische Signifikanz erkennen ($p=0,69$). Auch für GLAST und GLT-1 ergaben sich keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Expression in BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen (GLAST $p=0,29$; GLT-1 $p=0,99$) (Abbildung 14, Abbildung 13 und Abbildung 27).

GLAST und GLT-1-positive Zellen waren durch eine positive Anfärbung des Zytoplasmas und der Fortsätze charakterisiert (Abbildung 28). Das Reaktionsmuster war dabei diffus mit

multifokal verteilten, punktförmigen Arealen stärkerer Fluoreszenz. Ähnlich wie bei S100 β ließen sich mittels GLAST insbesondere auch kurze, dünne Fortsätze darstellen, die fädige Verspannungen zwischen benachbarten Astrozyten bilden.

Statistisch signifikant ($p=0,04$) war dagegen der Verlauf der BDV-Infektion der Astrozyten. Es zeigte sich vom Tag 7 bis Tag 42 ein Anstieg der BDV-N-Expression in den Zellen. Anfangs waren $< 30\%$ der Astrozyten infiziert, am Tag 42 waren deutlich mehr Zellen positiv.

Eine detaillierte Darstellung des Nachweises der astrozytären Reifungs- und Differenzierungsmarker findet sich unter 4.2.2.1 bis 4.2.2.5.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die p-Werte der explorativen zweifaktoriellen Varianzanalyse ohne Messwiederholungen für Tag 7, 28 und 42 berücksichtigt.

8 Monate alte, zwischenzeitlich kryokonservierte, BDV-infizierte Astrozyten wiesen fast alle eine GFAP, Vimentin, Nestin und S100 β -Expression auf. GLT-1 wurde von etwa der Hälfte der Zellen exprimiert. GLAST war dagegen in weniger als 30% der Zellen nachweisbar.

52 Tage alte, 3 Wochen nicht passagierte, nicht infizierte Astrozyten waren fast alle positiv für die Marker GFAP, Vimentin und S100 β . Nestin wurde dagegen nur von weniger als 30% der Zellen exprimiert. GLAST und GLT-1 wurden nicht getestet.

4.2.2 Astrozytenreifung

4.2.2.1 GFAP-Expression

GFAP-positive Zellen waren durch eine positive Anfärbung ihres Zytoplasmas und der Fortsätze charakterisiert. Die Anfärbung der astrozytären Intermediärfilamente stellte sich teilweise als fädige bis zuckerwatteähnliche Reaktion dar. Zum Teil war dagegen eine eher diffuse oder leicht fleckige Farbreaktion des Zytoplasmas und der Fortsätze zu erkennen (Abbildung 26, Abbildung 28).

Zu den Untersuchungszeitpunkten 7 und 28 DIV zeigten in der semiquantitativen Auswertung zwischen 80 und 100% der BDV infizierten und nicht infizierten Astrozyten eine GFAP-Expression. Am 42. DIV wiesen $> 80\%$ der BDV-infizierten Zellen eine GFAP-Expression auf. Nicht infizierte, 42 Tage alte Astrozyten zeigten ebenfalls überwiegend eine starke Reaktion ($n=3$) und einmal eine Expressionsrate von ca. 60-70% ($n=1$). Die Unterschiede über die Zeit waren nicht signifikant ($p=0,39$). Auch die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen wiesen keine Signifikanz auf ($p=1,0$) (Abbildung 12 und Abbildung 11 sowie Tabelle 25).

Die Auszählung der Zellen ergab vergleichbare Ergebnisse. Nahezu alle BDV-infizierten Zellen (92%) waren am 7. DIV GFAP-positiv. Bei den nicht infizierten Zellen waren es 90%. Am 28. DIV zeigten 85% der BDV-infizierten Zellen eine positive Reaktion auf GFAP. Nicht infizierte, 28 Tage alte Astrozyten waren zu 91% GFAP-positiv. Am Tag 42 *in vitro* war in 80% der BDV-infizierten Zellen und 97% der nicht infizierten Zellen GFAP nachzuweisen (Tabelle 31).

52 Tage alte, 3 Wochen nicht passagierte, nicht infizierte Kulturen waren zu 88,4% GFAP-positiv und zeigten somit ebenfalls eine starke Reaktion.

Von 8 Monate alten, zwischenzeitlich kryokonservierten, BDV-infizierten Astrozyten wurde GFAP in über 80% exprimiert.

Die als Positivkontrollen verwendeten Gefrierschnitte aus Gehirnen adulter Lewis-Ratten wiesen deutliche positive Signale auf.

4.2.2.2 Vimentin-Expression

Vimentin-positive Zellen zeigten eine Anfärbung des Zytoplasmas und ihrer Fortsätze. Die Anfärbung des zytoskelettalen Proteins war überwiegend durch ein fädiges bis zuckerwatteartiges Reaktionsmuster gekennzeichnet. Teilweise war auch eine diffuse oder leicht fleckige Anfärbung des Zytoplasmas und der Fortsätze zu sehen (Abbildung 26, Abbildung 28).

Die Vimentinexpression zeigte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum relativ konstant. Sowohl BDV-infizierte als auch nicht infizierte Kulturen wiesen am 7. und 28. DIV eine Vimentinexpression bei > 80% der Zellen auf. Am 42. DIV war die Vimentinexpression bei BDV-infizierten Zellen ebenfalls durchgehend stark ausgeprägt. Lediglich 42 Tage alte nicht infizierten Astrozytenkulturen zeigten einmal eine etwas geringere Expression, es waren ca. 60-70% der Zellen positiv (n=1). Überwiegend (n=3) zeigten jedoch auch hier über 80% der Astrozyten eine Vimentin-Expression. Die Unterschiede über die Zeit waren nicht signifikant (p=0,59). Auch die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen wiesen keine Signifikanz auf (p=0,52) (Abbildung 12 und Abbildung 11 sowie Tabelle 24).

Die quantitative Auszählung der Zellen ergab auch für Vimentin zur semiquantitativen Bestimmung übereinstimmende Ergebnisse. Insgesamt waren über den gesamten Untersuchungszeitraum fast alle Zellen Vimentin-positiv. Am Tag 7 *in vitro* zeigten 96% der BDV-infizierten und nicht infizierten Zellen eine positive Fluoreszenz auf Vimentin. Am 28. DIV waren es 95% der BDV-infizierten und 94% der nicht infizierten Zellen. Am 42. Tag *in vitro* war Vimentin bei 99% der BDV-infizierten und 98% der nicht infizierten Zellen nachweisbar (Tabelle 31).

52 Tage alte, 3 Wochen nicht passagierte, nicht infizierte Kulturen waren zu 91% Vimentin-positiv und wiesen somit ebenfalls eine starke Reaktion auf. Die Intensität der Fluoreszenz erschien dagegen schwächer als bei den kürzlich passagierten Zellen. Ca. 50 % der Zellen waren mittelgradig bis stark gefärbt, die andere Hälfte zeigte dagegen nur eine schwache Fluoreszenz.

8 Monate alte, zwischenzeitlich kryokonservierten, BDV-infizierten Astrozyten zeigten eine in fast allen Zellen eine positive Vimentin Reaktion.

Die als Positivkontrollen verwendeten Gefrierschnitte aus Gehirnen adulter Lewis-Ratten wiesen deutliche positive Signale auf.

4.2.2.3 S100 β -Expression

Der Nachweis des Calcium-bindenden Peptids S100 β war durch eine diffuse bis fleckige Anfärbung von Zytoplasma und Fortsätzen gekennzeichnet. S100 β fand sich insbesondere auch in kurzen dünnen Fortsätzen, die fädige Verspannungen zwischen benachbarten Astrozyten bildeten (Abbildung 26).

Es war zu allen Untersuchungszeitpunkten eine relative konstante, starke S100 β -Expression zu verzeichnen. In 7 und 28 Tage alten BDV-infizierten und nicht infizierten Kulturen wurde S100 β von fast allen Zellen exprimiert. Auch bei BDV-infizierten Astrozyten am 42. DIV war die S100 β -Expression vergleichbar stark ausgeprägt. Zum Teil war auch bei nicht infizierten, 42 Tage alten Astrozyten eine S100 β -Expression von 80-100% zu finden (n=2). Die andere Hälfte der untersuchten Zellen war zu ca. 70 % S100 β -positiv (n=2). Die Unterschiede über die Zeit waren nicht signifikant (p=0,71). Auch die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen wiesen keine Signifikanz auf (p=0,91) (Abbildung 12 und Abbildung 11 sowie Tabelle 26).

Die quantitative Auswertung stimmte auch für S100 β mit den Ergebnissen der semiquantitativen Bestimmung überein. S100 β war über den gesamten Untersuchungszeitraum in fast allen Zellen nachweisbar. Am 7. DIV waren 98% der BDV-infizierten und der nicht infizierten Zellen S100 β positiv. Am 28. DIV zeigten dagegen nur 82% der BDV-infizierten Zellen eine positive Reaktion. Bei den nicht infizierten Zellen waren es 95%. Am 42. DIV reagierten dagegen wieder 95% der BDV-infizierten sowie der nicht infizierten Zellen S100 β positiv (Tabelle 31 und Abbildung 26).

Von den 52 Tage alte, 3 Wochen nicht passagierten, nicht infizierten Zellen waren 87% S100 β positiv. Somit war bei diesen Zellen ebenfalls eine gleichbleibend starke S100 β Reaktion vorhanden.

Bei 8 Monate alten, zwischenzeitlich kryokonservierten, BDV-infizierten Astrozyten zeigte S100 β ebenfalls eine starke Expression.

Die als Positivkontrollen verwendeten Gefrierschnitte aus Gehirnen adulter Lewis-Ratten wiesen deutliche positive Signale auf.

4.2.2.4 Nestin-Expression

Der Nachweis des Intermediärfilaments Nestin war durch eine Anfärbung des Zytoplasmas und der Fortsätze gekennzeichnet. Auffällig war dabei, dass sich insbesondere sehr lange astrozytäre Fortsätze darstellen ließen, mit denen die Zellen zum Teil über eine relativ große Distanz miteinander in Verbindung standen (Abbildung 27). Das Reaktionsmuster der Immunfluoreszenz war dabei teilweise diffus, überwiegend zeigte sich jedoch eine fädige bis zuckerwatteartige Anfärbung des Zytoskeletts.

Zu allen Untersuchungszeitpunkten zeigte sich eine relativ konstant hohe Nestin-Expression. Am 7., 28. und 42. DIV waren deutlich über 80% der nicht infizierten Astrozyten Nestin positiv. Bei den BDV-infizierten Zellen zeigten sich geringgradige Unterschiede in der Nestin-

Expression. Am 7. DIV waren ebenfalls deutlich über 80% der Zellen positiv. Am 28. und 42. DIV waren in jeweils einem Fall (n=1) nur ca. 70 % der Zellen Nestin-positiv, überwiegend zeigten aber auch diese Zellen eine starke Reaktion (n=3). Die Unterschiede über die Zeit waren nicht signifikant ($p=0,78$). Auch die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen wiesen keine Signifikanz auf ($p=0,39$) (Abbildung 12 und Abbildung 11 sowie Tabelle 27).

Die Auszählung der Zellen korrelierte sehr gut mit den Ergebnissen der semiquantitativen Auswertung. Nahezu alle BDV-infizierten (95%) und nicht infizierten Zellen (92%) waren am 7. DIV Nestin-positiv. Die Expression veränderte sich auch am 28. DIV nicht merklich, an dem sich 93% der BDV-infizierten und 99% der nicht infizierten Zellen Nestin-positiv darstellten. Der 42. DIV ergab mit 99% Nestin-positiven BDV-infizierten Zellen und 97% positiven nicht infizierten Zellen ein ähnliches Bild (Tabelle 31).

Bei den 52 Tage alte, 3 Wochen nicht passagierte, nicht infizierte Zellen zeigte sich dagegen ein deutlicher Abfall der Nestin-Expression. Es waren nur noch 18% der Zellen Nestin-positiv. Die Intensität des Nachweises war insgesamt sehr schwach.

Die als Positivkontrollen verwendeten Gefrierschnitte aus Gehirnen neonataler Lewis-Ratten wiesen deutliche positive Signale auf.

4.2.2.5 A2B5-Expression

A2B5 war zu keinem Untersuchungszeitpunkt in den Kulturen nachweisbar ($p=1,0$). Dies gilt sowohl für BDV-infizierte als auch für nicht infizierte Zellen ($p=1,0$) (Tabelle 31).

Die als Positivkontrolle verwendeten Gefrierschnitte neonataler Rattengehirne wiesen dagegen eine deutliche multifokale positive Reaktion auf.

ERGEBNISSE

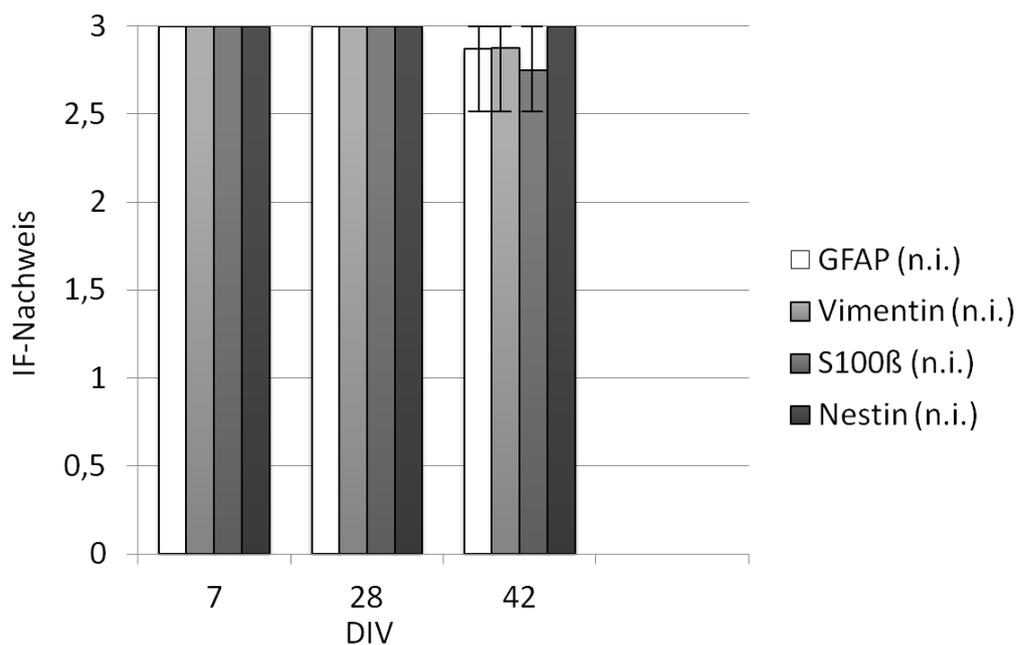


Abbildung 11: Nachweis von GFAP, Vimentin, S100β und Nestin in nicht infizierten Astrozytenkulturen mittels indirekter Immunfluoreszenz

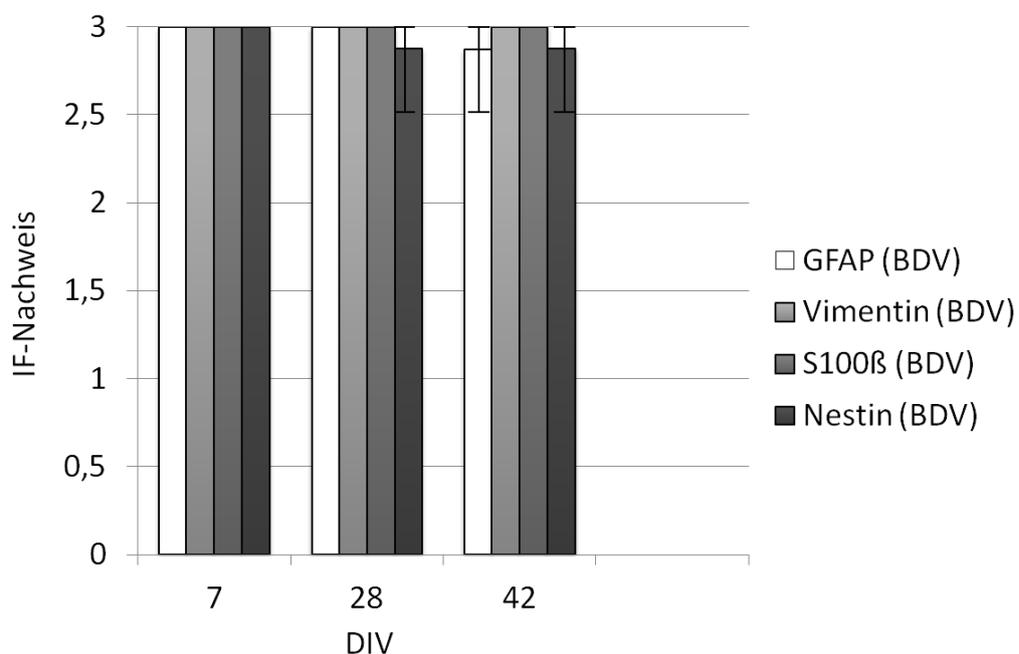


Abbildung 12: Nachweis von GFAP, Vimentin, S100β und Nestin in BDV-infizierten Astrozytenkulturen mittels indirekter Immunfluoreszenz

Abb. 11 und Abb. 12: x-Achse: DIV= days *in vitro*, Tage *in vitro*; y-Achse: IF-Nachweis= zur semiquantitativen Auswertung wurde die Anzahl positiver Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) beurteilt, Skala: 0-3; GFAP= glial fibrillary acidic protein; (BDV)= BDV-infiziert, Nachweis in BDV-infizierten Astrozytenkulturen; (n.i.)= nicht infiziert, Nachweis in nicht infizierten Astrozytenkulturen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert;

4.2.3 Astrozytendifferenzierung

4.2.3.1 GLAST-Expression

GLAST-positive Zellen waren durch eine positive Anfärbung des Zytoplasmas und der Fortsätze charakterisiert. Das Reaktionsmuster war dabei diffus mit multifokal verteilten, punktförmigen Arealen stärkerer Fluoreszenz. Ähnlich wie bei S100 β ließen sich mittels GLAST insbesondere auch kurze, dünne Fortsätze darstellen, die fädige Verspannungen zwischen benachbarten Astrozyten bilden (Abbildung 27).

Die GLAST-Expression war zu allen Untersuchungszeitpunkten relativ konstant. Es zeigten sich insgesamt lediglich geringere Schwankungen. Am 7. DIV fand sich eine GLAST-Expression bei > 80% der BDV-infizierten und eine Expression von ca. 70% bei den nicht infizierten Kulturen. Am Tag 28 *in vitro* wiesen ebenfalls > 80% der BDV-infizierten Zellen eine Expression auf (n=3), nur bei einem kleineren Teil der Zellen war die Expressionsrate mit ca. 60-70% schwächer ausgeprägt (n=1). Die nicht infizierten, 28 Tage alten Zellen zeigten zur Hälfte eine starke GLAST-Expression von 80% (n=2), die andere Hälfte dagegen eine leicht abgeschwächte, mittlere bis starke Reaktion von ca. 60-70% positiven Zellen (n=2). Am 42. DIV waren sowohl BDV-infizierte als auch nicht infizierte Zellen zu > 80% GLAST-positiv (n=3), nur ein kleinerer Teil der Zellen zeigte eine 70% GLAST-Expressionsrate (n=1). Die Unterschiede über die Zeit waren nicht signifikant (p=0,44). Auch die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen wiesen keine Signifikanz auf (p=0,29) (Abbildung 14 und Abbildung 13 sowie Tabelle 28).

Die semiquantitative Auswertung von GLAST stimmt mit der Auszählung der GLAST-positiven Zellen gut überein. Am 7. DIV waren 86% der BDV-infizierten Zellen GLAST-positiv, bei den nicht infizierten Kulturen 75%. BDV-infizierte 28 Tage alte Kulturen waren zu 85% GLAST-positiv, die gleichaltrigen nicht infizierten Zellen zu 89%. Nahezu alle BDV-infizierten (94%) und nicht infizierten (98%) Zellen waren am 42. DIV GLAST-positiv (Tabelle 31).

Bei 8 Monate alten, zwischenzeitlich kryokonservierten, BDV-infizierten Astrozyten zeigte GLAST eine schwache Expression.

Die als Positivkontrollen verwendeten Gefrierschnitte aus Gehirnen neonataler Lewis-Ratten wiesen deutliche positive Signale auf.

4.2.3.2 GLT-1-Expression

Die GLT-1-Expression war durch eine positive Anfärbung des Zytoplasmas und der Fortsätze charakterisiert. Das Reaktionsmuster zeigte sich dabei eher diffus, mit vereinzelt, stärker fluoreszierenden punktförmigen Arealen (Abbildung 27).

Am 7. DIV zeigten BDV-infizierte und nicht infizierte Kulturen eine gleichbleibend geringe GLT-1-Expression von < 30%. Am 28. DIV reichen die Expressionsrate der Zellen von geringgradig (<30%, n=2) über mittelgradig (30-80%, n=1) bis stark (>80%, n=1). Ein ähnliches Bild ergab sich auch für 28 Tage alte nicht infizierte Kulturen, bei denen sich teils eine geringe GLT-1-Expression (n=2), teils eine starke Expression zeigte (n=2). Ein ähnlich

variables Expressionsbild zeigen auch 42 Tage alte Kulturen. Bei den BDV-infizierten Zellen zeigen einige eine geringe GLT-1-Expression (n=2), einige eine mittlere (n=1) und andere eine starke Reaktion (n=1). Die Hälfte der nicht infizierten 42 Tage alten Astrozyten zeigen nur eine schwache GLT-1-Expression (n=2), einige eine mittlere (n=1) und andere eine mittlere bis starke (n=1). Die Unterschiede über die Zeit waren nicht signifikant (p=0,69). Auch die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Kulturen wiesen keine Signifikanz auf (p=0,99) (Abbildung 14 und Abbildung 13 sowie Tabelle 29).

Die Schwankungen in der Expression fanden sich interessanterweise in zwei unterschiedlichen Zellkulturpräparationen, so dass die quantitative Auswertung, die nur bei Untersuchung von Zellen einer Präparation vorgenommen wurde, eine eher gleichbleibend geringe GLT-1-Expression ergab.

Am 7. DIV waren 12% der BDV-infizierten Zellen GLT-1-positiv, bei den nicht infizierten Kulturen 15%. BDV-infizierte 28 Tage alte Kulturen waren zu 21% GLT-1-positiv, die gleichaltrigen nicht infizierten Zellen zu 4%. Sowohl BDV-infizierte als auch nicht infizierte, 42 Tage alte Astrozyten exprimierten zu 7% GLT-1 (Tabelle 31).

Bei 8 Monate alten, zwischenzeitlich kryokonservierten, BDV-infizierten Astrozyten zeigte sich eine GLT-1 eine mittlere Expression.

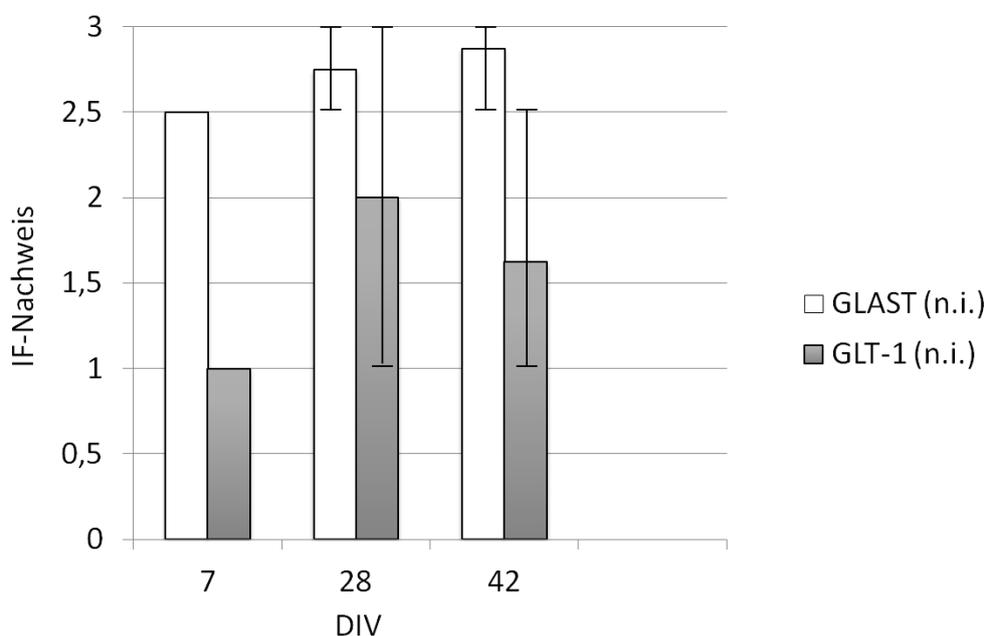


Abbildung 13: Nachweis von GLAST und GLT-1 in nicht infizierten Astrozytenkulturen mittels indirekter Immunfluoreszenz

x-Achse: DIV= days in vitro, Tage in vitro; y-Achse: IF-Nachweis= zur semiquantitative Auswertung wurde die Anzahl positiver Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) beurteilt, Skala: 0-3; (BDV)= BDV-infiziert, Nachweis in BDV-infizierten Astrozytenkulturen; (n.i.)= nicht infiziert, Nachweis in nicht infizierten Astrozytenkulturen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

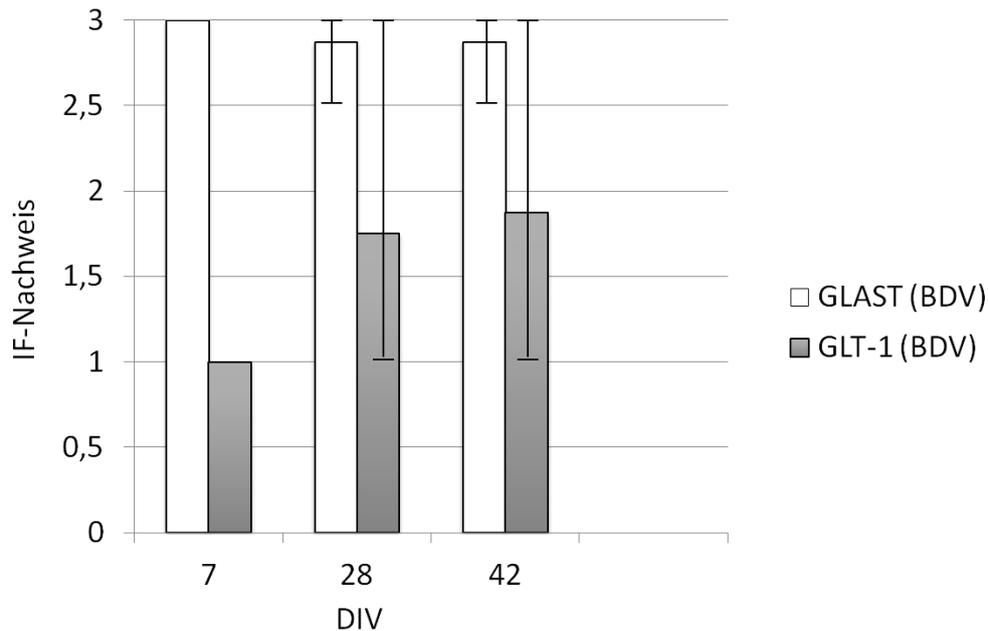


Abbildung 14: Nachweis von GLAST und GLT-1 in BDV-infizierten Astrozytenkulturen mittels indirekter Immunfluoreszenz

x-Achse: DIV= days in vitro, Tage in vitro; y-Achse: IF-Nachweis= zur semiquantitative Auswertung wurde die Anzahl positiver Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) beurteilt, Skala: 0-3; (BDV)= BDV-infiziert, Nachweis in BDV-infizierten Astrozytenkulturen; (n.i.)= nicht infiziert, Nachweis in nicht infizierten Astrozytenkulturen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

4.2.4 BDV-Infektion

Zum Nachweis der BDV-Infektion der Kulturen kam polyklonales anti-BDV Rattenserum (pRS) zum Einsatz. Im Verlauf der Infektion zeigte sich eine Zunahme BDV-positiver Zellen. Am Tag 7 *in vitro*, der dem 6. Tag der BDV-Infektion entspricht, war nur wenige Zellen BDV positiv. Am 28. DIV war eine mäßige Reaktion (Score 1,5; n=2) bis mittelstarke Reaktion (Score 2; n=2) zu sehen. Am 42. DIV waren bereits deutlich mehr Zellen BDV-positiv. Die Reaktion reichten von gering-mittelgradig infiziert (Score 1,5; n=1) bis stark infiziert (Score 3; n=1). Der Anstieg der BDV-Protein Expression war statistisch signifikant ($p=0,04$) (Abbildung 15 sowie Tabelle 30). Bei quantitativer Auswertung der BDV-positiven Zellen ergaben sich 7% positive Zellen am Tag 7 *in vitro*. Am 28. DIV waren bereits durchschnittlich 42% und am Tag 42 68% der Astrozyten BDV-positiv (Tabelle 31).

ERGEBNISSE

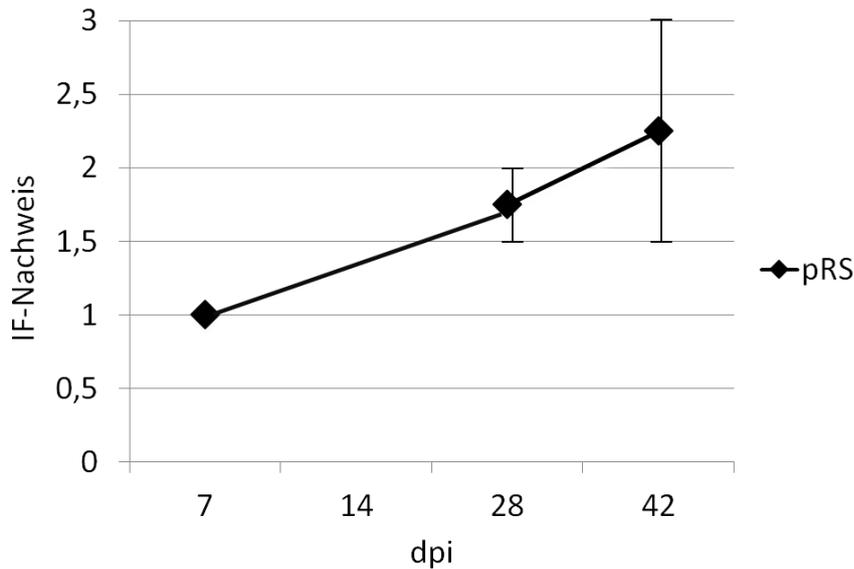


Abbildung 15: Nachweis von BDV-Proteinen in infizierten Astrozytenkulturen mittels indirekter Immunfluoreszenz

x-Achse: DIV= days in vitro, Tage in vitro; y-Achse: IF Reaktion= Stärke der Immunfluoreszenz Reaktion; (BDV)= BDV-infiziert, Nachweis in BDV-infizierten Astrozytenkulturen; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert; Skala: 0-3

4.3 NACHWEIS VON BDV-SPEZIFISCHEN ANTIGENEN MITTELS INDIREKTER IMMUNFLUORESZENZ

4.3.1 Nachweis und Ausbreitung der BDV-Infektion in primären corticalen Astrozytenkulturen

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die Expression der mit der Virushülle assoziierten Proteine **BDV-M** und **BDV-GP** hinsichtlich ihrer temporalen Ausbreitung am Tag 14, 28 und 42 p.i. (n=2) und ihrer intrazellulären Lokalisation in primären Astrozytenkulturen untersucht. Das Expressionsmuster des viralen Strukturproteins **BDV-N** wurde als Referenz herangezogen. Durch einen Vergleich der *in vitro* gewonnenen Daten mit bereits aus früheren *in vivo* Studien bekannten Ergebnissen (POROMBKA et al., 2008a; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008) sollte überprüft werden, inwieweit die Regulation der viralen Transkription und Translation in primären Astrozytenkulturen mit den Regulationsstrategien im Rattengehirn übereinstimmte.

4.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises von BDV-N, BDV-M und BDV-GP mittels Indirekter Immunfluoreszenz

Zusammenfassend unterschied sich der Nachweis von **BDV-N**, **BDV-M** und **BDV-GP** hinsichtlich der zeitlichen Ausbreitung, der Anzahl positiver Zellen und in Bezug auf die zellulären Reaktionen.

BDV-N fand sich zu allen Untersuchungszeitpunkten sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und in den Fortsätzen, wobei die bevorzugte intrazelluläre Lokalisation über die Zeit leicht variierte. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten war deutlich mehr BDV-N im Zytoplasma und in den Fortsätzen vorhanden. BDV-M war dagegen seltener im Kern nachweisbar. Überwiegend befand sich das Matrixprotein im Zytoplasma und in den Fortsätzen (Abbildung 30).

BDV-GP ließ sich in primären Astrozytenkulturen zu keinem Untersuchungszeitpunkt mittels IF nachweisen. Am 14. Tag p.i. waren jeweils nur wenige Zellen BDV-N und BDV-M positiv. Die BDV-N Expression stieg daraufhin vom Tag 28 bis zum Tag 42 kontinuierlich an. Bei BDV-M war der Anstieg von Tag 28 zum Tag 42 nur geringgradig ausgeprägt, zu beiden Zeitpunkten fanden sich zwischen 30 und 80% positive Zellen (Abbildung 16, Abbildung 29 und Abbildung 37).

Keines der Proteine war in den nicht infizierten Zellen nachweisbar (Abbildung 37). Eine detaillierte Darstellung des Nachweises der BDV-spezifischen Proteine findet sich unter 4.3.3 und 4.3.4.

Mittels explorativer zweifaktorieller Varianzanalyse konnten allerdings keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen Proteinexpression und Tag (28. und 42. dpi) ermittelt werden (BDV-N, BDV-M und BDV-GP $p=0,25$). Auch mittels explorativer einfaktorieller Varianzanalyse ließen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen Proteinexpression und Tag (14., 28. und 42. dpi) feststellen (BDV-N, BDV-M und BDV-GP $p=0,1087$).

ERGEBNISSE

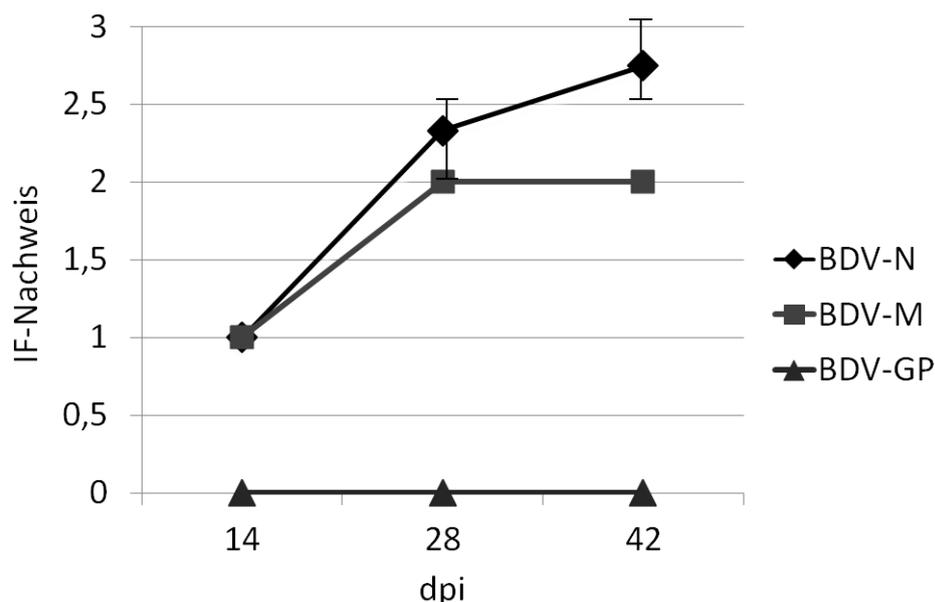


Abbildung 16: Nachweis von BDV-N, BDV-M und BDV-GP in Astrozytenkulturen mittels indirekter Immunfluoreszenz

x-Achse: dpi= days post infection, Tage nach Infektion, y-Achse: semiquantitative Auswertung positiver Zellen in der indirekten Immunfluoreszenz (IF); BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-M = BDV-Matrixprotein; BDV-GP = BDV-Glykoprotein; arithmetischer Mittelwert; Fehlerbalken = minimaler/maximaler Wert.

4.3.3 Nachweis von BDV-N

Die **zeitliche Ausbreitung** von BDV-N zwischen Tag 14 und Tag 42 p.i. wies einen deutlichen Anstieg auf. Am Tag 14 p.i. waren weniger als 30% der Zellen positiv. Am Tag 28 p.i. zeigte sich eine mäßige Expression, die zum Tag 42 weiter auf > 80% infizierte Zellen zunahm (Abbildung 16, Abbildung 29 und Tabelle 32). Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten zur Überprüfung der BDV-Infektion im Zuge der Testung der Reifungs- und Differenzierungsmarker (4.2.4).

BDV-N war in Kern, Zytoplasma und Fortsätzen lokalisiert. Die **intrazelluläre Lokalisation** und **das allgemeine Reaktionsmuster** verschoben sich geringgradig über die Zeit (Abbildung 30). Am Tag 14 p.i. waren überwiegend punktförmige Reaktionen in den Kernen infizierter Astrozyten zu finden. Daneben wies auch das Zytoplasma eine teils diffuse und teils punktförmige Fluoreszenz auf. In den Zellfortsätzen fanden sich Reaktionsprodukte nur selten. Am Tag 28 p.i. waren dagegen häufiger diffuse Reaktionen in Zytoplasma und den Fortsätzen zu sehen. Daneben wiesen die Kerne, das Zytoplasma und auch die Fortsätze punktförmige Reaktionsprodukte auf. Am Tag 42 p.i. nahm die diffuse Reaktion des Zytoplasmas und der Fortsätze weiter zu. Auch zu diesem Zeitpunkt fanden sich punktförmige Reaktionen in Kern, Zytoplasma und den Fortsätzen (Abbildung 30). Die als Positivkontrollen verwendeten BDV-infizierten MDCK-Zellen und langzeitkultivierten, BDV-infizierte Astrozyten zeigten positive Reaktionen. BDV-N fand sich bei den langzeitkultivierten Astrozyten überwiegend diffus und seltener punktförmig im Zytoplasma und nur noch selten im Kern.

4.3.4 Nachweis von BDV-M

Die **zeitliche Ausbreitung** von BDV-M ergab einen Anstieg im Zeitverlauf der Infektion. Insgesamt wurde BDV-M in weniger Zellen exprimiert als BDV-N. Am Tag 14 p.i. traten einzelne positive Zellen auf. Am Tag 28 p.i. waren etwa doppelt so viele Zellen positiv. Am Tag 42 p.i. war eine weitere leichte Zunahme der positiven Zellen zu verzeichnen, es waren zwischen 30 und 80% der Zellen BDV-M positiv (Abbildung 16, Abbildung 29 und Tabelle 33).

Die **intrazelluläre Lokalisation** und **das allgemeine Reaktionsmuster** von BDV-M unterlag ebenfalls geringgradigen zeitlichen Verschiebungen (Abbildung 30). BDV-M war überwiegend im Zytoplasma und den Fortsätzen lokalisiert. Dort zeigten sich positive Reaktionen vor allem in punktförmigen, selten auch in diffusen Fluoreszenzsignalen. Die diffusen Reaktionen fanden sich tendenziell eher zu späten Zeitpunkten p.i.. Selten stellte sich BDV-M auch punktförmig im Zellkern dar. Die nukleären Reaktionen kamen zu früheren Infektionszeitpunkten tendenziell öfter vor als zu späten. Die als Positivkontrollen verwendeten BDV-infizierten MDCK-Zellen und langzeitkultivierten, BDV-infizierten Astrozyten zeigten positive Reaktionen.

4.3.5 Nachweis von GFAP

Zur Kontrolle der Reinheit der für den BDV-Protein-Nachweis verwendeten Astrozyten wurde GFAP nachgewiesen. Das Intermediärfilament war zu jedem Zeitpunkt sowohl bei BDV-infizierten als auch nicht infizierten Zellen stark nachweisbar. Es waren ca. 80-90% der Zellen GFAP-positiv (Tabelle 35).

4.4 NACHWEIS VON BDV-SPEZIFISCHEN ANTIGENEN MITTELS WESTERN BLOT

Zusätzlich zum morphologischen Nachweis wurde ein Western Blot zum Nachweis von **BDV-N**, **BDV-M** und **BDV-GP** durchgeführt.

Mittels Western Blot wurde die Expression von BDV-N, BDV-M und BDV-GP, zu den Zeitpunkten 21, 28, 42 p.i. in primären Astrozytenkulturen untersucht. Die Untersuchung fand an Material aus zwei unabhängigen Zellkulturpräparationen statt (n=2).

In der IF konnte kein BDV-GP detektiert werden. Wie aus Voruntersuchungen an BDV-infizierten MDCK-Zellen bekannt war, gelang eine Detektion des BDV-Glykoproteins mittels Western-Blot nur nach vorheriger Anreicherung des Proteins mittels Lektinfällung (BAYER, 2010). Um zu untersuchen, ob BDV-infizierte primäre Astrozyten eventuell nur geringe Mengen an BDV-GP exprimieren, wurde bei den für BDV-GP Nachweis vorgesehenen Proteinproben vom Tag 21, 28 und 42 p.i. zunächst eine Lektinpräzipitation durchgeführt und die Proben anschließend in den Western Blot eingesetzt. Da durch Lektinfällung nur Glykoproteine angereichert werden, konnten BDV-N und BDV-M nicht aus denselben Proteinproben wie BDV-GP nachgewiesen werden.

Um die Frage zu beantworten, ob Astrozyten BDV-Glykoprotein überhaupt synthetisieren, wurden auch lektinfällte Proteinlysate langzeitkultivierter, zu 94% BDV-infizierter

Astrozyten als Kontrollen verwendet. Dies sollte zeigen ob bei Astrozyten am Tag 21, 28, und 42 p.i. eine eventuell vorhandene, aber geringe Glykoproteinexpression unterhalb der zu detektierbaren Nachweisgrenze liegt.

Abweichend von dem unter 3.8.4 beschriebenen Proteinisoliationsprotokoll wurden die mittels Proteinaufreinigungssäulchen isolierten Totalproteine der Positivkontrollen (zu 94% BDV-infizierten Astrozyten und BDV-infizierten MDCK-Zellen) anschließend nicht mit Aceton gefällt. Eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde bei diesen Proben nicht durchgeführt.

4.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen der mittels AllPrep RNA/Protein Kit® (Qiagen GmbH, Hilden) gewonnenen Proben aus BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozyten waren relativ gering. Die durchschnittliche Proteinkonzentration betrug 5,68 µg/µl (n=12). Die Werte reichten von nur 2,13 µg/µl bis maximal 14,91 µg/µl (siehe Tabelle 22 unter 9.4).

4.4.2 Nachweises von BDV-N, BDV-M und BDV-GP

BDV-N und **BDV-M** konnten am Tag 21, 28 und 42 p.i. in BDV-infizierten primären Astrozyten nachgewiesen werden. Die Banden lagen bei den erwarteten Größen von 38/40 kDa für BDV-N und 16 kDa für BDV-M (Abbildung 33 und Abbildung 34).

Die Detektion auf Nitrozellulosemembranen gelang sowohl mittels BDV-N-spezifischem monoklonalem Antikörper „Bo-18“ als auch mittels BDV-M-spezifischem polyklonalem Antikörper „M128“. BDV-N ließ sich mittels „Bo-18“ Antikörper auch auf PVDV-Blottingmembranen problemlos nachweisen. Dagegen war bei Verwendung des BDV-M-spezifischen Antikörpers „M128“ auf PVDV-Membranen ein relativ hoher unspezifischer Hintergrund vorhanden. Die Detektion der BDV-M-spezifischen Bande war trotzdem möglich.

In permanent mit BDV-infizierten MDCK-Zellen und in zu 94% BDV-infizierten Astrozyten ließen sich BDV-N und BDV-M ebenfalls nachweisen.

BDV-GP ließ sich in primären Astrozytenkulturen zu keinem Untersuchungszeitpunkten (21, 28 oder 42 Tage p.i.) nachweisen (Abbildung 35). Durch den BDV-GP-C spezifischen polyklonalen Antikörper „gp2“ wurden zahlreiche Banden markiert, die jedoch nicht bei der zu erwartenden Größe lagen und damit als unspezifische Reaktionen zu werten sind. Banden mit einer Größe von 43 kDa (C-terminales Spaltfragment des BDV-GP) oder 94 kDa (ungespaltene BDV-GP) ließen sich dagegen nicht detektieren. Die Ergebnisse des Western Blot Nachweises entsprechen somit denen der indirekten Immunfluoreszenz, in der BDV-GP mittels „gp2“ Antikörper ebenfalls nicht nachweisbar war.

Interessanterweise konnte jedoch in zu 94% infizierten Astrozyten eine BDV-GP-C spezifische Bande mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 40) (LABITZKE, 2011). Die als Positivkontrollen verwendeten BDV-infizierten MDCK-Zellen wiesen ebenfalls eine Bande in

der erwarteten Größe von 43 kDa auf. Der BDV-GP-Nachweis gelang jedoch nur bei Verwendung einer Nitrozellulosemembran.

In Proteinlysaten nicht infizierter Astrozytenkulturen waren zu keinem Untersuchungszeitpunkt BDV-N-, BDV-M- oder BDV-GP-spezifisches Antigen nachzuweisen (Abbildung 33, Abbildung 34 und Abbildung 35).

4.4.3 Nachweis von β -Actin und GFAP

Als weitere Kontrollen für die korrekte Durchführung der Proteinisolation und des Western Blots wurden β -Actin und GFAP verwendet. Der zelluläre Marker β -Actin und der astrozytenspezifische Marker GFAP waren sowohl bei BDV-infizierten als auch nicht infizierten Astrozyten am Tag 21, 28 und 42 p.i. nachweisbar. Die Bande für β -Actin lag wie erwartet bei 42 kDa, die für GFAP bei 50 kDa (Abbildung 41 im Anhang 9.5).

4.5 NACHWEIS VON BDV-RNA MITTELS FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH)

Zum Nachweis der viralen RNAs wurden sowohl die *Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung* (FISH) als auch die *real-time* PCR verwendet. Die FISH diente dem Nachweis der Expression der positiv orientierten RNAs **BDV-N mRNA**, **BDV-M mRNA** (BDV-Intron I +ssRNA) und **BDV-GP mRNA** (BDV-Intron II +ssRNA) zu ausgewählten Zeitpunkten. Die Untersuchung wurde an den Tagen 28 und 42 p.i. (n=2) an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Zellpellets durchgeführt.

Durch die Untersuchung des zeitlichen Verteilungsmusters und der intrazellulären Lokalisation der mRNAs sollten morphologische Daten zur Transkriptionsstrategie des BDV in primären Astrozytenkulturen gewonnen werden. Als Referenz für die virale Transkriptionseffizienz wurde BDV-N mRNA nachgewiesen, da BDV-N von allen BDV-Proteinen am stärksten exprimiert wird. Exemplarisch wurden anhand des Nachweises des negativ orientierten Genomabschnitts **BDV-N vRNA** (virale RNA; genomische RNA; BDV-N -ssRNA) morphologische Daten zur Virusreplikation erhoben. Durch einen Vergleich der *in vitro* gewonnenen Daten mit bereits aus früheren *in vivo* Studien bekannten Ergebnissen (POROMBKA et al., 2008a; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008) sollte überprüft werden, inwieweit die Regulation der viralen Transkription in primären Astrozytenkulturen mit den Regulationsstrategien in Rattengehirnen übereinstimmen.

4.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung

BDV-N mRNA (BDV-N +ssRNA), **BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA)** und **BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA)** waren zu beiden Untersuchungszeitpunkten in primären Astrozyten nachweisbar. Sie unterschieden sich jedoch bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation und der Anzahl positiver Zellen.

Auffällig war insbesondere der Unterschied der intrazellulären Lage von BDV-N mRNA und BDV-GP mRNA (Abbildung 31). BDV-N mRNA kam überwiegend im Zytoplasma vor. Daneben fanden sich in geringerem Maße auch positive Kernreaktionen. BDV-GP mRNA war dagegen fast ausschließlich im Kern und nur vereinzelt im Zytoplasma vorhanden. BDV-M mRNA fanden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten variabel, mal im Nukleus, mal im Zytoplasma der Zellen. Sehr selten gab es Zellen, in denen BDV-M mRNA-Reaktionsprodukte gleichzeitig in beiden Zellkompartimenten vorlagen.

BDV-N mRNA wurde in mehr Zellen exprimiert als die anderen untersuchten mRNAs. Der Nachweis ging vom Tag 28 zum Tag 42 p.i. leicht zurück. BDV-M mRNA wurde sowohl am Tag 28 als auch am Tag 42 p.i. nur von Einzelzellen exprimiert. Der Nachweis der BDV-GP mRNA stieg dagegen innerhalb des Untersuchungszeitrahmens an und wurde am Tag 42 p.i. fast in genau so vielen Zellen exprimiert wie die BDV-N mRNA.

Mittels explorativer zweifaktorieller Varianzanalyse konnten allerdings keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen BDV mRNA Expression und Tag 28 und 42 p.i. ermittelt werden (BDV-N mRNA, BDV-M mRNA und BDV-GP mRNA $p=0,0661$).

Der Nachweis **BDV-N genRNA (BDV-N –ssRNA, BDV-N vRNA)** stieg vom Tag 28 p.i. (< 30% der Zellen positiv) zum Tag 42 p.i. (zwischen 30 und 80% der Zellen positiv) an. Dieser Anstieg korrelierte somit nicht mit dem Abfall der entsprechenden mRNA (Abbildung 31). Interessanterweise war am Tag 42 p.i. BDV-N vRNA etwa zu gleichen Teilen im Nukleus wie im Zytoplasma der Astrozyten zu finden.

Eine detaillierte Darstellung des Nachweises der BDV spezifischen RNAs findet sich unter 4.5.2 bis 4.5.4.

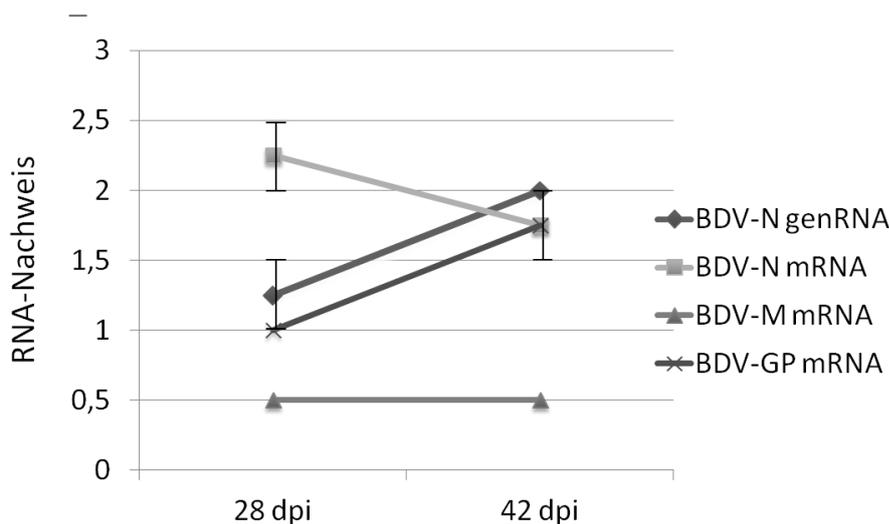


Abbildung 17: Nachweis der BDV-N vRNA (= genRNA, genomische RNA), BDV-N mRNA, BDV-M mRNA und BDV-GP mRNA in Astrozytenkulturen mittels FISH

FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; x-Achse: dpi, days post infection, Tage nach BDV-Infektion; y-Achse: Grad des RNA Nachweises; vRNA = virale -ssRNA; mRNA = messenger RNA, +ssRNA; BDV-N: BDV-Nukleoprotein; BDV-M: BDV-Matrixprotein; BDV-GP: BDV-Glykoprotein; arithmetischer Mittelwert, Fehlerbalken: minimaler/maximaler Wert

4.5.2 Nachweis von BDV-N mRNA (BDV-N +ssRNA)

Die **intrazelluläre Lokalisation** und das **allgemeine Reaktionsmuster** der BDV-N mRNA blieben zu den Untersuchungszeitpunkten relativ konstant. Die RNA fand sich im Zytoplasma, wo sie als diffuse, seltener auch punktförmige bis granuläre Reaktionsprodukte darstellbar war. Daneben waren zu allen Untersuchungszeitpunkten im Kern BDV-N mRNA vorhanden, die sich als punktförmige oder granuläre, sehr selten auch als diffuse Signale darstellen ließ. Insgesamt überwog jedoch die zytoplasmatische Reaktion leicht gegenüber der Kernreaktion (Abbildung 31).

Die **zeitliche Ausbreitung** von BDV-N mRNA ergab nur eine geringgradige Veränderung. Die Zahl der positiven Zellen fiel vom Tag 28 zum Tag 42 p.i. leicht ab. Am Tag 28 p.i. war eine Expression in 30-80% der Zellen (n=2), am Tag 42 p.i. eine BDV-N mRNA Expression in nur knapp über 30% der Zellen (n=2) zu verzeichnen (Tabelle 37, Abbildung 17 und Abbildung 31).

In den nicht infizierten Kulturen war zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung BDV-N mRNA nachweisbar (Abbildung 38). Die als Positivkontrolle verwendeten BDV-infizierten MDCK-Zellpellets zeigten zu ca. 80% positive Reaktionen im Zytoplasma, die sich als granuläre und diffuse Reaktionsprodukte darstellten. Bei ca. 45% der MDCK-Zellen war BDV-N +ssRNA auch als granuläres Signale im Kern nachweisbar.

4.5.3 Nachweis von BDV-M mRNA (BDV-Intron-I +ssRNA)

Das **allgemeine Reaktionsmuster** und die **intrazelluläre Lokalisation** der für BDV-M kodierenden BDV-Intron-I +ssRNA waren unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt variabel. Teilweise ließen sich schwache granuläre Reaktionsprodukte im Zellkern nachweisen. Dann wieder fanden sich granuläre Reaktionsprodukte im Zytoplasma. Extrem selten gab es Zellen, in denen Reaktionsprodukte gleichzeitig in beiden Zellkompartimenten vorlagen. (Abbildung 31).

Bezüglich der **zeitlichen Ausbreitung** ergaben sich keine Veränderungen der BDV-M mRNA Expression. Sowohl am Tag 28 als auch am Tag 42 p.i. waren nur einzelne Zellen schwach positiv (n= jeweils 2) (Tabelle 38, Abbildung 17 und Abbildung 31).

In nicht infizierten Kulturen waren zu keinem Zeitpunkt BDV-M mRNA nachweisbar (Abbildung 38). Die als Positivkontrolle verwendeten BDV-infizierten MDCK-Zellen wiesen ebenfalls nur sehr schwache nukleäre oder zytoplasmatische, granuläre Reaktionen in Einzelzellen auf.

4.5.4 Nachweis von BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA)

Die **intrazelluläre Lokalisation** der für BDV-GP kodierenden mRNA stellte sich als Reaktionsprodukte im Nukleus und nur vereinzelt im Zytoplasma dar (Abbildung 31). Die nukleären Signale waren hauptsächlich durch eine punktförmige oder granuläre Fluoreszenz charakterisiert. Wesentlich seltener fand sich eine diffuse Kernreaktion. Die wenigen zytoplasmatischen Reaktionen zeichneten sich durch eine punktförmige Fluoreszenz aus.

Die **zeitliche Ausbreitung** der BDV-GP mRNA ergab eine Zunahme über die Zeit. Am Tag 28. p.i. waren weniger als 30% der Zellen positiv (n=2). Am Tag 42 p.i. stieg die Expression auf annähernd mittleres Niveau von 30-80% infizierte Zellen an (n=2) (Tabelle 39, Abbildung 17 und Abbildung 31).

In nicht infizierten Astrozyten war zu keinem Zeitpunkt BDV-GP mRNA nachweisbar (Abbildung 38). BDV-infizierte MDCK-Zellen zeigten eine BDV-GP mRNA Expression in über 80% der Zellen. Die Reaktionsprodukte fanden sich überwiegend im Zytoplasma, in etwas geringerem Maße auch im Nukleus.

4.5.5 Nachweis von genomischer BDV-N vRNA (BDV-N genRNA, BDV-N – ssRNA)

Die **intrazelluläre Lokalisation** und das **allgemeine Reaktionsmuster** der BDV-N vRNA veränderten sich über die Zeit (Abbildung 32). Am Tag 28 p.i. überwogen die Kernreaktionen, wo die positiven Signale als feingranuläre, seltener auch als diffuse Aggregate charakterisiert waren. Bei einzelnen Zellen konnten am 28. Tag p.i. auch geringe granuläre Signale im Zytoplasma detektiert werden. Am Tag 42 p.i. traten granuläre Zytoplasmareaktionen dagegen in etwa genauso häufig auf wie granuläre Signale in den Zellkernen. Daneben fanden sich auch am Tag 42 p.i. sehr selten auch diffuse Kernreaktionen.

BDV-N vRNA ließ sich zu allen Untersuchungszeitpunkten p.i. nachweisen. Die **zeitliche Ausbreitung** der genomischen BDV-N RNA ergab einen Anstieg vom Tag 28 zum Tag 42 p.i.. Am Tag 28 p.i. waren lediglich etwa 30% der Zellen positiv (n=2). Am Tag 42 waren deutlich über 30%, aber noch unter 80% der Zellen positiv für BDV-N vRNA (n=2) (Tabelle 36, Abbildung 17 und Abbildung 32).

BDV-N vRNA Signale waren zu keinem Zeitpunkt in den nicht infizierten Kulturen darstellbar. Die BDV-infizierten MDCK Zellpellets waren zu etwa 60% für BDV-N vRNA positiv. Das Signal war strikt auf den Zellkern beschränkt. Granuläre Reaktionsprodukte überwogen deutlich gegenüber seltenen diffusen Kernreaktionen.

4.6 NACHWEIS VON BDV-RNA MITTELS REAL-TIME PCR (qPCR)

Die real-time PCR dient der absoluten Quantifizierung von viralen Transkripten. Mittels qPCR wurde die Transkriptionseffizienz der für BDV-N, BDV-M und BDV-GP kodierenden mRNAs in primären Astrozytenkulturen 21, 28 und 42 Tage p.i. untersucht. Die normalisierten Werte der BDV-spezifischen Kopienzahlen wurden in der vorliegenden Arbeit als „Kopien“ bezeichnet.

4.6.1 Sensitivität und Spezifität der Real-time PCR

Zur Erstellung von Standardkurven wurden Log_{10} Standardverdünnungsreihen aus Plasmid-DNA in (3.12.1) verwendet. Diese wurden als Referenz für die absolute Quantifizierung BDV-spezifischer und zellulärer Transkripte benutzt. In den Verdünnungsreihen konnten in

ERGEBNISSE

Vorversuchen bis zu 10 DNA-Kopien pro μl verlässlich nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die absolute Quantifizierung der RNAs wurden Verdünnungsstufen von 10^7 bis 10^4 Kopien/ μl für BDV-M, BDV-GP, GAPDH, HPRT und SDHS spezifische Transkripte jeweils im Doppelansatz eingesetzt. Für das am stärkste exprimierte Transkript BDV-N wurden Verdünnungsreihen von 10^8 bis 10^5 , ebenfalls im Doppelansatz, verwendet. Der Korrelationskoeffizient R^2 ist ein Maß dafür, wie genau die einzelnen Standardpunkte auf der linearen Standardkurve liegen. Ein guter Wert für R^2 ist annähernd 0,999. Der Korrelationskoeffizient der qPCR Läufe war immer $\geq 0,997$. Die Reaktionseffizienz der real-time PCR lag für alle zellspezifischen und BDV-Transkripte bei mindestens 84 %. Eine Übersicht über die Reaktionsparameter der real-time PCR gibt Tabelle 16. Als weitere Kontrolle wurde in jedem Lauf auch die jeweilige Kopienzahl von zu 94% BDV-infizierten Astrozyten ermittelt.

Tabelle 16: Übersicht der Reaktionsparameter der einzelnen real-time PCR Läufe

SVR	R^2	Effizienz	Mittlerer Ct 10^7	mittlerer Ct 10^4	Threshold
GAPDH*	0,999	89	15,56	26,35	0,0734
SDHS*	0,999	94	15,76	26,14	0,0654
HPRT*	0,997	90	15,21	25,93	0,0471
BDV-N	0,998	88	16,0 ⁺	23,13 ⁺	0,0212
BDV-Intron I	0,998	84	11,76	23,12	0,0199
BDV-Intron II	0,999	86	13,05	24,15	0,0193

*= die angegebene Effizienz, der mittlere Ct 10^7 und 10^4 Wert und der Threshold wurden für GAPDH, SDHS und HPRT aus 3 real-time PCR Läufen ermittelt; R^2 = Korrelationskoeffizient der Standardpunkte zur Standardreihe; Effizienz = Reaktionseffizienz; Threshold= Schwellenwert; mittlerer Ct 10^7 = Mittelwert der threshold cycle für 10^7 Kopien/ μl ; mittlerer Ct 10^4 = Mittelwert der threshold cycle für 10^4 Kopien/ μl ; +: für Quantifizierung der BDV-N mRNA wurde abweichend Standardverdünnungsreihen von 10^8 bis 10^5 Kopien/ μl verwendet; BDV-Intron I kodiert für BDV-M; BDV-Intron II kodiert u.a. für BDV-GP

Die Spezifität der real-time PCR wurde durch eine No template control (NTC) ermittelt. Als weitere Negativkontrolle wurden exemplarisch die cDNA von nicht infizierten, 42 Tage alten Astrozyten auf das Vorhandensein von BDV-N mRNA getestet. In keinem real-time PCR Lauf konnte in der Negativkontrolle oder der NTC ein positives BDV-spezifisches Signal detektiert werden.

4.6.2 Referenzgene GAPDH, SDHS, HPRT

Aus den primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen konnte zu allen Untersuchungszeitpunkten p.i. mRNA für die Referenzgene GAPDH, SDHS und HPRT nachgewiesen werden. Die primär quantifizierte GAPDH Kopienzahl lag zwischen 1.303.067 und 1.394.823 Kopien. Die primär quantifizierte Kopienzahl von SDHS betrug 43.827 bis 67.190 Kopien, die von HPRT 15.378 bis 31.180 Kopien (Tabelle 40).

4.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des Nachweises BDV-spezifischer Transkripte

BDV-N-spezifische Transkripte (BDV-N +ssRNA) waren in primären Astrozytenkulturen zu allen Untersuchungszeitpunkten und in allen Proben in deutlich höherer Kopienzahl nachweisbar als BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA) und BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA) (Abbildung 18). Deutliche Unterschiede zwischen den quantifizierten Mengen an BDV-M- und BDV-GP-spezifischen Transkripten waren zu keinem Zeitpunkt feststellbar (Abbildung 19).

Beim zeitlichen Verlauf der Expression der verschiedenen BDV-spezifischen Transkripte fanden sich Unterschiede. Eine Veränderung der Transkriptmengen zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. fand sich für BDV-N mRNA und BDV-M mRNA. Die Menge an BDV-N mRNA Kopien fiel über den gesamten Untersuchungszeitraum ab (Abbildung 18). Bei BDV-M mRNA fand sich ein deutlicher Abfall nur vom Tag 21 zum Tag 28. BDV-GP mRNA lag zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten p.i. in relativ konstanten Konzentrationen vor.

Die Ergebnisse sind detailliert unter 4.6.4 bis 4.6.4.3 dargestellt.

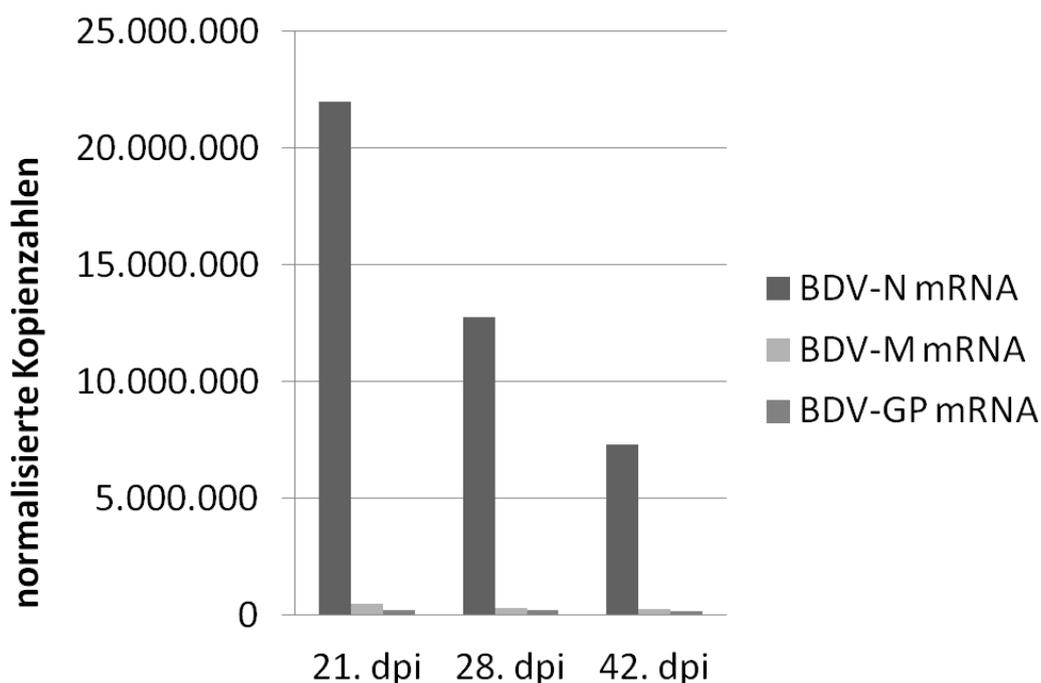


Abbildung 18: Expression der BDV-spezifischen Transkripte in Astrozytenkulturen (qPCR)

y-Achse: normalisierte BDV-spezifische Kopienzahlen; arithmetischer Mittelwert; dpi: days post infection, Tage nach BDV-Infektion; BDV-N = BDV-Nukleoprotein, BDV-M = BDV-Matrixprotein; BDV-GP = BDV-Glykoprotein, BDV-M mRNA = BDV-Intron I haltige +ssRNA; BDV-GP mRNA = BDV-Intron II haltige +ssRNA

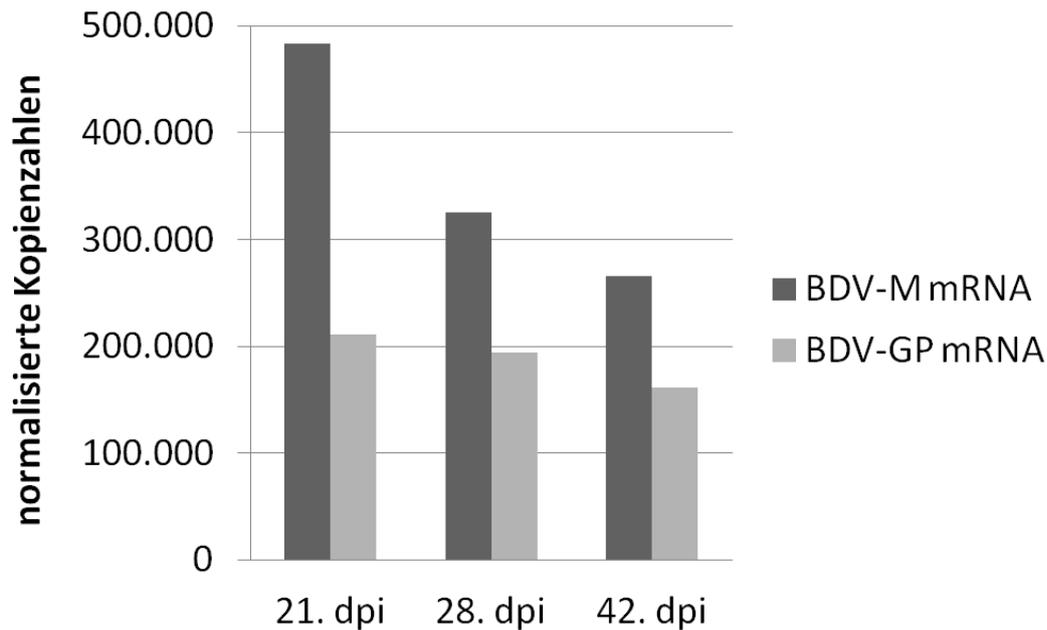


Abbildung 19: Expression der BDV-M mRNA und BDV-GP mRNA in Astrozytenkulturen (qPCR)
 y-Achse: normalisierte BDV-spezifische Kopienzahlen; arithmetischer Mittelwert; dpi: days post infection, Tage nach BDV-Infektion; BDV-M = BDV-Matrixprotein; BDV-GP = BDV-Glykoprotein, BDV-M mRNA = BDV-Intron I haltige +ssRNA; BDV-GP mRNA = BDV-Intron II haltige +ssRNA

4.6.4 Nachweis der BDV-spezifischen Transkripte

Das quantitative Vorkommen von BDV-N, BDV-Intron I (BDV-M) und BDV-Intron II (BDV-GP) spezifischer +ssRNA wurde am Tag 21, 28 und 42 p.i. in BDV-infizierten primären Astrozytenkulturen untersucht. Bei allen infizierten Astrozyten war BDV-spezifische RNA zu allen Untersuchungszeitpunkten p.i. nachweisbar (Abbildung 39). In den cDNA Proben der nicht infizierten Zellen konnte keine virusspezifische RNA nachgewiesen werden.

4.6.4.1 BDV-N-spezifische Transkripte (BDV-N mRNA, BDV-N +ssRNA)

Die Expression BDV-N spezifischer Transkripte fiel innerhalb des Untersuchungszeitraums kontinuierlich ab (Abbildung 18). Initial konnte am Tag 21 p.i. $2,19 \times 10^7$ Kopien BDV-N spezifischer +ssRNA nachgewiesen werden. Die Mengen der BDV-spezifischen Transkripte fiel am Tag 28 um den Faktor von ca. 1,72 auf $1,28 \times 10^7$ Kopien. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes fiel die Menge der BDV-N +ssRNA weiter ab und erreichte am Tag 42 p.i. $7,29 \times 10^6$ Kopien (Faktor 1,75). Insgesamt waren am Tag 21 p.i. ca. 3 x mehr BDV-N spezifische Kopien vorhanden als am Tag 42 p.i. (siehe Tabelle 41).

Die Transkriptmenge der als Positivkontrolle untersuchten zu 94% BDV-infizierten Astrozyten betrug $1,74 \times 10^7$ BDV-N mRNA spezifische Kopien.

4.6.4.2 BDV-M-spezifische Transkripte (BDV-M mRNA, BDV-Intron I +ssRNA)

Auch beim Verlauf der BDV-M mRNA Kopienzahlen war über den Untersuchungszeitraum ein Rückgang der Kopienzahl zu verzeichnen (Abbildung 19). Am Tag 21. p.i. lag die Expression bei $4,84 \times 10^5$ Kopien und fiel am 28. Tag p.i. um den Faktor von ca. 1,49 auf $3,25 \times 10^5$ Kopien ab. Im weiteren Verlauf fiel die Anzahl BDV-M mRNA Kopienzahlen am Tag 42 p.i. weiter geringfügig bis auf $2,65 \times 10^5$ Kopien ab (Faktor: 1,2). (siehe Tabelle 41).

Die Transkriptmenge der als Positivkontrolle untersuchten zu 94% BDV-infizierten Astrozyten betrug $4,62 \times 10^5$ BDV-M mRNA spezifische Kopien.

4.6.4.3 BDV-GP-spezifische Transkripte (BDV-GP mRNA, BDV-Intron II +ssRNA)

Das Expressionsmuster der BDV-GP-spezifischen Transkripte verminderte sich geringgradig über den Untersuchungszeitraum (Abbildung 19). Die initial quantifizierte Menge an BDV-GP mRNA betrug am Tag 21 p.i. $2,11 \times 10^5$ Kopien. Im weiteren Untersuchungsverlauf sank die Menge an quantifizierten Transkripten nur geringgradig um den Faktor 1,09 ab, am Tag 28 p.i. wurden $1,95 \times 10^5$ Kopien nachgewiesen, am Tag 42 p.i. $1,61 \times 10^5$ Kopien (Faktor 1,21) (siehe Tabelle 41).

Die Transkriptmenge der als Positivkontrolle untersuchten zu 94% BDV-infizierten Astrozyten betrug $2,13 \times 10^5$ BDV-GP mRNA spezifische Kopien.

4.7 KORRELATION DER ERGEBNISSE DER BDV-PROTEIN- UND m-RNA-NACHWEISE

4.7.1 Korrelation der Ergebnisse zum Nachweis von BDV-Proteinen (IF und WB)

Mittels Western Blot wurden die in der indirekten Immunfluoreszenz gewonnenen Ergebnisse bezüglich der BDV-Protein Expression überprüft.

BDV-N und **BDV-M** konnte sowohl in der IF als auch im Western Blot in primären Astrozytenkulturen am Tag 21, 28, und 42 p.i. nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der **BDV-GP**-Expression in primären Astrozytenkulturen am Tag 21, 28 und 42 p.i. mittels IF und Western Blot ergab ebenfalls übereinstimmende Ergebnisse. Zu keinem der Untersuchungszeitpunkte konnte in der IF oder im Western Blot BDV-GP nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden Proteinlysate langzeitkultivierter, zu 94% BDV-infizierte Astrozyten (3.3) im Western Blot auf das Vorhandensein von BDV-GP getestet. Interessanterweise war mittels gp2 Antikörper in den zu 94% BDV-infizierten Astrozyten eine schwache Bande bei 43 kDa zu erkennen, was der Größe des C-terminalen Spaltfragments des BDV-GP entspricht. In langzeitkultivierten, nicht BDV-infizierten Astrozyten war dagegen keine Bande bei 43 kDa vorhanden. In der IF ließ sich mittels gp2 Antikörper dagegen kein

Unterschied zwischen zu 94% BDV-infizierten Astrozyten und nicht infizierten Astrozyten erkennen.

4.7.2 Korrelation der Ergebnisse zum Nachweis von BDV mRNA (FISH und qPCR)

Bezüglich des Nachweises der **BDV-N mRNA (BDV-N +ssRNA)** korrelierten FISH und qPCR gut miteinander. Durch beide Methoden ließ sich ein leichter Rückgang der Expression über die Zeit nachweisen. Am Tag 28 p.i. war mittels FISH eine Expression in durchschnittlich 50% der Zellen (semiquantitative Auswertung: Score 2,25), am Tag 42 p.i. eine BDV-N mRNA Expression in nur knapp über 30% der Zellen (Score 1,75) zu verzeichnen. In der qPCR waren am Tag 28 p.i. 12.765.238 BDV-N mRNA Kopien und am Tag 42 p.i. 7.291.256 BDV-N mRNA Kopien nachweisbar. Dies bedeutet, dass sowohl die Gesamtzahl der BDV-N +ssRNA exprimierenden Zellen leicht abnahm als auch die Gesamtmenge der mRNA in den primären Astrozytenkulturen leicht zurückging (Abbildung 20 (A)).

Eine ähnlich gute Korrelation von FISH und qPCR ergab sich für den Nachweis der für BDV-M kodierenden **BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA)**. Beide Methoden zeigten eine annähernd stabile RNA Expression. Insgesamt war zu beiden Zeitpunkten nur in wenigen Zellen BDV-M mRNA mittels FISH nachzuweisen (Score 0,5). Die qPCR ergab am Tag 28 p.i. 325.325 BDV-M mRNA Kopien, am Tag 42 p.i. waren es 265.630 Kopien. In den primären Astrozytenkulturen lagen deutlich weniger BDV-M mRNA Kopien als BDV-N mRNA Kopien vor (Abbildung 20 (B)).

Die Ergebnisse des **BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA)** Nachweises der FISH und der qPCR ergaben, dass die Anzahl der in der FISH positiven Zellen vom Tag 28 zum Tag 42 von weniger als 30% auf annähernd mittleres Niveau von 30-80% infizierte Zellen anstieg. Dagegen blieb die Gesamtmenge an BDV-GP mRNA Kopien in etwa konstant. Am Tag 28 p.i. waren 194.632 und am Tag 42 p.i. 160.898 Kopien nachweisbar. Obwohl am Tag 42 p.i. mehr Zellen BDV-GP mRNA exprimierten, sank daher die Kopienzahl pro BDV-positiver Zelle (Abbildung 20 (C)).

ERGEBNISSE

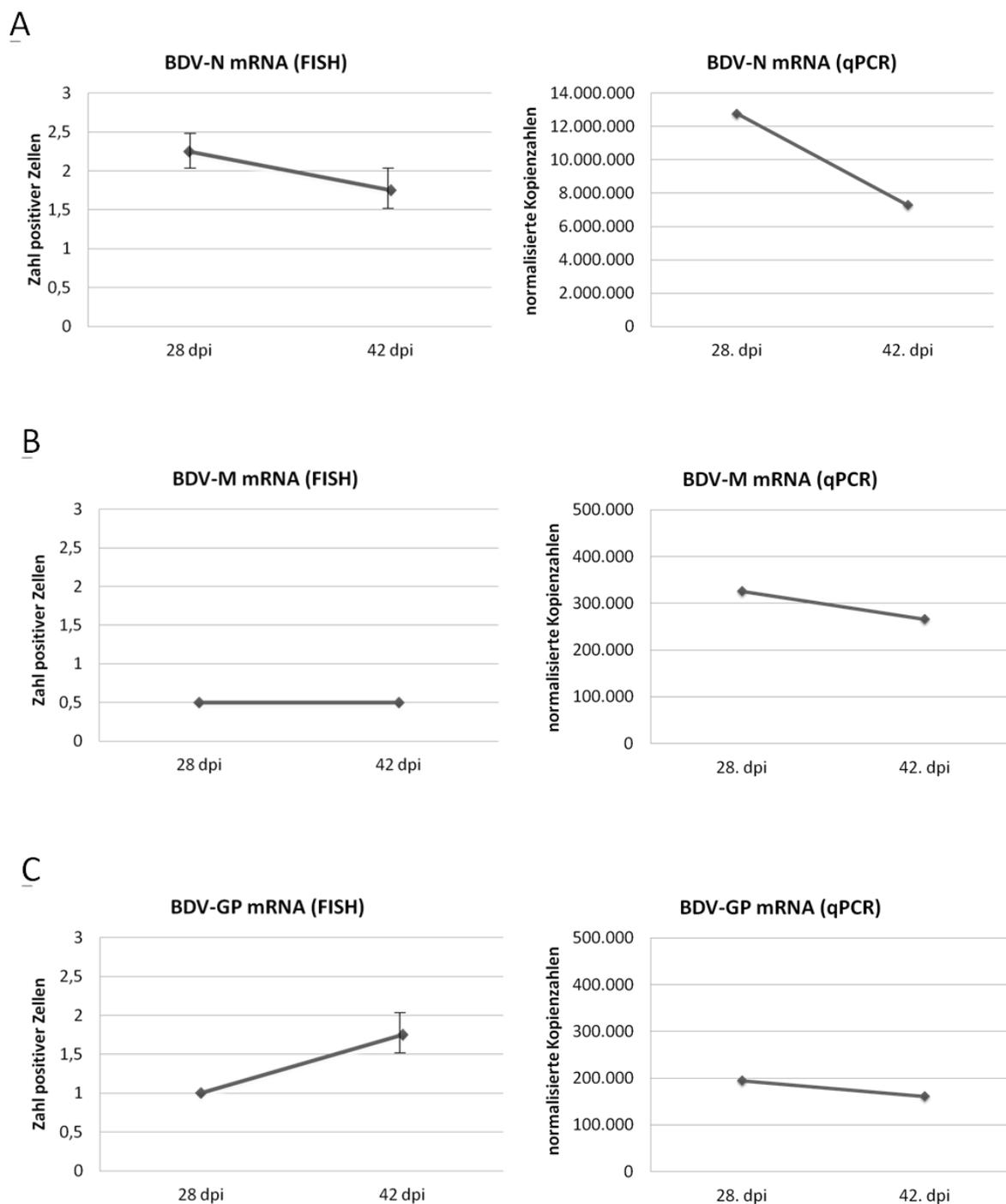


Abbildung 20: Korrelation der Nachweise der BDV spezifischen mRNAs mittels FISH und qPCR

Vergleichende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) und des quantitativen Nachweises der Kopienzahl der BDV-spezifischen mRNAs mittels quantitativer PCR (qPCR, quantitative real-time PCR). x-Achse: dpi = days post infection, Tage nach BDV-Infektion; y-Achse der drei linken Abbildungen = semiquantitative Auswertung der Fluoreszenz-Reaktion (Zahl positiver Zellen); Skala 0-3; y-Achse der drei rechten Abbildungen: normalisierte BDV mRNA spezifische Kopienzahl; Fehlerbalken = Minimum / Maximum des Nachweises. **(A)**: Korrelation des Nachweises der BDV-N mRNA; **(B)**: Korrelation des Nachweises der BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA); **(C)**: Korrelation des Nachweises der BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA)

4.7.3 Korrelation der Ergebnisse zum Nachweis von BDV-Proteinen und BDV mRNA (IF+WB und FISH+qPCR)

Die Expression von **BDV-N** und der **BDV-N mRNA (BDV-N +ssRNA)** waren am Tag 28 p.i. hinsichtlich der Anzahl positiver Zellen nahezu identisch (IF und FISH). Am Tag 42 p.i. waren dagegen mehr Zellen positiv für BDV-N als für BDV-N mRNA (Abbildung 21). Auch in der qPCR konnte ein leichter Rückgang der BDV-N mRNA Kopienzahl von 12.765.238 am Tag 28 p.i. auf 7.291.256 am Tag 42 verzeichnet werden. BDV-N und die korrespondierende mRNA fanden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten sowohl im Zytoplasma als auch in den Kernen infizierter Zellen (Abbildung 30).

Sowohl **BDV-M** als auch die für BDV-M kodierende **BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA)** ließen sich in der IF und FISH im Zellkern und im Zytoplasma nachweisen. BDV-M ließ sich jedoch deutlich öfter im Zytoplasma als im Kern nachweisen. Bei der entsprechenden mRNA war der Nachweis variabel. Mal fand sich die BDV-M mRNA im Zellkern, dann wieder im Zytoplasma. Die Expressionsmuster von BDV-M und BDV-M mRNA blieben vom Tag 28 zum Tag 42 p.i. beide auf annähernd gleichem Niveau (IF, FISH und qPCR). Es fand sich weder beim Nachweis von BDV-M noch beim Nachweis der kodierenden mRNA ein Unterschied zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten. Ein deutlicher Unterschied ergab sich dagegen im Bezug auf die Anzahl positiver Zellen in der IF und der FISH (Abbildung 22). Während die Expression der BDV-M mRNA in der FISH auf einige Einzelzellen beschränkt war, zeigte das BDV-M in der IF eine mittlere Expression (Abbildung 30). Die Kopienzahl der BDV-M mRNA lag in der qPCR zwischen 325.325 am Tag 28 p.i. und 265.630 Kopien am Tag 42 p.i..

Deutliche Unterschiede zeigten sich beim Nachweis des **BDV-GP** und der **BDV-GP mRNA**. BDV-GP oder BDV-GP-C ließ sich über den gesamten Untersuchungszeitpunkt nicht in primären Astrozytenkulturen nachweisen (IF und WB). Anders verhielt es sich für die entsprechende BDV-GP mRNA. Am Tag 28 p.i. waren in der FISH nur wenige Zellen positiv. Die Anzahl der BDV-GP mRNA positiven Zellen stieg bis zum Tag 42 an (siehe Abbildung 23). Interessanterweise fand sich die BDV-GP mRNA fast ausschließlich im Kern der infizierten Astrozyten. Zytoplasmatische Reaktionen waren dagegen nur sehr selten zu sehen (Abbildung 31). In der qPCR war BDV-GP mRNA ebenfalls nachweisbar. Es zeigte sich ein leichter Rückgang der Kopienzahlen der BDV-GP mRNA am Tag 28 und 42 p.i. von 194.632 auf 160.898 Kopien.

Statistisch konnten keine Gruppenunterschiede für BDV-Proteine und mRNAs für die Tage 28 und 42 p.i. festgestellt werden (BDV-N $p=0,3333$; BDV-M $p=0,2$; BDV-N mRNA $p=0,6667$; BDV-M mRNA $p=1$, BDV-GP mRNA $p=0,333$). Auch ein Gruppenvergleich der BDV-Proteinexpression und ihrer mRNAs getrennt nach Tag 28 und Tag 42 erbrachte keine statistisch relevanten Veränderungen (BDV-N, BDV-M und BDV-GP Tag 28 p.i.: $p=0,1087$, Tag 42 p.i.: $p=0,1667$; BDV-N mRNA, BDV-M mRNA und BDV-GP mRNA Tag 28 und Tag 42 p.i. $p=0,1667$).

ERGEBNISSE

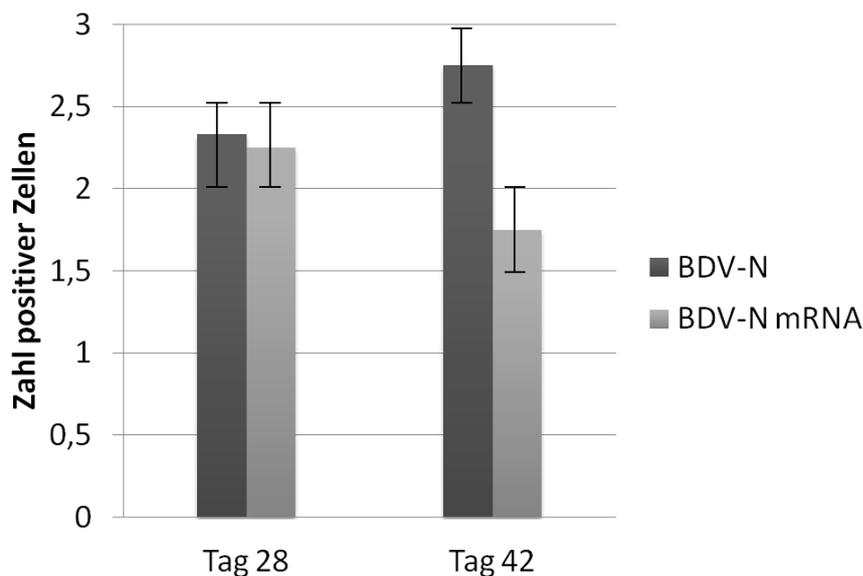


Abbildung 21: Korrelation der Nachweise von BDV-N und BDV-N mRNA

Vergleichende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz (IF) und der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis von BDV-Nukleoprotein (BDV-N) und BDV-N mRNA (BDV-N +ssRNA). x-Achse: dpi = days post infection, Tage nach BDV-Infektion; y-Achse = Grad der Fluoreszenz-Reaktion (Anzahl positiver Zellen); Skala 0-3; Fehlerbalken = Minimum / Maximum des Nachweises

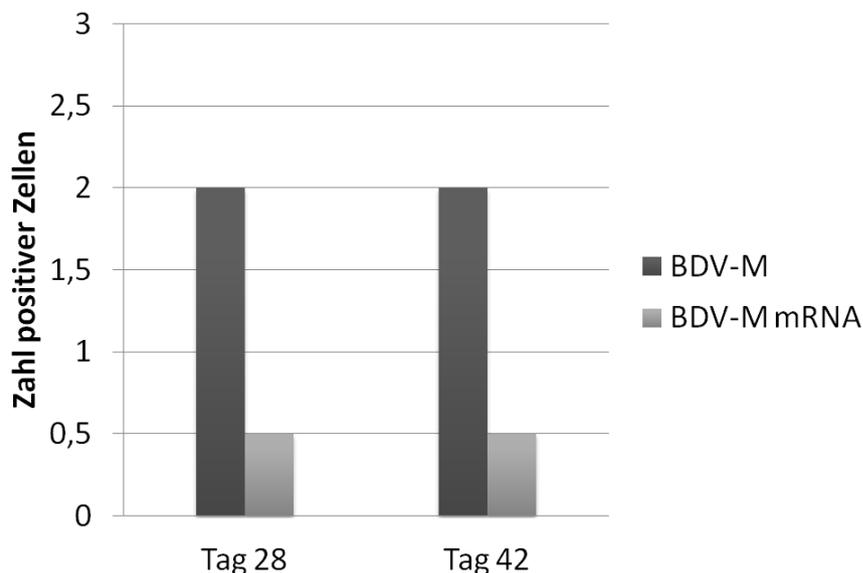


Abbildung 22: Korrelation der Nachweise von BDV-M und BDV-M mRNA

Vergleichende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz (IF) und der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis von BDV-Matrixprotein (BDV-M) und BDV-Intron I +ssRNA (entspricht u.a. BDV-M mRNA). x-Achse: dpi = days post infection, Tage nach BDV-Infektion; y-Achse = Grad der Fluoreszenz-Reaktion (Anzahl positiver Zellen); Skala 0-3; Fehlerbalken = Minimum / Maximum des Nachweises

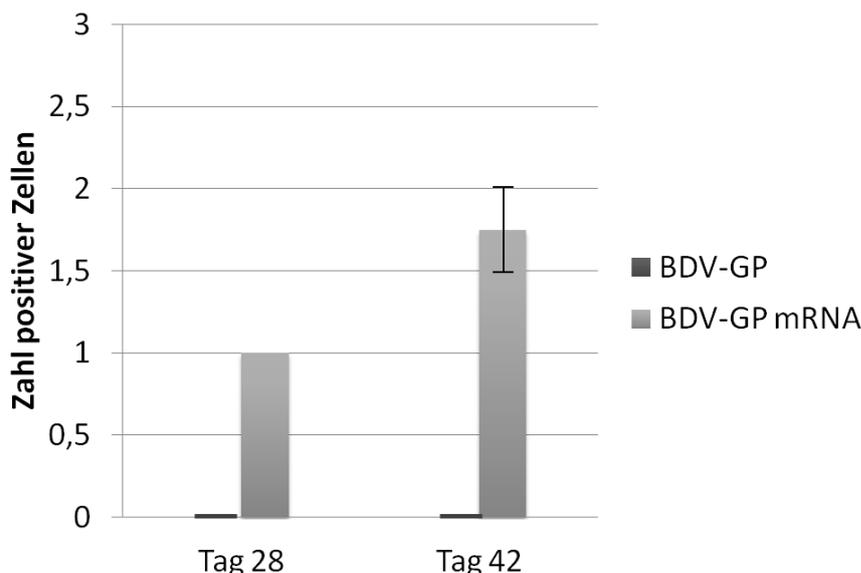


Abbildung 23: Korrelation der Nachweise von BDV-GP und BDV-GP mRNA

Vergleichende Darstellung der semiquantitativen Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz (IF) und der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis von BDV-Glykoprotein (BDV-GP) und BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA). x-Achse: dpi = days post infection, Tage nach BDV-Infektion; y-Achse = Grad der Fluoreszenz-Reaktion (Anzahl positiver Zellen); Skala 0-3; Fehlerbalken = Minimum / Maximum des Nachweises; Anmerkung: BDV-GP war zu keinem Zeitpunkt nachweisbar

4.8 UNTERSUCHUNG DER INFEKTIOSITÄT DES ZELLKULTUR- ÜBERSTANDES BDV-INFIZIERTER PRIMÄRER ASTROZYTEN MITTELS IF

Um herauszufinden, ob BDV-infizierte primäre corticale Astrozyten infektiöses Virus in den Zellkulturüberstand abgeben, wurde der Überstand von BDV-infizierten Astrozyten 27 Tage p.i. auf nicht infizierte Astrozytenkulturen gegeben und für 48 Stunden inkubiert. Diese Kulturen wurden nach 21 und 42 Tagen mittels indirekter Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein von BDV-N untersucht.

Im Infektionsversuch konnte BDV-N durch indirekte Immunfluoreszenz weder am Tag 21 noch am Tag 42 nachgewiesen werden. In den mit Zellkulturüberstand nicht infizierter Astrozyten behandelten Zellen war ebenfalls kein BDV-Nukleoprotein nachweisbar. Die Positivkontrolle war dagegen BDV-N positiv.

4.9 UNTERSUCHUNG DER ROLLE DES BDV-GLYKOPROTEINS BEI DER GLIA-GLIALEN BDV-AUSBREITUNG

In der vorliegenden Studie konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz kein BDV-GP in primären Astrozytenkulturen nachgewiesen werden (4.3.2) Im Zellkulturüberstand BDV-infizierter Astrozyten war durch Infektionsversuche kein infektiöses Virus detektierbar (4.8).

Durch den Einsatz des Furin-Inhibitors MI-0701 (2.4.2.2) soll untersucht werden, ob die gliale BDV-Ausbreitung glykoproteinabhängig verläuft oder über andere Mechanismen zustande kommt. MI-0701 verhindert die posttranslationelle BDV-GP-Spaltung in seine funktionellen Untereinheiten BDV-GP-C und BDV-GP-N (BECKER et al., 2010).

Dazu wurden wenige BDV-infizierte Astrozyten mit einem Überschuss an uninfizierten Astrozyten im Verhältnis 1:100 kokultiviert. Eine Hälfte der Zellen wurde unter Zugabe des Furin-Inhibitors kultiviert, die andere Hälfte ohne. Am Tag 2, 5, 9 und 23 wurde die Expression des BDV-N mit und ohne Inhibitorzugabe durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt (n=2 für Tag 2,5 und 23; n=1 für Tag 9).

4.9.1 Einfluss des Furin-Inhibitors MI-0701 auf die Ausbreitung der BDV-Infektion

Ohne Zugabe des Furin-Inhibitors MI-0701 zu den Kulturen war eine signifikante Zunahme der BDV-infizierten Zellen über die Zeit zu verzeichnen ($p=0,0002$). Am Tag 2 p.i. waren 3% der Zellen BDV-infiziert (n=1). Am Tag 5 waren es 13%. Der BDV-N Nachweis stieg am Tag 9 auf 18% an. Am Tag 23 p.i. waren ohne Inhibitorzugabe bereits 38% der Zellen BDV-N positiv (Abbildung 24). BDV-N positive Zellen lagen im Verlauf der Untersuchung in zunehmend größeren Zellgruppen vor. Das allgemeine Reaktionsmuster und die intrazelluläre Reaktion des BDV-N Nachweises stimmte mit den Ergebnissen zur Kinetik der BDV-N Expression überein (4.3.3). Zu früheren Untersuchungszeitpunkten war eher eine punktförmige Reaktion in den Kernen und im Zytoplasma zu sehen. Daneben fanden sich einzelne Zellen mit intensiver Fluoreszenz sowohl punktförmig bis diffus im Zellkern als auch granulär bis diffus im Zytoplasma. Im Verlauf der Infektion waren vermehrt diffuse Reaktionen in Zytoplasma und den Fortsätzen zu sehen. Allgemein nahm die Intensität der Fluoreszenz innerhalb der positiven Zellen über die Zeit zu.

Nach Zugabe des Furininhibitors blieb die Anzahl BDV-infizierter Zellen vom Tag 2 bis zum Tag 23 p.i. auf annähernd konstantem Niveau von 3-5% infizierten Zellen (Abbildung 24). Es wiesen zu allen Untersuchungszeitpunkten nur Einzelzellen oder sehr kleine Zellgruppen BDV-N auf (Abbildung 36). Die positiven Fluoreszenzsignale waren hier eher punktförmig, seltener diffus im Zytoplasma zu finden.

Als Negativkontrolle für den BDV-N Nachweis wurden gleichalte, nicht infizierte Astrozyten aus der jeweiligen Präparation verwendet. Es war kein BDV-N nachweisbar.

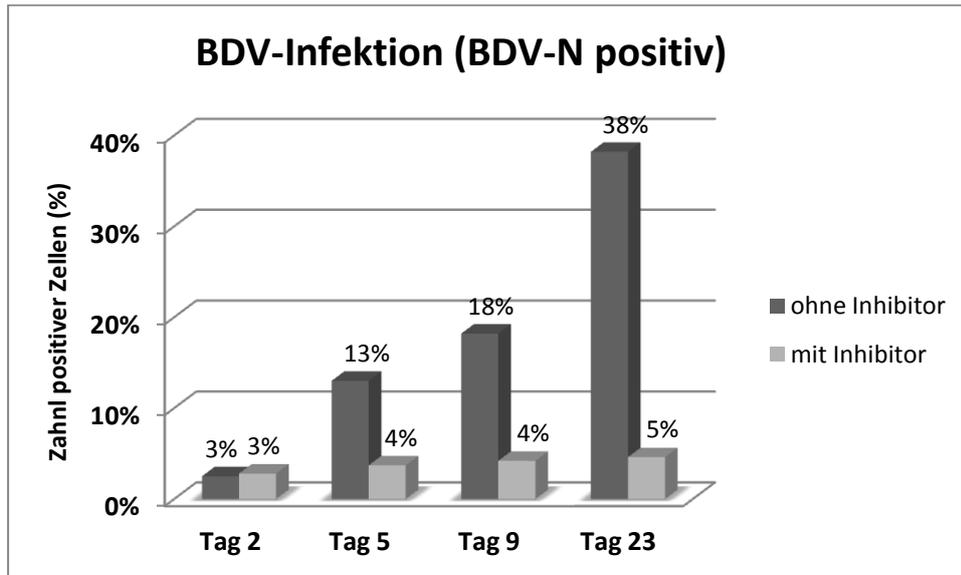


Abbildung 24: Hemmung der BDV-Ausbreitung in primären Astrozytenkulturen durch Furin-Inhibitor MI-0701

x-Achse: Tage nach Mischen der Astrozyten (Verhältnis 1:100: 94% BDV-infizierte Astrozyten : nicht infizierte Astrozyten). y-Achse: BDV-N positive Zellen; Inhibitor = Furin Inhibitor MI-0701

4.9.2 Zellmorphologie nach Behandlung mit MI-0701

Inhibitorbehandelte und unbehandelte Kulturen wurden alle 3 Tage unter dem Invertmikroskop untersucht. Inhibitorbehandelte primäre Astrozyten zeigten auch nach 23-tägiger Inhibitorbehandlung keine erkennbaren Veränderungen, ihre Morphologie unterschied sich nicht von der unbehandelten Astrozyten.

4.10 FOTOGRAFISCHE DOKUMENTATION DER ERGEBNISSE

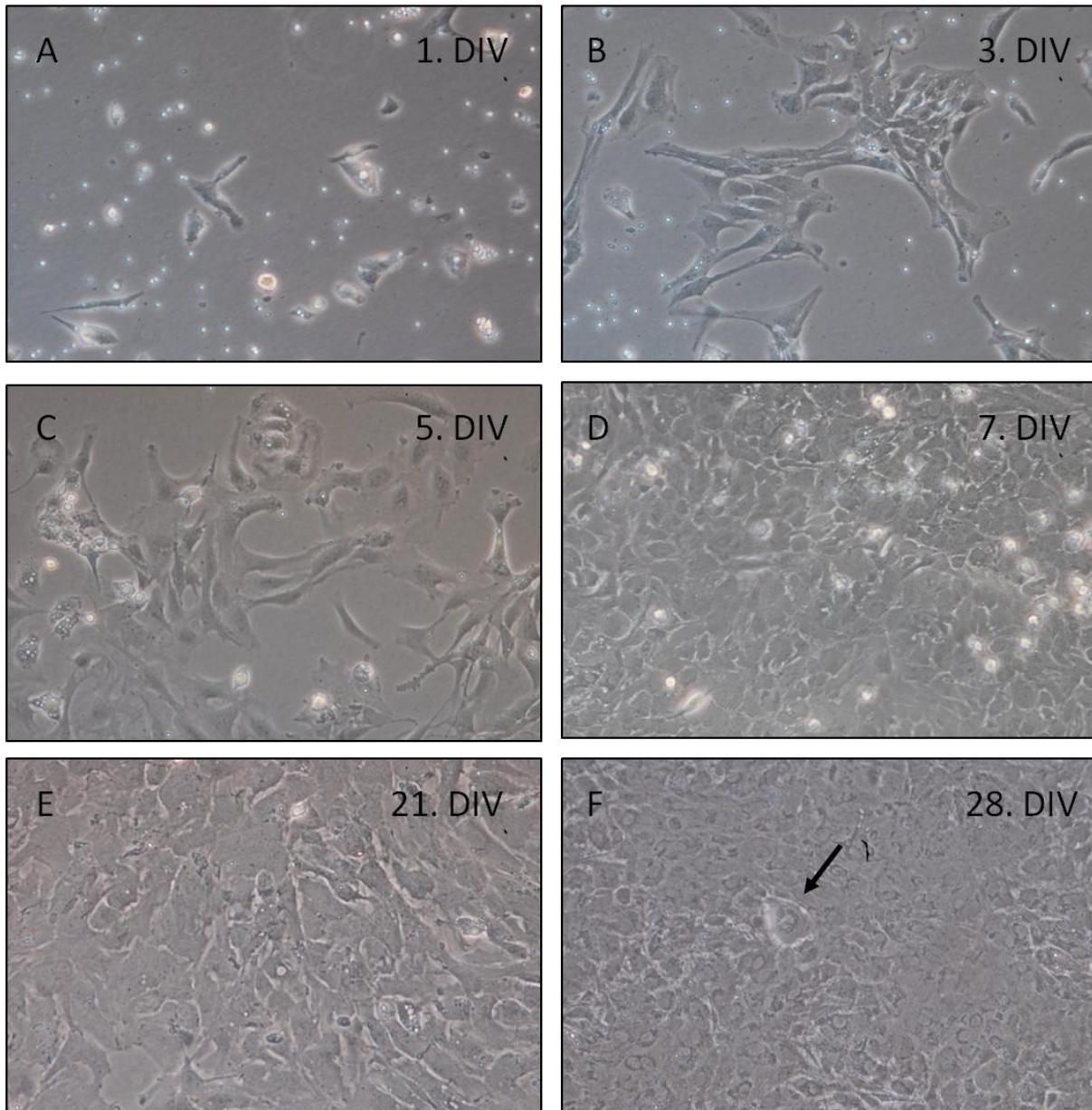


Abbildung 25: Morphologie der primären corticalen Astrozyten

A-F: Astrozyten in Zellkulturflaschen. DIV = *days in vitro*, Tage *in vitro*. Tag 1-7: Zellen vor erster Subkultivierung. Tage 21 und 28: Zellen nach erster Subkultivierung.

A: 1. DIV: einzeln liegende Zellen. Viele kleine, runde, abgekugelte Zellen. Daneben größere, runde Zellen sowie größere längliche Zellen. Flache dreieckige bis polygonale, astrozytenähnliche Zellen

B: 3. DIV: überwiegend größere polygonale, astrozytenähnliche Zellen, die vereinzelt Zellinseln bilden. Z.T. sind längere Zellfortsätze zu erkennen, mit denen sie miteinander in Kontakt treten. Vereinzelt auch kleine, runde Zellen

C, D: 5. und 7. DIV: zusammenhängende Zellinseln aus Astrozyten werden größer. 7. DIV: Monolayer nahezu konfluent

E, F: 21. und 28. DIV. Astrozyten wachsen dichter zusammen. Vereinzelt zweite Zelllage auf dem Monolayer (Pfeil)

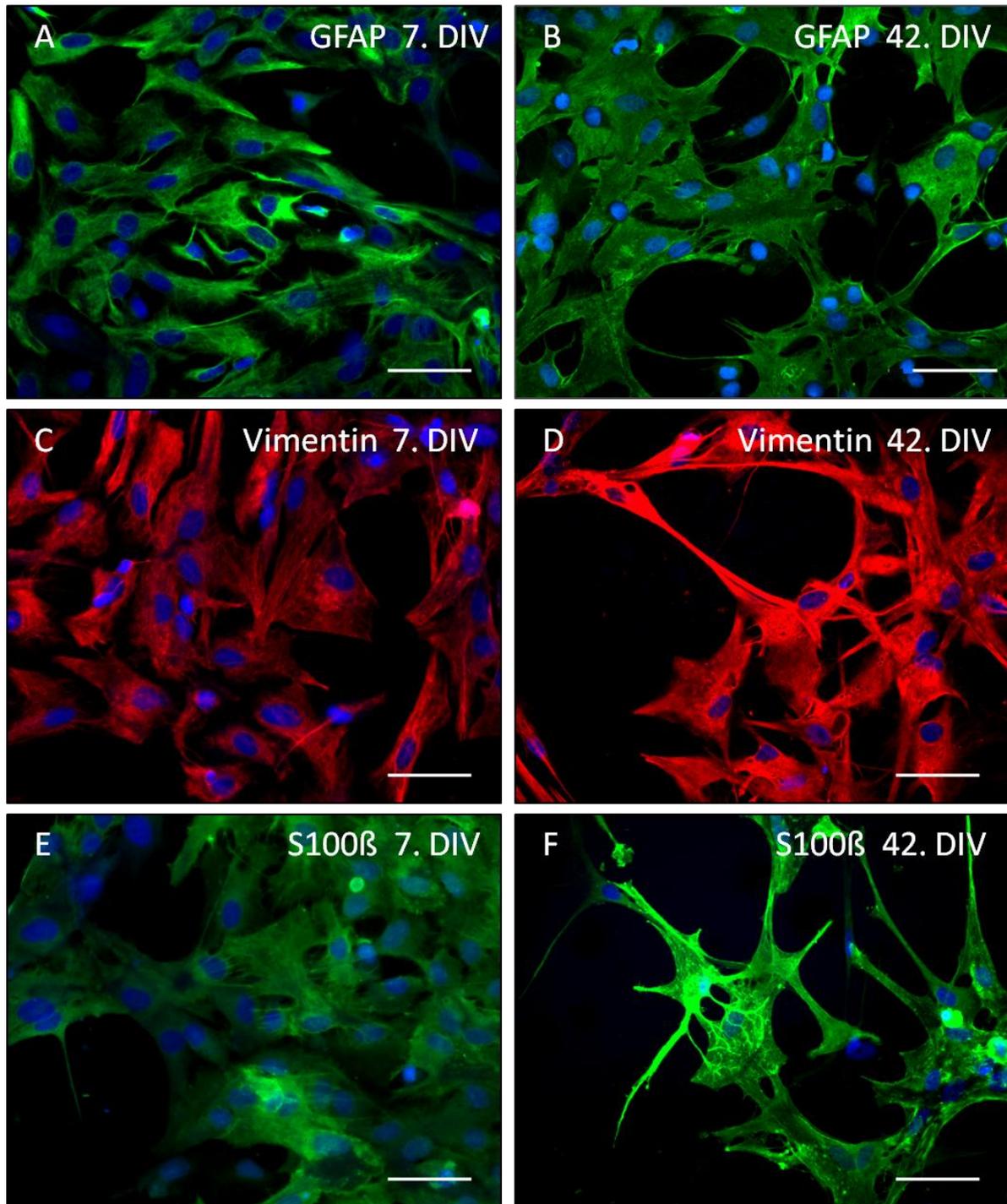


Abbildung 26: Nachweis von GFAP, Vimentin und S100β in nicht infizierten primären corticalen Astrozyten

A-F: Nicht BDV-infizierte primäre Astrozyten des Cortex cerebri von Lewis-Ratten. Zellfixierung mit 4% PFA auf Multitest-Objektträgern®. Indirekte Immunfluoreszenz-Methode. DIV = *days in vitro*, Tage *in vitro*. Im Verlauf der Untersuchung war die Expression der Marker GFAP, Vimentin und S100β in etwa gleich vielen Zellen nachweisbar. Balken: 50 μm

A: GFAP, 7. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

B: GFAP, 42. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

C: Vimentin, 7. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

D: Vimentin, 42. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

E: S100β, 7. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

F: S100β, 42. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

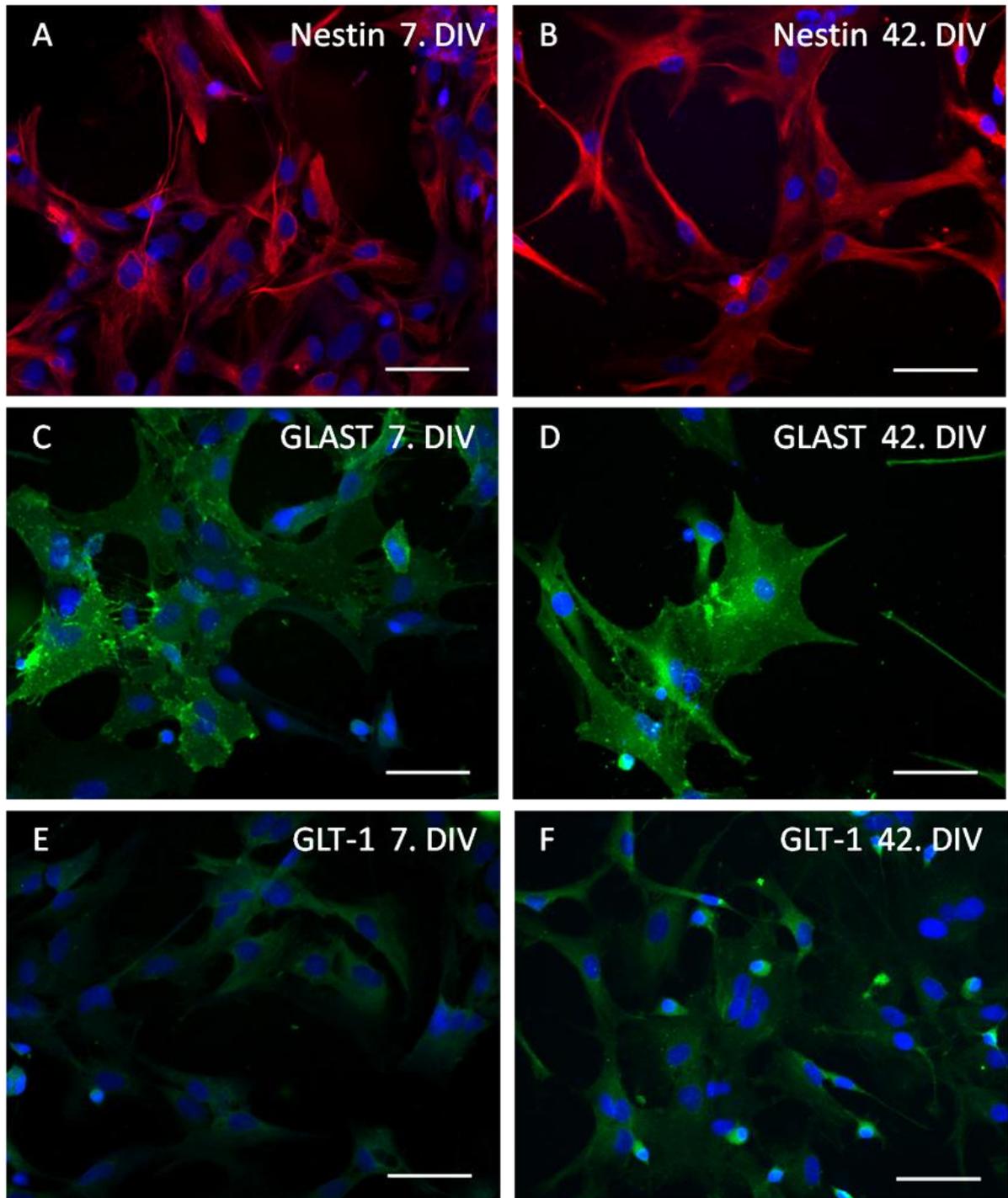


Abbildung 27: Nachweis von Nestin, GLAST und GLT-1 in nicht infizierten primären corticalen Astrozyten

A-F: Nicht BDV-infizierte primäre Astrozyten des Cortex Cerebri von Lewis-Ratten. Zellfixierung mit 4% PFA auf Multitest-Objektträgern®. Indirekte Immunfluoreszenz-Methode. DIV = *days in vitro*, Tage *in vitro*. Im Verlauf der Untersuchung blieb die Expression der Marker Nestin, GLAST und GLT-1 auf konstantem Niveau, geringgradige Veränderungen des Expressionslevels waren nicht statistisch signifikant. Balken: 50 μ m

A: Nestin, 7. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

B: Nestin, 42. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 3

C: GLAST, 7. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 2,5

D: GLAST, 42. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 2,875

E: GLT-1, 7. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1

F: GLT-1, 42. DIV: semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1,625

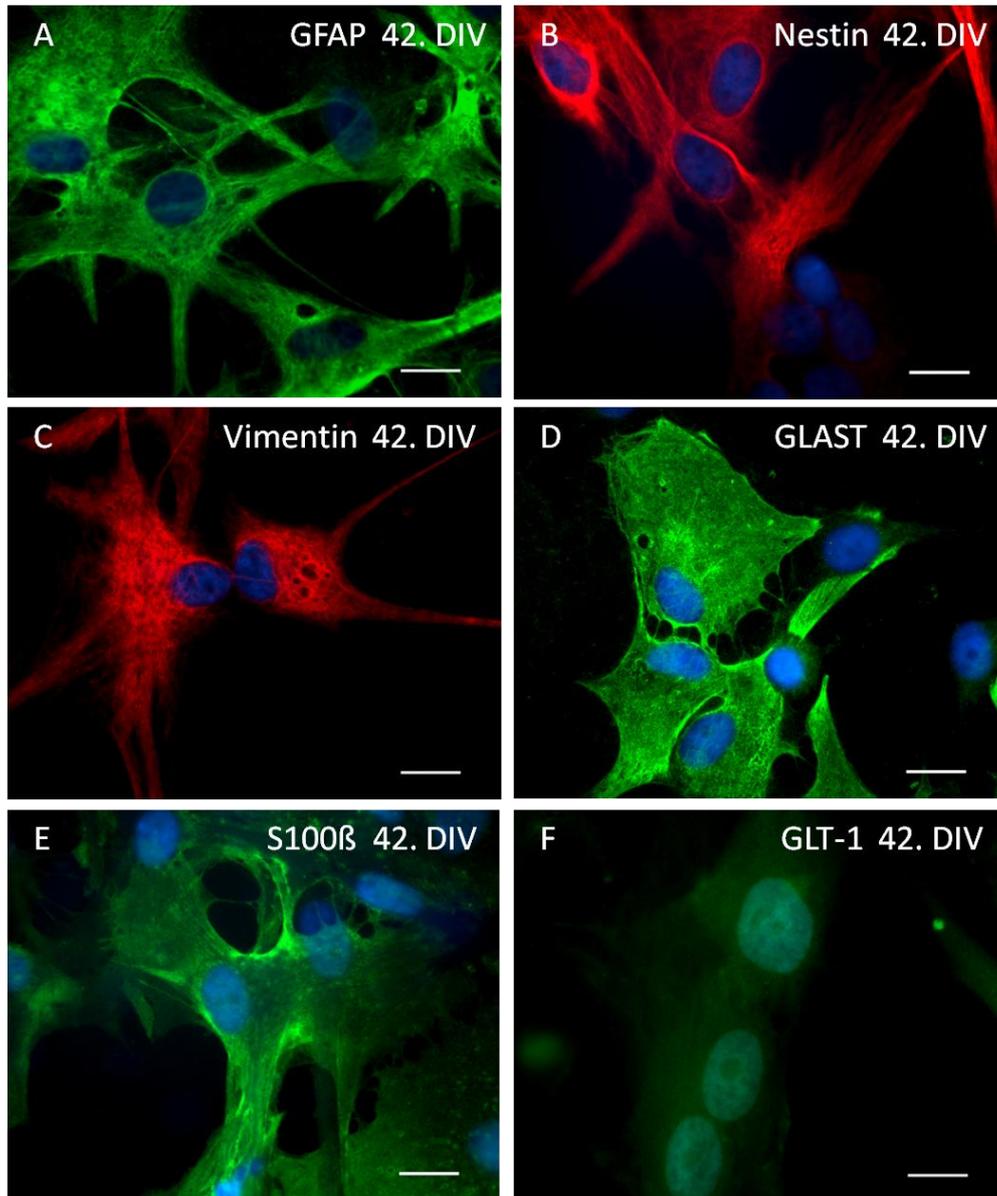


Abbildung 28: Intrazelluläre Lokalisation von GFAP, Vimentin, Nestin, S100 β , GLAST und GLT-1 in nicht infizierten primären corticalen Astrozyten

A-F: Nicht BDV-infizierte primäre Astrozyten des Cortex cerebri von Lewis-Ratten. Zellfixierung mit 4% PFA auf Multitest-Objektträgern[®]. Indirekte Immunfluoreszenz-Methode. DIV = *days in vitro*, Tage *in vitro*. Balken 10 μ m

A: GFAP, 42. DIV: fädige bis zuckerwatteartige Farbreaktion des Zytoplasmas und der Zellfortsätze. Teils zeigt sich eher eine diffuse oder leicht fleckige Reaktion (hier nicht dargestellt)

B: Nestin 42. DIV: diffuse, überwiegend aber fädige bis zuckerwatteartige Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellfortsätze. Auffällig ist die Darstellung von langen astrozytären Fortsätzen, mit denen die Zellen zum Teil über relativ große Distanzen in Verbindung stehen (rechts im Bild)

C: Vimentin 42. DIV: überwiegend fädige bis zuckerwatteartiges Reaktionsmuster des Zytoplasmas und der Zellfortsätze, teils auch diffuse bis fleckige Anfärbung

D: GLAST, 42. DIV: diffuses Reaktionsmuster des Zytoplasmas und der Zellfortsätze mit stellenweise punktförmigen Arealen stärkerer Fluoreszenz. Insbesondere Darstellung kurzer, dünner Zellfortsätze, die fädige Verspannungen zwischen benachbarten Astrozyten bilden

E: S100 β , 42. DIV: diffuse bis fleckige Anfärbung des Zytoplasmas der Fortsätze. Insbesondere auch kurze, dünne Fortsätze, die fädige Verspannungen zwischen benachbarten Astrozyten bilden werden dargestellt

F: GLT-1, 42. DIV: geringe bis mittelgradige Intensität der Fluoreszenzreaktion. Diffuse Anfärbung des Zytoplasmas und der Zellfortsätze mit vereinzelt stärker fluoreszierenden, punktförmigen Arealen

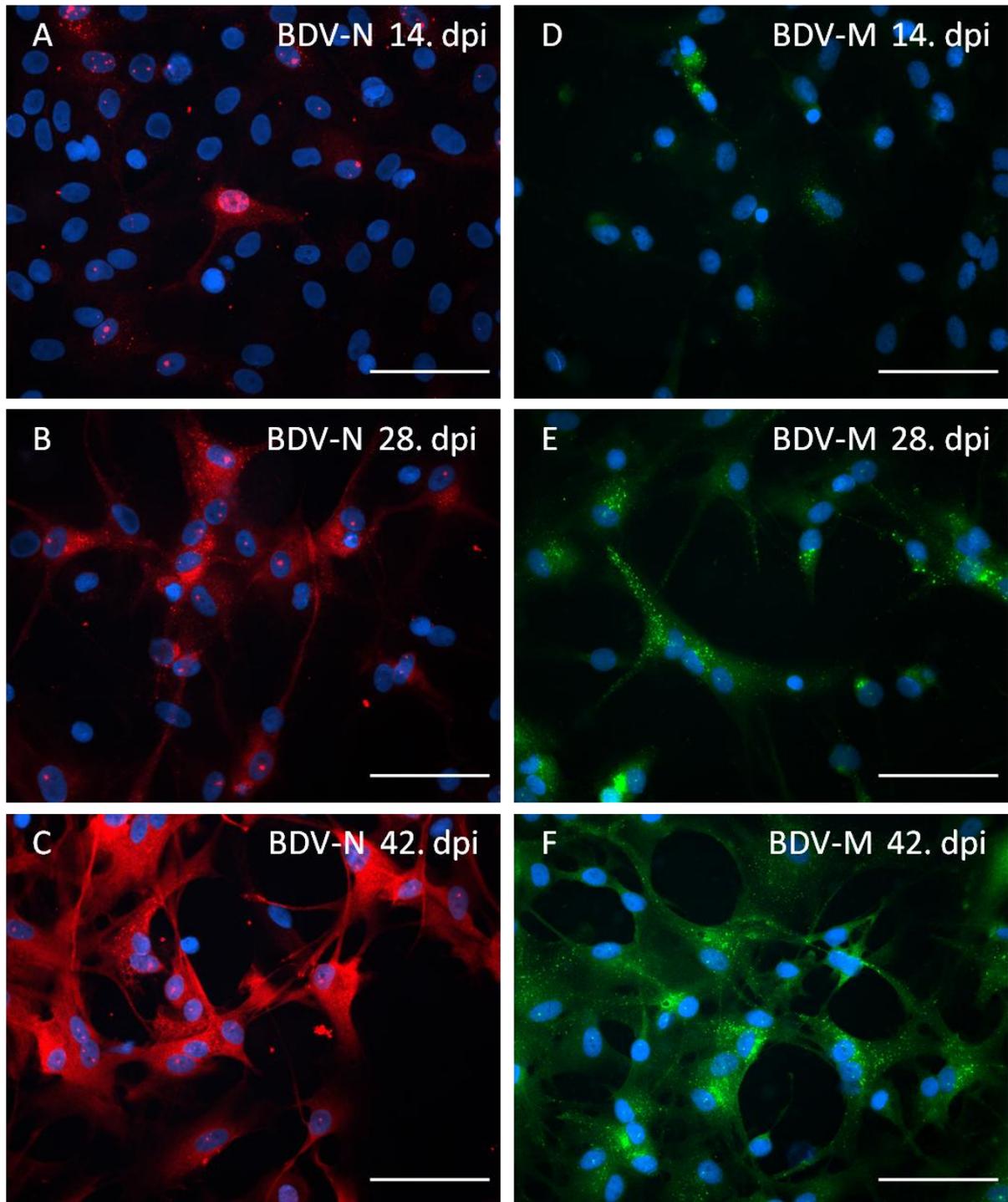


Abbildung 29: Nachweis der viralen Proteine BDV-N und BDV-M in BDV-infizierten primären corticalen Astrozyten

A-F: BDV-infizierte primäre Astrozyten des Cortex Cerebri von Lewis-Ratten. Zellfixierung mit Aceton auf Multitest-Objekträgern®. Indirekte Immunfluoreszenz-Methode. dpi = *days post infection*. Balken 50 µm

- A: BDV-N, 14. dpi:** semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1
- B: BDV-N, 28. dpi:** semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 2,33
- C: BDV-N, 42. dpi:** semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 2,75
- D: BDV-M, 14. dpi:** semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1
- E: BDV-M, 28. dpi:** semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 2
- F: BDV-M, 42. dpi:** leichter Anstieg der positiven Reaktion aber immer noch Score 2

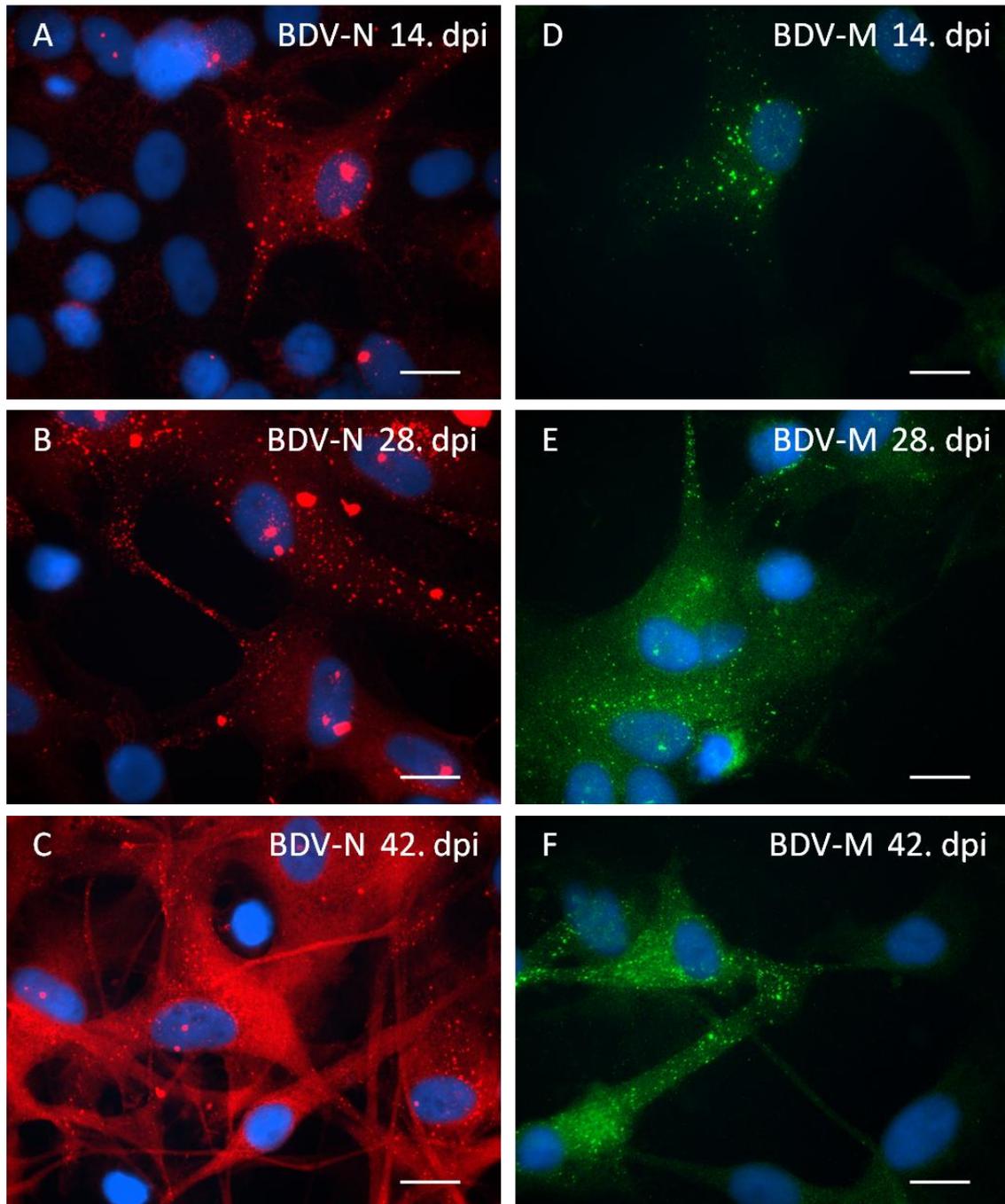


Abbildung 30: Intrazelluläre Lokalisation von BDV-N und BDV-M in BDV-infizierten primären corticalen Astrozyten

A-F: BDV-infizierte primäre Astrozyten des Cortex cerebri von Lewis-Ratten. Zellfixierung mit Aceton auf Multitest-Objektträgern®. Indirekte Immunfluoreszenz-Methode. dpi = *days post infection*. Balken 10 µm

A: BDV-N, 14 dpi: überwiegend punktförmiger BDV-N Nachweis in Kernen und Zytoplasma sowie in einzelnen Fortsätzen, daneben auch schwache diffuse Reaktionen des Zytoplasmas

B: BDV-N, 28 dpi: punktförmiger und z.T. diffuser BDV-N Nachweis in Zytoplasma und Fortsätzen, daneben punktförmige Reaktionsprodukte in den Kernen

C: BDV-N, 42 dpi: Zunahme des diffusen BDV-N Nachweises in Zytoplasma und Fortsätzen

D: BDV-M, 14 dpi: überwiegend punktförmiger BDV-M Nachweis in Zytoplasma und vereinzelt in Zellkernen

E: BDV-M, 28 dpi: überwiegend punktförmiger bis diffuser BDV-M Nachweis in Zytoplasma und Zellfortsätzen, daneben einzelne punktförmige BDV-M Nachweise in Zellkernen

F: BDV-M, 42 dpi: zunehmend auch diffuse BDV-M Reaktionsprodukte in Zytoplasma und Fortsätzen

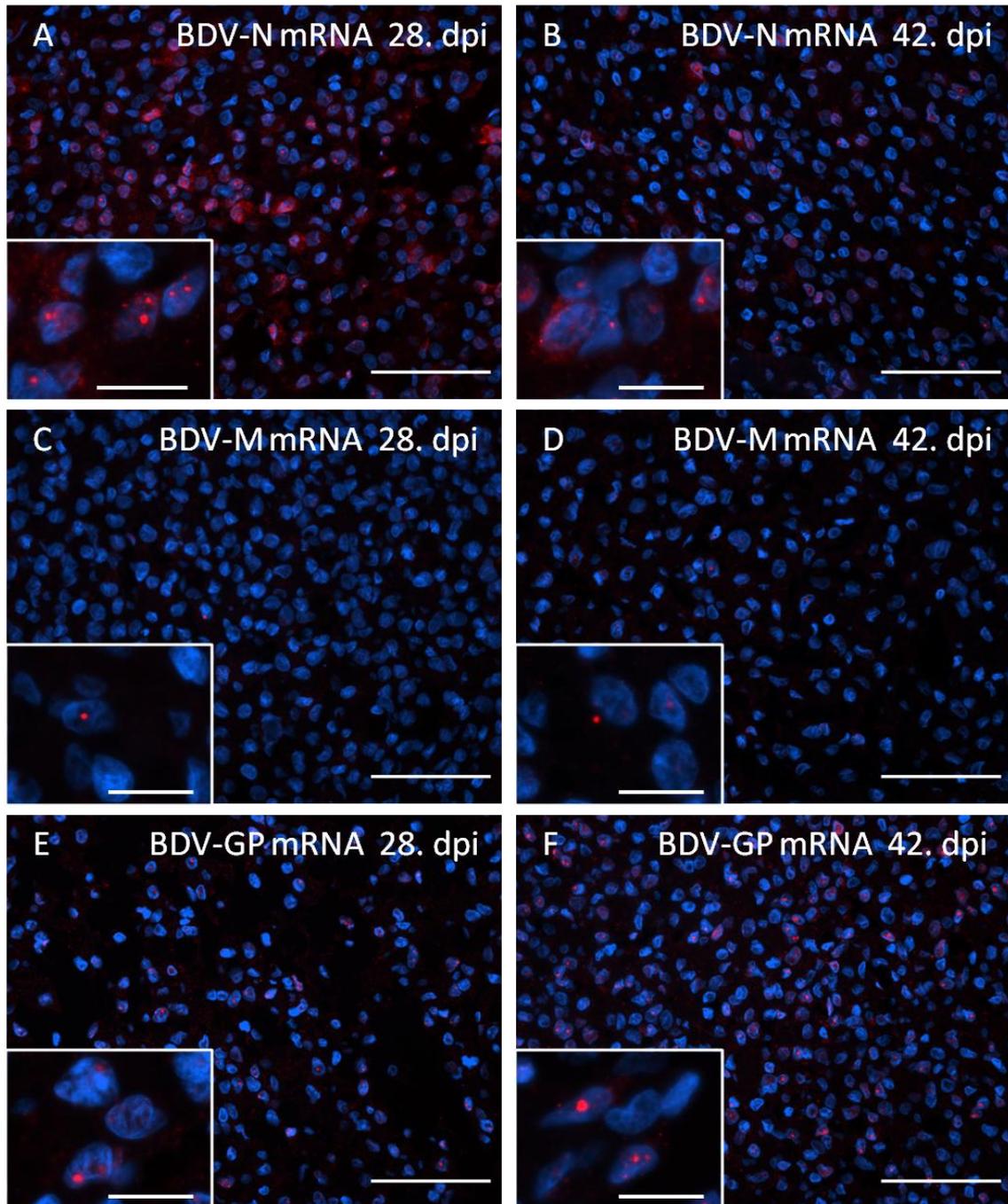


Abbildung 31: Nachweis von BDV-N mRNA, BDV-M mRNA und BDV-GP mRNA in BDV-infizierten primären corticalen Astrozyten

A-F: BDV-infizierte primäre Astrozyten des Cortex cerebri von Lewis-Ratten. Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Zellpellets. FISH-Methode. dpi = *days post infection*. Balken 50 μm ; Inserts: Balken 10 μm

A: BDV-N mRNA, 28. dpi.: Granuläre Reaktionsprodukte im Zytoplasma und den Kernen, selten diffuse Anfärbung des Zytoplasmas. Semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 2,25

B: BDV-N mRNA; 42. dpi.: Granuläre Reaktionsprodukte im Zytoplasma und den Kernen. Semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1,75

C, D: BDV-M mRNA, 28. und 42. dpi.: Vereinzelt positive Zellen (Score 0,5). Granuläre Reaktionsprodukte variabel im Zytoplasma oder in den Kernen.

E: BDV-GP mRNA, 28. dpi.: Granuläre Reaktionsprodukte fast nur im Kern. Semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1

F: BDV-GP mRNA, 42. dpi.: Granuläre Reaktionsprodukte fast nur im Kern. Semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1,75

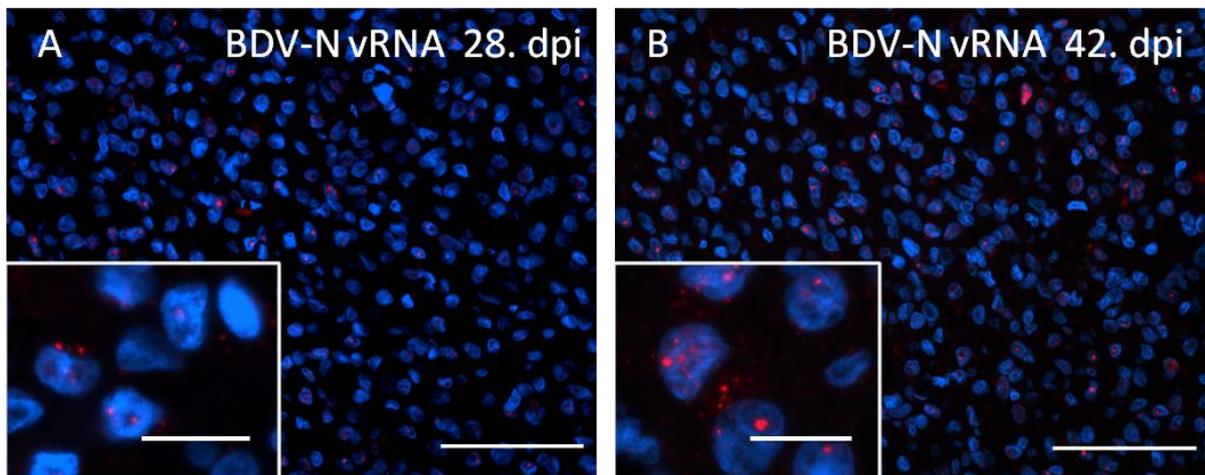


Abbildung 32: Nachweis der genomischen BDV-N vRNA in BDV-infizierten primären corticalen Astrozyten

A und B: BDV-infizierte primäre Astrozyten des Cortex cerebri von Lewis-Ratten. Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Zellpellets. FISH-Methode. dpi = *days post infection*. vRNA = virale RNA (–ssRNA); Balken 50 µm; Inserts: Balken 10 µm

A: BDV-N vRNA, 28. dpi.: Es überwogen granuläre Kernreaktionen, daneben waren vereinzelt auch zytoplasmatische Reaktionen zu sehen. Semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 1,25

B: BDV-N vRNA, 42. dpi.: Granuläre Zytoplasmareaktionen traten etwas genauso häufig wie granuläre Kernsignale auf. Semiquantitative Auswertung der Anzahl positiver Zellen: Score 2

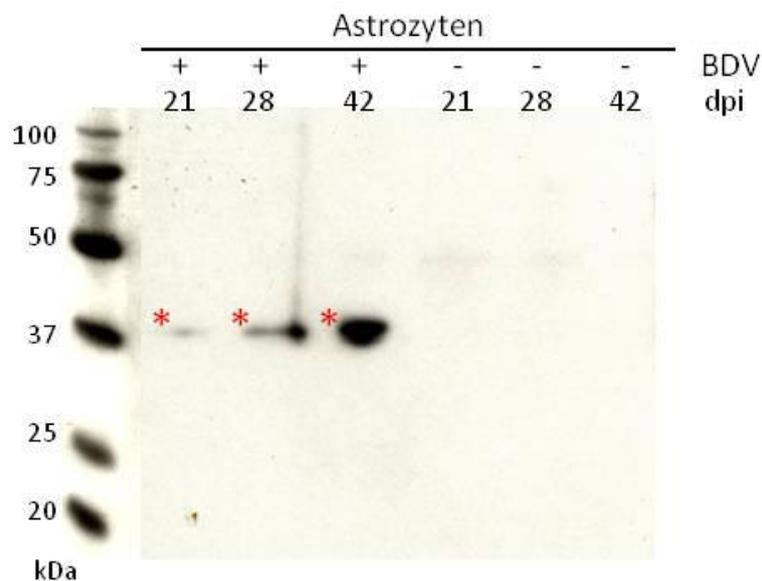


Abbildung 33: Nachweis von BDV-N in primären corticalen Astrozytenkulturen

Am Tag 21, 28 und 42 dpi. wurden Proteinlysate aus BDV-infizierten (+) und nicht infizierten (-) primären Astrozyten gewonnen. Diese wurden im Western Blot auf das Vorhandensein von BDV-N untersucht (Antikörper: Bo-18). dpi = *days post infection*, Tage nach Infektion; kDa = Kilodalton; rote Sterne = positiver Proteinnachweis bei 38 kDa

ERGEBNISSE

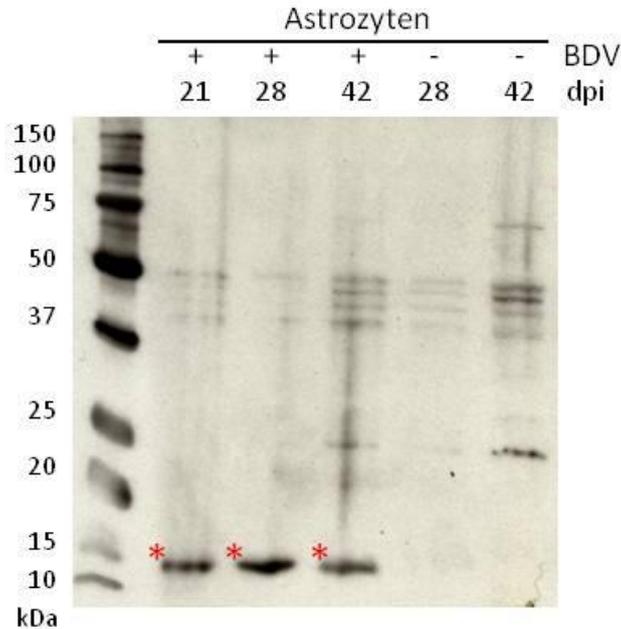


Abbildung 34: Nachweis von BDV-M in primären corticalen Astrozytenkulturen

Am Tag 21, 28 und 42 dpi. wurden Proteinlysate aus BDV-infizierten (+) und am Tag 28 und 42 aus nicht infizierten (-) primären Astrozyten gewonnen. Diese wurden im Western Blot mittels M 128 Antikörper auf das Vorhandensein von BDV-M untersucht. dpi = *days post infection*, Tage nach Infektion; kDa = Kilodalton; rote Sterne = positiver Proteinnachweis bei 16 kDa

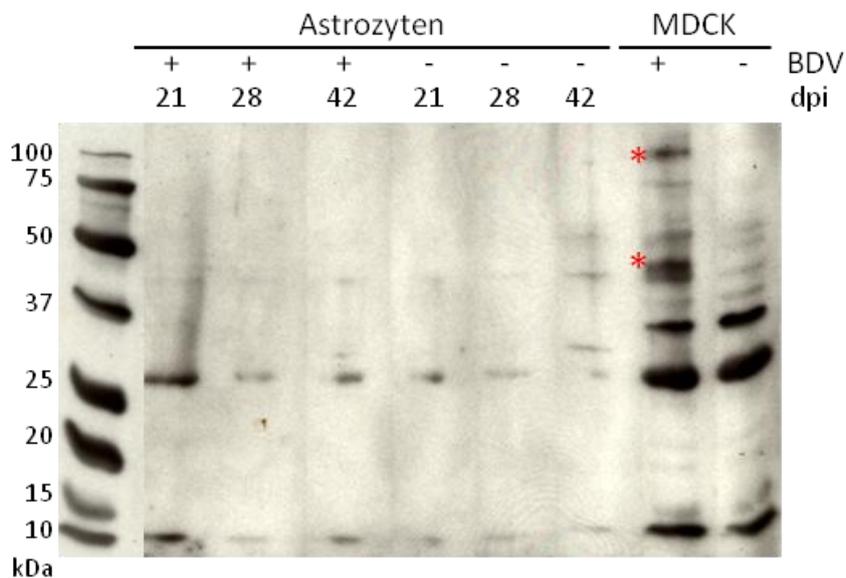


Abbildung 35: Nachweis von BDV-GP in primären corticalen Astrozytenkulturen und MDCK-Zellen

Am Tag 21, 28 und 42 dpi. wurden Proteinlysate aus BDV-infizierten (+) und nicht infizierten (-) primären Astrozyten gewonnen. Zunächst wurde eine Lektinpräzipitation vorgenommen, um Glykoproteine anzureichern. Die Präzipitate wurden anschließend im Western Blot mittels α gp2 Antikörper auf das Vorhandensein von BDV-GP bzw. BDV-GP-C untersucht. Als Positivkontrolle wurden lektinpräzipitierte Proteinlysate von BDV-infizierten MDCK-Zellen verwendet. dpi = *days post infection*, Tage nach Infektion; kDa = Kilodalton; rote Sterne = positiver Proteinnachweis bei 94 und 43 kDa nur bei MDCK-Zellen

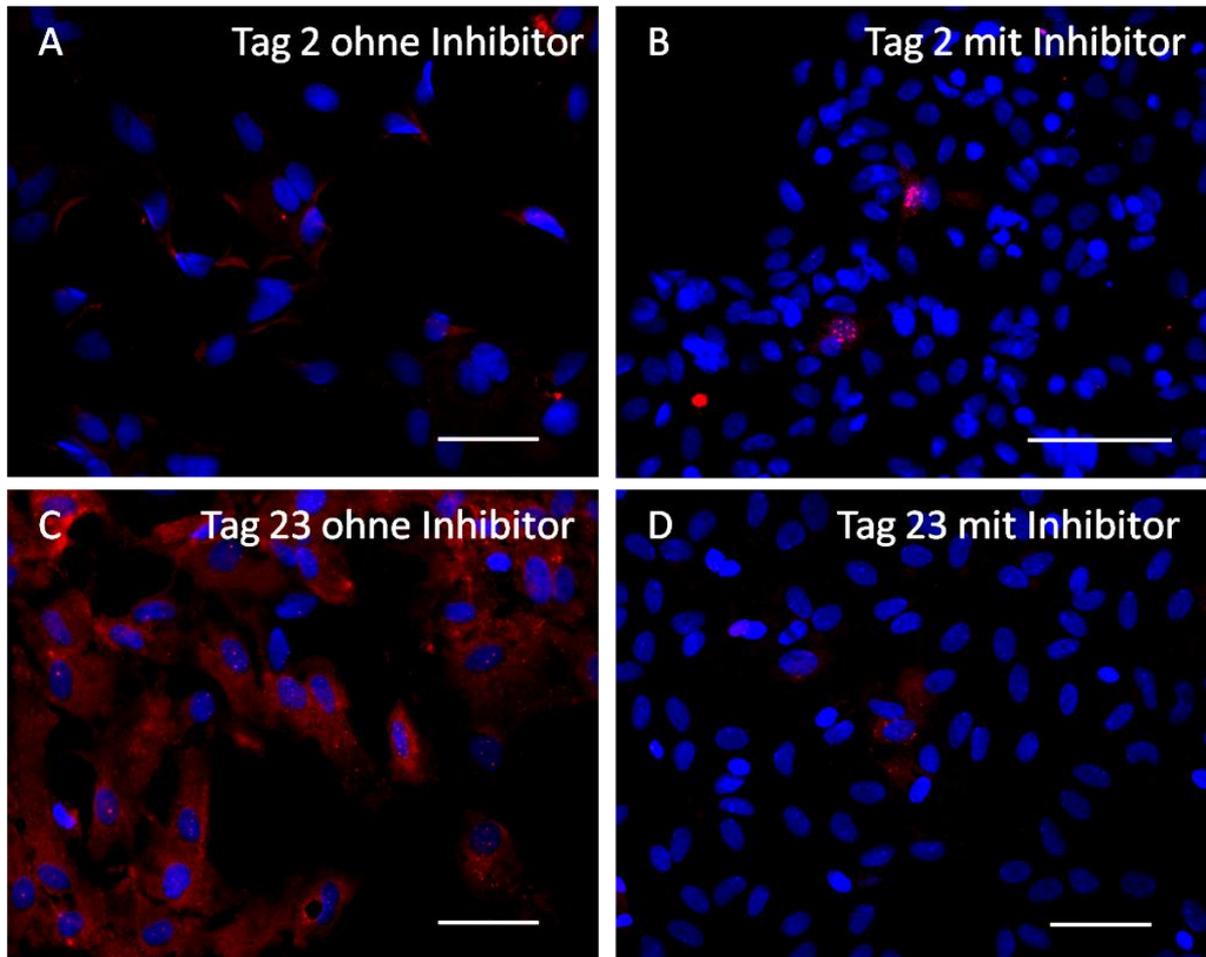


Abbildung 36: Einfluss des Inhibitors MI-0701 auf die BDV-Ausbreitung in primären corticalen Astrozytenkulturen

A-D: Nicht infizierte primäre corticale Astrozyten wurden im Verhältnis 100 : 1 mit zu 94% BDV-infizierten primären corticalen Astrozyten gemischt und über einen Zeitraum von 23 Tagen kultiviert. Einem Teil der Zellen wurde der Furininhibitor MI-0701 zugegeben, der die Spaltung des viralen Glykoproteins in seine funktionellen Untereinheiten verhindert. Zellfixierung mit 4 % PFA auf Deckgläschen in Multiwell Platten. Nachweis von BDV-N (Indirekte Immunfluoreszenz). Balken 50 μ m

A: Tag 2 nach Mischen der Zellen, ohne Inhibitorzugabe: nur Einzelzellen (3%) BDV-positiv

B: Tag 2 nach Mischen der Zellen, mit Inhibitorzugabe: nur Einzelzellen (3%) BDV-positiv

C: Tag 23 nach Mischen der Zellen, ohne Inhibitorzugabe: 38% der Zellen BDV-positiv. Positiven Zellen liegen überwiegend nebeneinander und bilden positive Zellinseln.

D: Tag 23 nach Mischen der Zellen, mit Inhibitorzugabe: nur Einzelzellen (5%) BDV-positiv. Die BDV-Ausbreitung wurde durch den Inhibitor MI-0701 deutlich gehemmt.

5. DISKUSSION

Borna disease virus (BDV) kann als Modell zum Studium von Ausbreitungs- und Persistenzstrategien neurotroper Viren herangezogen werden (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; CLEMENTE UND LA TORRE, 2009a; HERDEN, 2009).

Ziele dieser Arbeit waren die Untersuchung der Rolle von Astrozyten bei der Ausbreitung und bei der Persistenz des BDV. In der vorliegenden *in vitro* Studie wurden deshalb gezielt der glia-gliale Ausbreitungsmechanismus des BDV in primären Astrozytenkulturen aus dem Cortex cerebri von Lewis Ratten sowie die viralen Transkriptions-, und Translationsstrategien des BDV in Astrozyten untersucht.

Die Ausbreitungsstrategien des BDV werden nach wie vor kontrovers diskutiert (GOSZTONYI et al., 1993; BAJRAMOVIC et al., 2003). Einige Autoren postulieren die BDV-Ausbreitung durch Weitergabe ganzer, behüllter Viruspartikel, die glykoproteinabhängig durch rezeptorvermittelte Endozytose abläuft (DUCHALA et al., 1989; BAJRAMOVIC et al., 2003; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007; HERDEN, 2009). Andere Studien gehen auch von einer Glykoprotein-unabhängigen Ausbreitung durch unbehüllte Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) aus (GOSZTONYI et al., 1993; CUBITT UND DE LA TORRE, 1994; GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a; KOHNO et al., 1999; RICHT UND ROTT, 2001; DE LA TORRE, 2002b; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007). Der Mechanismus der glia-gliale BDV-Ausbreitung ist bisher nicht bekannt. *In vivo* ist das Glykoprotein BDV-GP immunhistologisch lediglich im Zytoplasma von Neuronen nachweisbar (HERDEN et al., 1999; RICHT et al., 1998; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; ALGERMISSSEN, 2010). In Astrozyten konnte bisher kein Glykoprotein nachgewiesen werden (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008).

Zur Etablierung einer persistenten Infektion nutzt das BDV unterschiedliche zeitliche und zellspezifische Strategien in der viralen Replikation, Transkription und Translation (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Zur Klärung der astroglialen BDV-Ausbreitungs- und -Persistenzstrategien wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsstrategien der mit der Virushülle assoziierten Proteine BDV-GP und BDV-M und der für sie kodierenden mRNAs zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. (akut versus chronisch) analysiert.

Ein Vorteil der *in-vitro*-Untersuchung gegenüber Tiermodellen ist die Möglichkeit durch gezielte Intervention die virale Ausbreitung zu hemmen (GARTEN et al., 1989; HALLENBERGER et al., 1992; MIZUTANI et al., 1998; STITZ et al., 1998; PLANZ et al., 2001; BAJRAMOVIC et al., 2003; BAYER, 2010; BECKER et al., 2010). So wurde die funktionelle Rolle des Glykoproteins bei der Virusausbreitung in der vorliegenden Arbeit durch Zugabe eines Furin-Inhibitors zu den BDV-infizierten primären Astrozytenkulturen getestet. Dieser Inhibitor verhindert die Spaltung des BDV-GP in seine funktionellen Untereinheiten. Zum einen kann dadurch auf die Mechanismen der viralen Ausbreitung rückgeschlossen werden, zum anderen können *in vitro* geeignete Substanzen für eine mögliche spätere therapeutische Anwendung getestet werden (GARTEN et al., 1989; RICHT et al., 1998; BAJRAMOVIC et al.,

2003; BAYER, 2010; LABITZKE, 2011, Lennartz et al., 2015). In verschiedenen BDV-infizierten Zelllinien findet sich wenig oder gar kein freies Virus (HERZOG UND ROTT, 1980; PAULI UND LUDWIG, 1985; GOSZTONYI et al., 1993; KOHNO et al., 1999; BAJRAMOVIC et al., 2003; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007), für primäre Astrozytenkulturen ist darüber bisher nichts bekannt. Die BDV-infizierten Primärkulturen wurden deshalb auch auf das Vorhandensein von infektiösen Viruspartikeln im Zellkulturüberstand hin untersucht. Diese Untersuchungen sollten zum weiteren Verständnis der Virusausbreitung, der Adaptions- und Persistenzstrategien des BDV beitragen.

Die große Anzahl unterschiedlicher Zelltypen im ZNS erschwert es, bei *in vivo* Untersuchungen zwischen primären Effekten einer einzelnen Zellpopulation und sekundären Effekten durch andere Zellen, Zellsignalwege oder immunpathologische Vorgänge zu unterscheiden (MANCIOCCO et al., 2009; PUSCHMANN et al., 2010; LANGE et al., 2012). Primäre Zellkulturen kommen den Verhältnissen *in vivo* relativ nahe und ermöglichen die Untersuchung von Effekten einzelner Zellpopulationen (LANGE et al., 2012). *In vitro* Studien stellen somit etablierte Strategien zum Ersatz von Tierversuchen dar. Trotzdem ist es wichtig, die möglichen Beschränkungen und Grenzen dieses Ansatzes zu kennen (SEIFERT et al., 2006; MANCIOCCO et al., 2009; KIMELBERG, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012; AHLEMEYER et al., 2013). In einem ersten Schritt sollte deshalb überprüft werden, ob in den in dieser Studie verwendeten primären Astrozytenkulturen eine gleichartige Zellpopulation wie *in vivo* vorliegt. Untersuchungen hierzu liegen bisher nicht oder nur unvollständig vor (CHU et al., 2001; MANSOUR et al., 2008; CHAN-LING et al., 2009; FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; STIPURSKY et al., 2012a). Aus diesem Grund wurden die Kulturen zunächst in einer Kinetik auf ihre Reifungs- und Differenzierungsmarker getestet. Außerdem wurde untersucht, ob die BDV-Infektion einen Einfluss auf die Zellreifung- oder -differenzierung hat.

5.1 ETABLIERUNG UND EIGNUNG DER ASTROZYTENKULTUREN

In der vorliegenden Studie wurden, basierend auf dem Grundprotokoll von MC CARTHY und DE VELLIS (1978), **verschiedene Präparationsmethoden** hinsichtlich ihrer Zellausbeute miteinander verglichen. Als Parameter wurde herangezogen, welche Kulturen nach der Präparation schneller zu einem konfluenten Monolayer heranwachsen. Die Präparationsmethode mit Trypsinverdau und anschließender mechanischer Zelldissoziation erwies sich hinsichtlich der Zellausbeute als überlegen gegenüber reiner mechanischer Zellzerkleinerung oder Papainverdau mit nachfolgender Zellzerkleinerung.

Die vorher trypsinierten Zellen waren bereits am Tag 6 nach Präparation zu einem fast konfluenten Monolayer gewachsen. Die mit den beiden anderen Präparationsmethoden gewonnenen Kulturen wiesen hinsichtlich ihrer Zellausbeute untereinander keine deutlichen Unterschiede auf und waren frühestens am Tag 7 nach Präparation zu einem fast konfluenten Monolayer gewachsen.

Die Antikörper zur Untersuchung der Reifungs- und Differenzierungsmarker mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden unter anderem an rein mechanisch präparierten Zellen etabliert. Es fanden sich hinsichtlich der Markerexpression qualitativ keine Unterschiede zu den Zellen, die mit Trypsin und Zelldissoziation gewonnen wurden (Daten nicht gezeigt). Durch beide Präparationsmethoden wurden GFAP, Vimentin, S100 β , Nestin, GLAST und GLT-1-positive astrozytäre Zellen gewonnen. Somit wurde die These von MC CARTHY und DE VELLIS (1980) bestätigt, dass die Präparationsmethode keinen Einfluss darauf hat, welcher Zelltyp letztendlich in der Kultur vorliegt.

Morphologisch veränderten sich die Zellen nur in den ersten Tagen nach Präparation. Sie blieben ab etwa 6. DIV in ihrem Aussehen auch bei Langzeitkultivierung nahezu unverändert. Die in dieser Studie verwendeten primären corticalen Astrozytenkulturen entsprachen Typ 1-Astrozyten (BATTER et al., 1992; LANGAN et al., 1995; FAN et al., 1999; BUSHONG et al., 2004; JABS et al., 2008; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Sie schienen morphologisch im Vergleich mit den Verhältnissen in *Slice*-Kulturen und im Rattengehirn jedoch eher Astrozyten der ersten 2 postnatalen Wochen *in vivo* zu gleichen (BUSHONG et al., 2004; FREEMAN, 2010).

Am 1. DIV (*days in vitro*), noch vor Waschen mit eiskaltem PBS, waren in den Kulturen längliche Zellen mit 1-2 Fortsätzen vorhanden, bei denen es sich um Astrozyten oder Neuronen handeln kann. Daneben fanden sich jedoch auch dreieckige bis polygonale Zellen, die den späteren GFAP-positiven Astrozyten ähnelten. Schon am 3. DIV waren deutlich mehr polygonale Zellen vorhanden (im folgenden Astrozyten genannt), die an einigen Stellen bereits kleine Zellinseln bildeten. Die Zellen wiesen z.T. lange Fortsätze auf, mit denen sie Kontakt zu Nachbarzellen oder sogar noch weiter entfernt liegenden Astrozyten aufnahmen. Am Tag 6 nach Präparation waren die Astrozyten nahezu konfluent gewachsen und wiesen überwiegend eine flache, polygonale Struktur auf. Auch die langen Fortsätze einiger Zellen blieben weiterhin erhalten. Im weiteren Verlauf der Kultivierung veränderte sich die Morphologie der Zellen nicht mehr. Der Kontakt-inhibierte Zellmonolayer wurde bei zunehmender Kultivierungsdauer lediglich dichter, die Zellen lagen enger zusammen. Dies entsprach den Beobachtungen früherer Studien (NORTON UND FAROOQ, 1993; LANGAN et al., 1995; KIMELBERG, 2010; LANGE et al., 2012). Wurden die Zellen erneut passagiert, traten sie auch nach längerer Ruhephase wieder in den Zellzyklus ein. Diese Beobachtung deckt sich mit der von LANGAN et al., 1995 und WEINSTEIN (2001), der von einer Zellzykluszeit von 24-28 Stunden für primäre Nagerastrozyten berichtet. Auch bei Langzeitkultivierung behalten corticale Astrozyten ihre Morphologie bei, die v.a. von der Expression der Intermediärfilamente GFAP und Vimentin und ihrer Verknüpfung zu einem dichten Gerüstnetzwerk abhängt (LANGAN et al., 1995; GOURSAUD et al., 2009). Dies konnte in dieser Studie bestätigt werden. Auch nach mehrmaliger Passagierung, Langzeitkultivierung und nach Kryokonservierung waren keine morphologischen Unterschiede zu erkennen. Unter ähnlichen Kulturbedingungen wie in der vorliegenden Arbeit blieb die Astrozytenmorphologie auch bei LANGAN und SLATER (1991) für 2 sowie bei ASOU et al. (1989) für 7 Monate unverändert.

Die gelegentlich vorkommenden Zellen auf dem Monolayer könnten entweder Mikrogliazellen oder Gliaprogenitorzellen darstellen (NORTON UND FAROOQ, 1993), wobei nach neueren Erkenntnissen Mikrogliazellen die häufigsten Kontaminanten in Astrozytenkulturen sind (LANGE et al, 2012).

Vergleicht man die Zellen *in vitro* mit der Astrozytenmorphologie aus Studien hippocampaler *Slice*-Kulturen (BUSHONG et al., 2004), so findet man zunächst Übereinstimmungen, da protoplasmatische Astrozyten in den ersten 2 Wochen p.i. lange, deutlich überlappende Fortsätze haben. Im Gegensatz zu den hier untersuchten primären Astrozytenkulturen, bei denen die Fortsätze auch bei Langzeitkultivierung bestehen bleiben, bilden sich die langen Fortsätze in *Slice*-Kulturen nach ca. 1 Monat wieder zurück, so dass Grenzen zwischen benachbarten Astrozytendomänen entstehen (BUSHONG et al., 2004). Die Ergebnisse in den *Slice*-Kulturen decken sich mit Daten von Astrozyten in Nagergehirnen (FREEMAN, 2010).

Ein Problem beim Studium der Morphologie protoplasmatischer Astrozyten *in vivo* ist, dass der am häufigsten verwendete astrozytäre Marker GFAP nur das elementare sternförmige Zytoskelett anfärbt (BUSHONG et al., 2004; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Dieser Zellteil macht jedoch lediglich 15% des Volumens eines Astrozyten aus (FREEMAN, 2010). Von den primären Ästen zweigen immer feiner werdende Fortsätze ab, die schließlich ein dichtes Netzwerk filigraner terminaler Fortsätze bilden (FREEMAN, 2010). Mature Astrozyten im gesunden Gehirn exprimieren unter physiologischen Bedingungen oft kaum detektierbare Mengen an GFAP (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Aus diesem Grund werden die Gesamtzahl der Astrozyten und das Ausmaß der Astrozytenverzweigung im Gehirn oft unterschätzt. GFAP scheint somit zwar ein verlässlicher Marker für reaktive Astrozyten, nicht aber für mature, nicht aktivierte Astrozyten im gesunden Gehirn zu sein (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010). Alternative zytoplasmatische Marker wie S100 β , Glutamin Synthetase oder GLAST können die feinen Fortsätze aufzeigen, resultieren aber oft in einem unruhigen Färbemuster, bei dem es schwierig ist, die Gesamtmorphologie eines Astrozyten und die Beziehung zu den benachbarten Astrozyten nachzuvollziehen (BUSHONG et al., 2004). Die Probleme bei der Darstellung der kompletten Astrozytenmorphologie *in vivo* erschweren somit einen genauen Vergleich mit der Form der hier verwendeten *in vitro* Astrozyten.

Auch kontaminierende Zellen können die Ergebnisse, die in primären Astrozytenkulturen gewonnen wurden, beeinflussen (LANGE et al., 2012). Die **Untersuchung auf nicht-astrozytäre Zellen** in der Kultur wurde freundlicherweise von Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer, Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig Universität Gießen durchgeführt. Vereinzelt fanden sich am 28. und 42. DIV immunhistologisch MAP-2 positive Neuronen und CNPase-positive Oligodendrozyten. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten waren die mRNA-Level des neuronalen Markers *Mtap2* und des Oligodendrozytenmarkers *Cnp* 500-fach niedriger als der des Astrozytenmarkers *Gfap*, was die Reinheit der Kulturen bestätigt (AHLEMEYER et al., 2013). Die geringe Menge an Neuronen und Oligodendrozyten ist durch die Kulturbedingungen erzielt worden. Zum einen wachsen Neuronen nicht auf unbehandelten Zellkulturgefäßen (COSTANTINI et al., 2010). Zum anderen benötigen sie

Zusätze von bestimmten Vitaminen und nicht essentiellen Aminosäuren zum Zellkulturmedium um wachsen zu können (COSTANTINI et al., 2010). Oligodendrozyten wachsen für gewöhnlich auf der Oberfläche eines Astrozytenmonolayers (LINDSAY et al., 1982; GHAZANFARI UND STEWART, 2001; WU et al., 2011) und werden durch den Waschschrift mit eiskaltem PBS 24 Stunden nach Zellkulturpräparation und vor jeder Passage entfernt (WEINSTEIN, 2001; WU et al., 2011). Die hohe Reinheit der corticalen Rattenastrozyten mit nur 2% und 5% kontaminierenden Zellen stimmt mit vorangegangenen Untersuchungsergebnissen überein (MCCARTHY UND VELLIS, 1980; LINDSAY et al., 1982; RICHT UND STITZ, 1992; SCHWARTZ UND WILSON, 1992; WEINSTEIN, 2001). Neuere Erkenntnisse zeigen, dass bei Astrozytenkulturen v.a. Mikrogliazellen die häufigsten kontaminierenden Zellen sind (LANGE et al., 2012), die sich laut LINDSAY et al. (1981) auf dem Astrozytenmonolayer befinden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nicht speziell auf Mikroglia kontamination untersucht. Vereinzelt fanden sich auf dem Astrozytenmonolayer kleine, rundliche, mikrogliaähnliche Zellen. Durch HERDEN et al. (2005) und OVANESOV et al. (2006) ist allerdings bekannt, dass es bei BDV-infizierten neurogliale Kulturen nicht zu einer BDV-Infektion der darin enthaltenen Mikrogliazellen kommt, so dass davon auszugehen ist, dass alle BDV-infizierten Zellen Astrozyten waren, auch wenn eventuell vereinzelte Mikrogliazellen in der Zellkulturpräparation vorhanden waren.

Die Wahl des **geeigneten Zellkultursystems** hängt vom weiteren Verwendungszweck der primären Astrozytenkulturen ab. Entscheidend für die Verwendung eines Zellkultursystems waren insbesondere Wachstumseigenschaften, Morphologie und Zellanhaftung (Adhäsion) an der Oberfläche des verwendeten Systems. All diese Eigenschaften sind zelltypspezifisch und sollten deshalb für primäre corticale Astrozyten untersucht werden (Nunc Bulletin Nr. 13; Nunc GmbH & Co KG, Deutschland). *In vivo* unterscheidet man Zell-Zell-Adhäsion und die Zell-Matrix Adhäsionen, bei denen Zellen an bestimmte Makromoleküle der extrazellulären Matrix binden (SCHMITZ, 2011). In der Zellkultur ist vor allem die Zell-Substrat Adhäsion von Bedeutung (SCHMITZ, 2011), an denen zweiwertige Kationen und extrazelluläre Matrixkomponenten wie die Adhäsionsproteine Fibronectin bzw. Laminin und Signalstoffe und Proteine aus dem serumhaltigen Zellkulturmedium beteiligt sind (SCHMITZ, 2011). Als Zellkulturflaschen haben sich insbesondere Falcon-Zellkulturflaschen aus Polystyrol (MAGV GmbH, Rabenau) bewährt. Astrozyten wachsen nicht ohne weiteres auf Glasoberflächen. Aus diesem Grunde wurden alle Glasoberflächen zunächst mit 10% SDS vorbehandelt, was die Oberflächenspannung herabsetzt (persönliche Mitteilung SIBYLLE HERZOG, Institut für Virologie; Justus Liebig Universität Gießen). Die Verwendung des ebenfalls die Oberflächenspannung herabsetzenden, in der Zellkultur gebräuchlichen Stoffes Poly-L-Lysin brachte gegenüber SDS keine Vorteile (Daten nicht gezeigt).

Für die Durchführung der indirekten Immunfluoreszenz haben sich für primäre Astrozyten insbesondere SDS-vorbehandelte Multitest-Objektträger® als geeignet erwiesen, da diese bei geringem Zellverbrauch eine einfache Handhabung bei Kultivierung und nachfolgender Immunfluoreszenz erlaubten. Eine Langzeitkultivierung ist auf diesen Systemen jedoch nicht ohne weiteres möglich. Auch SDS-behandelte Glasplättchen in Multiwell-Platten erwiesen

sich als geeignet für die Kultivierung primärer Astrozyten, allerdings war die Zellanhaftung im Vergleich zu den Multitest®-Objektträgern etwas schlechter. Möglicherweise ist die schlechtere Zellanhaftung auf die unterschiedlichen Glasoberflächen zurückzuführen. So wachsen beispielsweise auch Neuronen nicht auf jeder Glasoberfläche. Bereits kleine Unterschiede zwischen europäischen und amerikanischen Borosilikat-Objektträgern beeinflussen das Neuronenwachstum deutlich (Nunc Bulletin Nr. 13; Nunc GmbH & Co KG, Deutschland). Ein großer Vorteil der Multiwell-Platten war die Möglichkeit der Langzeitkultivierung und der Zugabe von Substanzen, wie dem Furininhibitor MI-0701. Auf Lab-Tek® II Chamber Slides wuchsen die primären Astrozyten dagegen kaum, von einer Verwendung für diese Zellen ist daher abzuraten. Möchte man Proteine oder RNA aus den primären Astrozytenkulturen isolieren, sind Zellkulturflaschen, Multi-Wellplatten oder Petrischalen gleich gut geeignet.

Um die Einsatzmöglichkeiten der primären astrozytären Zellkulturen auch im Hinblick auf eine längerfristige Verwendung auszuloten, wurden die Zellen eingefroren und nach dem Auftauen erneut untersucht. Auch nach **Kryokonservierung** und Wiederauftauen der Astrozyten blieb die GFAP-, Vimentin-, S100 β - und Nestin-Expression der Zellen unverändert im Vergleich zur Expression in Zellen, die kontinuierlich kultiviert wurden. Die Zellen entsprachen somit immer noch *immaturen perinatalen Astrozyten* (CHAN-LING et al., 2009; BRAMANTI et al., 2010; BRUNET et al., 2010). Dies zeigt, dass Kryokonservierung von primären corticalen Astrozyten möglich ist. Sie können bereits kommerziell bezogen werden (ECACC, Salisbury, UK). Auch WEINSTEIN (2001) beschreibt ein Protokoll zur Kryokonservierung primärer Nagerastrozyten. Die BDV-Infektion der Zellen wurde durch das Einfrieren und Wiederauftauen der Zellen nicht beeinflusst. Dies entspricht den Ergebnissen in BDV-infizierten Zelllinien (persönliche Mitteilung CHRISTIANE HERDEN und SYBILLE HERZOG). Interessanterweise fanden sich bei der Kryokonservierung zwischen BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozyten Unterschiede bezüglich ihrer Widerstandsfähigkeit. Das Auftauen überlebten deutlich mehr BDV-infizierte Astrozyten als nicht infizierte Astrozyten. Eine Aktivierung der Astrozyten durch die BDV-Infektion (HERDEN et al., 2005; OVANESOV et al., 2006; YANG et al., 2009; PUSCHMANN et al., 2010; YANG et al., 2010) erscheint möglich. OVANESOV et al. (2006) beschrieben eine Mikrogliaaktivierung in BDV-infizierten neuroglialen Zellkulturen, die ohne das Vorhandensein von Astrozyten nicht beobachtet wurde. Unklar ist jedoch, ob Zell-zu-Zellkontakte oder von Neuronen bzw. Astrozyten sezernierte, lösliche Faktoren oder beide Mechanismen eine Rolle bei der Mikrogliaaktivierung spielen.

In Vorversuchen wurde zunächst die geeignete **Zellfixierungsmethode für den Nachweis BDV-spezifischer Proteine in primären Astrozytenkulturen** ermittelt. Die Fixierung mit 4% PFA ergab gegenüber Acetonfixierung eine bessere morphologische Detaillierkennbarkeit und Zellanhaftung. Der Effekt ist auf molekulare Vernetzung von Proteinen (cross-linking) durch Formaldehyd zurückzuführen (BOENISCH, 2005; BUCHVALOV UND BÖCKER, 2010). Die gute morphologische Detaillierkennbarkeit erwies sich für die Untersuchung der Expression der Astrozytenreifungs- und differenzierungsmarker von Vorteil. Für den Nachweis von BDV-

Proteinen wurden dagegen Aceton fixierter Astrozyten verwendet, da sich BDV-M in 4% PFA fixierten Astrozyten nicht sicher nachweisen lässt. Dies ist vermutlich auf eine Veränderung der antigenen Epitope des BDV-M durch die Änderung der nativen dreidimensionalen Proteinkonformation bei Formaldehyd Fixierung zurückzuführen. Dies Effekt wird auch als Antigen Maskierung („antigen masking“) bezeichnet und macht es für den Antikörper schwer oder unmöglich an sein Zielepitop zu binden (BOENISCH, 2005; BUCHVALOV UND BÖCKER, 2010).

5.2 ASTROZYTENREIFUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSMARKER

Die funktionellen Eigenschaften von Astrozyten verändern sich maßgeblich während der Entwicklung sowie als Antwort auf pathologische Prozesse im Gehirn (VERKHRATSKY UND STEINHÄUSER, 2000). Es wird weiterhin diskutiert, ob diese Variabilität Ausdruck unterschiedlicher Stadien der zellulären Reifung ist oder auf die Existenz verschiedener Astrozytenpopulationen zurückgeführt werden kann (VERKHRATSKY UND STEINHÄUSER, 2000; MATTHIAS et al., 2003). *In vitro* Untersuchungen zum Reifestadium und dem Differenzierungstyp von Astrozyten liegen bisher nur unvollständig vor (CHU et al., 2001; MANSOUR et al., 2008; CHAN-LING et al., 2009; FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; STIPURSKY et al., 2012b). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die primären corticalen Astrozytenkulturen der Lewis-Ratte in einer Kinetik auf ihre Reifungs- und Differenzierungsmarker getestet (AHLEMEYER et al., 2013).

5.2.1 Astrozytenreifung

Während ihrer Reifung verändern Astrozyten die Expression bestimmter Markerproteine (SCHWARTZ UND WILSON, 1992; SERGENT-TANGUY et al., 2006; CHAN-LING et al., 2009; BRAMANTI et al., 2010; BRUNNE et al., 2010; AHLEMEYER et al., 2013). So sind in Ratten- und Mäuseastrozyten *in vivo* zum Beispiel Vimentin, Nestin und GFAP während der ersten 7 Tage nach der Geburt hoch exprimiert (SCHWARTZ UND WILSON, 1992; BRAMANTI et al., 2010; BRUNNE et al., 2010). In den folgenden 3 Wochen p.n. (*post natum*, nach der Geburt) nimmt die Expression von Nestin und Vimentin ab, die von GFAP zu (WILLIAMS et al., 1985; MANZANO et al., 2007; CHAN-LING et al., 2009; BRUNNE et al., 2010). Die Daten der hier vorliegenden *in vitro Studie* decken sich zu frühen Untersuchungszeitpunkten mit den Verhältnissen *in vivo*. Am 7. DIV wurden die Intermediärfilamente Vimentin, Nestin und GFAP und das calciumbindende Peptid S100 β in primären corticalen Astrozytenkulturen von fast allen Zellen exprimiert (semiquantitative Auswertung: Score 3). Die Expression dieser Markerproteine blieb *in vitro* allerdings auch am 28. und 42 DIV auf relativ konstant hohem Niveau erhalten (Score 3). *Neuron cell surface antigen*, A2B5 genannt, ließ sich dagegen zu keinem Untersuchungszeitpunkt in primären Astrozyten nachweisen.

In Untersuchungen an Ratten und humanen fetalen Retinae konnten verschiedene Stadien der Astrozytenreifung unterschieden werden, die z.T. parallel vorlagen (CHU et al., 2001; MANSOUR et al., 2008; CHAN-LING et al., 2009) (siehe Abbildung 1).

Astrozytenvorläuferzellen sind vom 15. Embryonaltag bis zum Tag der Geburt vorhanden. Sie sind A2B5 und Vimentin-positiv sowie GFAP und S100 β negativ. Immature perinatale Astrozyten können vom 19. Embryonaltag bis 21. Lebenstag gefunden werden. Sie exprimieren Vimentin, GFAP und S100 β und sind für A2B5 negativ. Der weitere Entwicklungs- und Reifungsverlauf geht mit einem Verlust der Vimentinexpression bei matura perinatalen Astrozyten einher, die bereits am Tag der Geburt vorhanden sind. Auch junge adulten Astrozyten exprimieren nur noch GFAP und S100 β . Gealterte Astrozyten sind von den untersuchten Markern nur noch für GFAP-positiv (CHU et al., 2001; MANSOUR et al., 2008; CHAN-LING et al., 2009). Die hier untersuchten primären corticalen Astrozyten entsprachen hinsichtlich ihrer Markerexpression den Vimentin-, GFAP- und S100 β -positiven, A2B5-negativen **immaturen perinatalen Astrozyten** (CHU et al., 2001; CHAN-LING et al., 2009). Die primären corticalen Rattenastrozyten behielten demnach ihren astrozytären Phänotyp während des Kultivierungszeitraumes, glichen jedoch hinsichtlich ihrer Reifungsmarkerexpression nicht den matura und adulten *in vivo* Astrozyten. Demnach können die primären Astrozyten immatur bleiben oder aber einen aktivierten Phänotyp zeigen (AHLEMEYER et al., 2013). In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten wurden Rattenastrozyten auch nach mehreren Wochen in Kultur als mitotisch aktive Zellen mit einem hohen Prozentsatz an Nestin-positiven Zellen beschrieben (SERGENT-TANGUY et al., 2006).

Vimentin und **GFAP** (*glial fibrillary acidic protein*, Saures Gliafaserprotein) sind Klasse III Intermediärfilament-Proteine (HERRMANN UND AEBI, 2000). *In vivo* wird Vimentin in reaktiven Astrozyten nach ZNS Insulten aufreguliert (EDDLESTON UND MUCKE, 1993; PUSCHMANN et al., 2010) aber auch von immaturen Astrozyten und Astrozytenvorläufern exprimiert (SCHNITZER et al., 1981; BIGNAMI et al., 1982; LENDAHL et al., 1990). Die Vimentinexpression fällt *in vivo* bei zunehmender Astrozytenausreifung ab, während die GFAP-Expression im Zuge der Maturation ansteigt (BOVOLENTA et al., 1984; PIXLEY UND VELLIS, 1984; MANZANO et al., 2007; BRAMANTI et al., 2010; BRUNNE et al., 2010; COSTANTINI et al., 2010; AHLEMEYER et al., 2013). In der vorliegenden *in vitro* Studie war dagegen sowohl zu frühen Untersuchungszeitpunkten (7. DIV) als auch nach längerer Kultivierung (42. DIV) eine starke GFAP und Vimentin Expression zu verzeichnen, wobei bei der Auswertung nicht die Stärke der Fluoreszenz, sondern die Anzahl positiver Zellen berücksichtigt wurde. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von SCHWARTZ UND WILSON (1992), die *in vitro* 90-100% GFAP und Vimentin-positiv corticale Rattenastrozyten beschrieben. Auch langzeitkultivierte und zwischendurch eingefrorene Astrozytenkulturen zeigten nach achtmonatiger Kultivierung in über 80% der Zellen Vimentin- und GFAP-Expression. Freundlicherweise wurde von Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer (Institut für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig Universität Gießen) eine Western-Blot und real-time PCR Untersuchung von 28 und 42 Tage alten, nicht BDV-infizierten Rattenastrozyten durchgeführt. Die Western-Blot-Untersuchung ergab zeitliche Unterschiede in der Vimentin- und GFAP-Expression (AHLEMEYER et al., 2013). So sanken beide Proteinlevel von Tag 28 auf Tag 42 ab und semiquantitative Analysen zeigten einen Anstieg im GFAP/Vimentin Verhältnis

von 1,7 (AHLEMEYER et al., 2013). Bei der GFAP mRNA war dagegen vom Tag 28 zum Tag 42 eine deutliche Zunahme zu verzeichnen, während die Vimentin mRNA signifikant abfiel. Inwieweit dies auf eine Ausreifungstendenz der Zellen hindeutet, bleibt abzuklären. Auch BUSHONG et al., (2004) berichten von einer Zunahme der GFAP-Immunreaktivität bei protoplasmatischen Astrozyten in hippocampalen *Slice Cultures* vom Tag 7 zum Tag 14 p.n.. In der vorliegenden Arbeit war die GFAP-Expression der protoplasmatischen Astrozyten über die Zeit dagegen konstant hoch. Beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien ist allerdings grundsätzlich zu beachten, dass z.T. unterschiedliche Auswertungskriterien herangezogen werden. In einigen Studien wird, wie in der vorliegenden Arbeit, die Anzahl positiver Zellen bestimmt, während Andere die Stärke der Immunfluoreszenzreaktion bewerten, so dass ein direkter Vergleich zwischen diesen Studien limitiert ist.

S100 β ist ein calciumbindendes Peptid, das hauptsächlich von Astrozyten gebildet wird und parakrine und autokrine Effekte auf Neuronen und Gliazellen ausübt (ROTHERMUNDT et al., 2003). Immunhistologisch konnten in etwa gleichbleibende Werte der S100 β -Expression von Tag 7, 28 und 42 festgestellt werden. Auch durch Western-Blot Analyse fand sich keine signifikante Veränderung der S100 β -Expression in Rattenastrozyten (AHLEMEYER et al., 2013). Langzeitkultivierte und zwischendurch eingefrorene Astrozytenkulturen zeigten nach achtmonatiger Kultivierung ebenfalls noch eine S100 β -Expression in über 80% der Zellen.

Neuron cell surface antigen, auch **A2B5** genannt, sind Gangliosid-Epitope auf der Plasmamembran von Neuronen, neuroendokrinen Zellen und Gliazellen (DUBOIS-DALCQ, 1987). Der Marker ist unter anderem in oligodendroglialen Vorläuferzellen vorhanden und findet sich in immaturren Zellen, die sich entweder zu Typ 2 Astrozyten oder zu Oligodendrozyten differenzieren (DUBOIS-DALCQ, 1987; ALOISI et al., 1988; MARÍN-PADILLA, 1995; YANG UND HERNANDEZ, 2003). Im Gegensatz dazu machen MANSOUR et al. (2008) und CHAN-LING et al. (2009) keine Aussage, ob sich A2B5 positive Astrozytenvorläuferzellen (*astrocyte precursor cells*) zu Typ II oder Typ I Astrozyten entwickeln. In der vorliegenden Arbeit waren alle Zellen A2B5 negativ, was dafür spricht, dass entweder nur Typ 1 Astrozytenvorläuferzellen vorhanden waren (DUBOIS-DALCQ, 1987; ALOISI et al., 1988; MARÍN-PADILLA, 1995) und/oder die Zellen bereits weiter ausgereift waren (MANSOUR et al., 2008; CHAN-LING et al., 2009).

Nestin ist ein großes Intermediärfilamentprotein der Klasse Typ IV und dient als Marker neuronaler Stammzellen (BRAMANTI et al., 2010). Es wird vorübergehend auch in immaturren Astrozyten mit GFAP koexprimiert (BRAMANTI et al., 2010; BRUNNE et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels indirekter Immunfluoreszenz kein Unterschied in der Zahl Nestin-positiver Zellen von 7, 28 und 42 Tage alten Astrozyten gemacht werden. Auch langzeitkultivierte und zwischendurch eingefrorene Astrozytenkulturen zeigten nach achtmonatiger Kultivierung noch eine Nestin-Expression in fast allen Zellen (Score 3). In einer Western-Blot und real-time PCR Untersuchung von 28 und 42 Tage alten, nicht BDV-infizierten Rattenastrozyten zeigte sich, dass die Nestinexpression und der entsprechenden mRNA von Tag 28 zu Tag 42 abfiel (AHLEMEYER et al., 2013). Reaktive adulte Astrozyten exprimieren ebenfalls erneut Nestin (BRAMANTI et al., 2010). Interessanterweise war die

Nestinexpression bei 52 Tage alten und 3 Wochen nicht passagierten Astrozyten nur schwach nachweisbar. Eine kurz vor der Immunfluoreszenztestung vorgenommene Subkultivierung könnte zu einer Aktivierung oder Dedifferenzierung der Astrozyten geführt haben (YANG UND HERNANDEZ, 2003; PUSCHMANN et al., 2010), was die starke Nestin-Expression erklären kann. Die Vimentin und GFAP-Expression blieb dagegen bei den nicht passagierten Zellen auf annähernd gleich hohem Niveau wie die der kürzlich passagierten Zellen. Wenn die nicht passagierten Astrozyten einen nicht reaktiven Phänotyp darstellen, würde man jedoch auch eine verminderte GFAP-Expression (MANSOUR et al., 2008; PUSCHMANN et al., 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010) und eine verminderte oder fehlende Vimentinexpression erwarten (EDDLESTON UND MUCKE, 1993; PUSCHMANN et al., 2010). Dies war hier jedoch nicht der Fall.

Die Frage bezüglich Immaturität oder Reaktivität kultivierter Astrozyten wird auch in der Literatur immer noch kontrovers diskutiert (CAHOY et al., 2008). Einige Autoren favorisieren die These einer altersabhängig unterschiedlichen Astrozytenreaktivität (PUSCHMANN et al., 2010). Während Kulturen von neonatalen Tieren aufgrund ihres hohen Expressionslevels von GFAP reaktiven Astrozyten ähneln sollen (PUSCHMANN et al., 2010; LANGE et al., 2012), zeigen die Zellen, die von adulten Tieren präpariert werden, laut PUSCHMANN et al., 2010 keinen reaktiven Phänotyp. NORTON und FAROOQ (1993) berichten dagegen, dass die Verwendung älterer Tiere, bei denen die Gliogenese *in vivo* bereits abgeschlossen ist, auch nicht zu einer Gewinnung von maturen Astrozyten führt, da die kultivierten Astrozyten aus einer kleinen immaturen Stammzellpopulation entstehen. LANGE et al. (2012) vermuten dagegen eine reaktive Natur der Kulturen durch den physikalischen Stress bei der initialen Präparation. Definitive Daten bezüglich des Phänotyps kultivierter Astrozyten im Vergleich mit reaktiven *in vivo* Astrozyten fehlen allerdings (LANGE et al., 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte lediglich eindeutig gezeigt werden, dass die primären corticalen Astrozyten bei längerer Kultivierungsdauer hinsichtlich der hier untersuchten Astrozytenreifungsmarker nicht mit den Astrozyten in Rattengehirnen übereinstimmen.

Ein weiteres Problem bei der Identifizierung des exakten Reifungszustandes von Astrozyten ist nach wie vor der Mangel an verlässlichen Markern. Die Frage welche Proteine Astrozyten während ihrer Entwicklungsperiode exprimieren und wie sie zu unterscheiden sind, hat zur Entdeckung von verbesserten Markern wie Aldh1L1 (*aldehyde dehydrogenase 1 family member L1*) geführt (CAHOY et al., 2008; FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Weitere Marker für Astrozyten oder deren Vorläuferzellen sind FGF Rezeptor 3 (wird auch von Oligodendrozyten exprimiert), GLAST, *fatty acid-binding protein 7, brain lipid-binding protein* (BLBP) (wird auch während der Neurogenese in radialen Gliazellen exprimiert), SOX9, NFIA und NFIB (BRUNNE et al., 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010), sowie Glutamin Synthetase (GS), Pyruvat Carboxylase (PC) und GLT-1 (LANGE et al., 2012). Als relativ neuer Marker für den Reifungsgrad von Astrozyten kann deren Glykogenmetabolismus angesehen werden (BRUNET et al., 2010). Hierbei scheint insbesondere die PTG (*Protein targeting to Glycogen*) Expression ein wertvoller Marker zur Identifizierung maturer Astrozyten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu sein (LOVATT et al.,

2007; BRUNET et al., 2010). Für die Astrozytenforschung wäre die Identifikation neuer Marker für die Schlüsselstadien der Astrozytenentwicklung und zur Unterscheidung der heterogenen Astrozytenvorläuferstadien und maturer Astrozyten von großem Vorteil (ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010). Primäre corticale Astrozyten der Ratte wurden bisher noch nicht systematisch auf diese neuen Marker untersucht.

Besteht experimentell bedingt die Notwendigkeit, den Verhältnissen *in vivo* so nahe wie möglich zu kommen, so kann die Astrozytenreifung künstlich beeinflusst werden (GOURSAUD et al., 2009; LANGE et al., 2012; STIPURSKY et al., 2012b). Das extrazelluläre Milieu beeinflusst auch *in vivo* während der Gliogenese die Regulation der Transkriptionsfaktoren und Genexpression und bedingt dadurch eine weitere Ausdifferenzierung der Zellen (LANGE et al., 2012). *In vitro* kann die Ausreifung von Astrozyten beispielsweise durch Zugabe von dibutyryl cyclic AMP (dbcAMP) und fetalem Kälberserum (FCS) erreicht werden (LANGE et al., 2012). Außerdem bewirkt die Zugabe von embryonalen corticalen Neuronen zu Astrozytenmonolayern eine weitere Ausdifferenzierung der Astrozyten, vermutlich über Aktivierung des TGF- β 1-Weges (STIPURSKY UND GOMES, 2007; COSTANTINI et al., 2010; AHLEMEYER et al., 2013). Allerdings ist die Kokultivierung von Neuronen und Astrozyten für mehrere Wochen sehr schwierig, da die Neuronen-Astrozytenrate sich aufgrund unterschiedlicher Proliferationsraten zu Gunsten der Astrozyten verändert (GOURSAUD et al., 2009; AHLEMEYER et al., 2013). Einen ähnlichen Effekt auf die Astrozytenreifung hat aber auch die Zugabe von konditioniertem Medium zu Astrozyten, das von Neuronenkulturen abgenommen wurde (LANGE et al., 2012; STIPURSKY et al., 2012b). Die Anreicherung des Zellkulturmediums mit Wachstumsfaktoren und Nährstoffen wie Glukose bewirkt eine Veränderung der Astrozyten im Sinne eines aktivierten Phänotyps (stärkere GFAP-Expression). Im Gegensatz dazu zeigt sich immunhistologisch keine Veränderung der Vimentin-Expression (GOURSAUD et al., 2009). Wie diese artifizielle Reifung die Genexpression verändert oder der *in vivo* Situation entspricht, ist jedoch nicht bekannt (LANGE et al., 2012). Eine künstlich herbeigeführte Reifung der Zellen sollte unter anderem deshalb im Hinblick auf die weitere experimentelle Verwendung kritisch betrachtet werden. Außerdem ist z.B. für BDV-infizierte Zellkulturen bekannt, dass der Zusatz von Neurotrophinen wie NGF oder BDNF die BDV-Replikation erhöhen kann (CARBONE et al., 1993; IBRAHIM et al., 2002; HANS et al., 2004).

Inwieweit in der vorliegenden Arbeit das Zellkulturmedium mit der darin enthaltenen Glucose und dem Zusatz von FCS zu einer Aktivierung der Astrozyten mit Aufregulation von GFAP und Nestin geführt hat ist, unklar. Allerdings wurde gezeigt, dass bei 3 Wochen nicht passagierten Astrozyten unter Verwendung des gleichen Mediums kaum noch eine Nestinexpression vorhanden war. So kann zumindest der Einfluss des Mediums und des FCS auf die Nestinexpression bezweifelt werden.

5.2.2 Astrozytendifferenzierung

Neuere Erkenntnisse zur Astrozytendifferenzierung deuten auf die Existenz von unabhängigen Vorläuferzellen für Typ 1 und Typ 2-Astrozyten hin (MARÍN-PADILLA, 1995; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010), deren Entwicklung schon früh während der ZNS-Entstehung festgelegt ist (BRIBIAN et al., 2015). Die beiden astrozytären Zelltypen unterscheiden sich unter anderem durch die Expression von entweder Glutamatrezeptoren in Zellen, die nicht *Gap junction* gekoppelt sind (**Typ 2-Astrozyten**) oder Glutamattransportern GLAST und GLT-1 in Zellen mit ausgeprägter *Gap junction* Kopplung (**Typ 1-Astrozyten**) (VERKHRATSKY UND STEINHÄUSER, 2000; WALLRAFF et al., 2004; JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010). Typ 2 Astrozyten entstehen wie Oligodendrozyten aus der sogenannten O-2 Linie (Norton und FAROOQ, 1993) und sind A2B5- und GFAP-positiv (MILLER UND RAFF, 1984; ANDERSSON et al., 1994). Fibröse Typ 2-Astrozyten kommen in der gesamten weißen Gehirns substanz vor, protoplasmatische Typ 1-Astrozyten findet man dagegen in der grauen Substanz (GOURSAUD et al., 2009; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012; BRIBIAN et al., 2015). Die Präparation von Astrozyten aus den Cortex cerebri neugeborener Ratten mittels Standardprotokoll ergibt dementsprechend Kulturen, die hauptsächlich aus protoplasmatischen Typ 1-Astrozyten bestehen (BROWN, 1998). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die hier verwendeten primären corticalen Astrozyten hatten eine protoplasmatische Form. Sie waren ausschließlich A2B5 negativ, der überwiegende Teil war GLAST-positiv und einige wiesen eine GLT-1-Expression auf. Sie entsprachen somit allen Kriterien der Typ 1-Astrozyten.

Im Gegensatz zu Mausastrozyten behielten die Rattenastrozyten bei gleichen Präparations- und Kulturbedingungen ihre GLAST- und GLT-1-Expression auch noch am Tag 42 (AHLEMEYER et al., 2013). GLAST- und GLT-1 werden auf hohem Niveau nur während der Reifung (PERTUSA et al., 2007), nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder β -Lactam Antibiotika (VERMEIREN et al., 2005b; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; LANGE et al., 2012) oder während reaktiver Gliose (VERMEIREN et al., 2005a) exprimiert. Aus diesem Grund zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Rattenastrozyten ihre Funktionalität und Reifungsneigung während der Kultivierung besser beibehalten als Mausastrozyten (AHLEMEYER et al., 2013).

In vivo sind GLT-1 und GLAST zellulär und regional unterschiedlich verteilt (ANDERSON UND SWANSON, 2000). In Bergmann Gliazellen findet man eine starke GLAST-Expression, während sie in Astrozyten anderer Gehirnregionen geringer ausfällt (ANDERSON UND SWANSON, 2000). Astrozyten, die in unmittelbarer Nachbarschaft von glutamatergen Synapsen gelegen sind, exprimieren mehr GLAST als solche, die sich im Bereich von Kapillaren oder der Pia mater befinden (ANDERSON UND SWANSON, 2000). GLT-1 wird im adulten Gehirn v.a. im Nucleus caudatus, Cortex cerebri und Hippocampus exprimiert. Im Kleinhirn finden sich niedrigere GLT-1 Level (ANDERSON UND SWANSON, 2000). Nach diesen Ergebnissen müssten in den primären corticalen Astrozyten eigentlich GLT-1 der vorherrschende Glutamattransporter sein, was sich in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht

bestätigen ließ. Die Glutamattransporterexpression wird *in vivo* jedoch noch durch andere Faktoren beeinflusst. So ist GLAST in immaturren astroglialen Zellen der überwiegende Glutamattransporter, während die GLT-1-Expression und Aktivität während der Entwicklung zunimmt, so dass dieser Transporter erst ab der 3. postnatalen Woche nachzuweisen ist und letztendlich im adulten Gehirn vorherrscht (ANDERSON UND SWANSON, 2000; GOURSAUD et al., 2009; BRUNNE et al., 2010).

Auch im Zuge des adaptiven Prozesses der reaktiven Astroglieose kommt es zu einer deutlichen Aufregulierung der GLAST- und GLT-1-Expression sowie der Glutamat Synthetase (GS) (GOURSAUD et al., 2009). Die Glutamataufnahme wird indirekt auch durch das intrazelluläre Intermediärfilament-Netzwerk beeinflusst. So begünstigt eine erhöhte GFAP-Expression in reaktiven Astrozyten nach hypoxischen Insulten die Membranverankerung von GLAST (GOURSAUD et al., 2009). In der Tat nimmt die Dicke der Zellfortsätze bei reaktiven Astrozyten zu (WILHELMSSON et al., 2006), ebenso wie die GFAP-, die Vimentin- (PEKNY UND NILSSON, 2005) und die Nestin-Expression (KORZHEVSKII et al., 2008). Da nicht sicher gesagt werden kann, ob die kultivierten Astrozyten einen reaktiven Phänotyp haben oder eventuell immature Entwicklungsstadien darstellen, kann über einen möglichen Einfluss auf die Glutamattransporterexpression nur spekuliert werden.

5.2.3 Einfluss der BDV-Infektion auf Astrozytenreifung und -differenzierung

Die primären Astrozyten ließen sich mit BDV infizieren und konnten ohne Verlust der Infektiosität subkultiviert werden. Dies deckte sich mit den Ergebnissen früherer Studien (HERZOG UND ROTT, 1980). In Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen fanden sich keine Veränderungen der Astrozytenmorphologie bei BDV-infizierten Zellen verglichen mit nicht infizierten Astrozyten (HERZOG UND ROTT, 1980; RICHT UND STITZ, 1992; IBRAHIM et al., 2002; TOMONAGA et al., 2002). Canines Staupevirus, dessen Hauptzielzellen Astrozyten sind, führt *in vivo* zu einer Zunahme von Vimentin positiven Astrozyten (SEEHUSEN et al., 2007). Ein Einfluss der BDV-Infektion auf **Astrozytenreifungsmarker** GFAP, Vimentin, Nestin und S100 β konnte in der vorliegenden Arbeit dagegen nicht nachgewiesen werden. GONZALEZ-DUNIA et al. (1996) und FRIEDL et al. (2004) konnten bei BDV-infizierten C6-Glioma-Zellenlinien und in cerebellären *Slice cultures* von Mäusen ebenfalls keine GFAP-Aufregulation feststellen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei Astrozyten konnten auch HANS et al. (2001, 2004) keine BDV-induzierten Veränderungen neuronaler Marker in P12-Zellen feststellen.

Die Infektion mit BDV soll jedoch die Funktion von Astrozyten beeinträchtigen (BILLAUD et al., 2000; GONZALEZ-DUNIA et al., 2005; OHTAKI et al., 2007; PENG et al., 2007). So induziert BDV in primären feline Astrozytenkulturen eine Hemmung der Glutamataufnahme (BILLAUD et al., 2000). *In vitro* wurde auch eine Aufregulation des *Tissue factor* beschrieben (GONZALEZ-DUNIA et al., 1996). Dieser spielt eine Rolle in der neuronalen Entwicklung und Plastizität sowie der Regulation der Astrozytenmorphologie und des Neuritenwachstums (GONZALEZ-DUNIA et al., 2005). In murinen Astrozyten scheint BDV Signalübertragungswege zu hemmen, die in einer Inhibition der *iNOS*-Aktivierung resultieren. Möglicherweise haben

BDV-infizierte Gliazellen dadurch eine beeinträchtigte immunologische Abwehr (PENG et al., 2007). *In vivo* wurde im Gegensatz zu den hier gewonnenen Ergebnissen eine Herabregulation von S100 β durch die BDV-Infektion beschrieben, obwohl eine deutliche Astrozytose mit Aufregulierung von GFAP vorhanden ist (OHTAKI et al., 2007). S100 β scheint über Bindung an den zellulären Oberflächenrezeptor RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) als ein Zytokin zu fungieren und Entzündungsreaktionen auszulösen. Scheinbar fördert eine Aktivierung von S100 β die vaskuläre Entzündungsreaktion und dadurch die enzephalitogene T-Zell Infiltration (OHTAKI et al., 2007). *In vitro* fällt dagegen der Einfluss von Immunzellen und Zytokinen weg. Eine BDV-induzierte Herabregulation der Entzündungsreaktion könnte *in vivo* die virale Persistenz fördern.

5.3 EINSATZ UND GRENZEN PRIMÄRER CORTICALER ASTROZYTEN AM BEISPIEL DER UNTERSUCHUNG DER BDV-AUSBREITUNG

Pathogenitätsstudien zu neurotrophen Virusinfektionen, z.B. der Bornaschen Krankheit, werden klassischerweise im Tiermodell, meist mit experimentell infizierten Nagern (HERZOG et al., 1984; ROTT UND BECHT, 1995; HALLENSLEBEN et al., 1998; HERDEN et al. 1999, 2000; SAUDER UND STAEHELI, 2003; POROMBKA et al., 2008a; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; SOLBRIG, 2010; KRAMER et al., 2012) sowie *in-vitro* mit infizierten Zelllinien durchgeführt (DANNER UND MAYR, 1979; HERZOG UND ROTT, 1980; PAULI UND LUDWIG, 1985; RICHT et al., 1991; CARBONE et al., 1993; MIZUTANI et al., 1998; JORDAN et al., 1999; FORMELLA et al., 2000; JEHLLE et al., 2000; HANS et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2001; KRAUS et al., 2001; PLANZ et al., 2001; BAJRAMOVIC et al., 2002; KIERMAYER et al., 2002; SAUDER et al., 2004; EICKMANN et al., 2005; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007, 2009; BAYER, 2010; CLEMENTE et al., 2010; LABITZKE, 2011). Da die Studien an Zelllinien die Vorgänge, die nach neurotroper Virusinfektion in dem komplexen Zellverband von Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia im ZNS von statten gehen, nur bedingt widerspiegeln können, sind Tierversuche nach wie vor oft unerlässlich (MANCIOCCO et al., 2009). Klassischerweise erfolgt für *In-vivo*-Studien die Infektion der Versuchstiere durch direkte Injektion der Virussuspension in das Gehirn (HERZOG et al., 1984; ROTT UND BECHT, 1995; HALLENSLEBEN et al., 1998; HERDEN et al., 2000; HORNIG et al., 2001; SAUDER UND STAEHELI, 2003; POROMBKA et al., 2008a; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). Um Untersuchungen im zeitlichen Verlauf der Erkrankung durchführen zu können, werden die Tiere jeweils im akuten und chronisch persistierenden Stadium zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet (HERDEN et al. 2000; POROMBKA et al., 2008a; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008).

Im Sinne des 3R-Bezuges (*Replacement, Reduction and Refinement*; Ersatz, Reduzierung und Verbesserung/Verfeinerung von Tierversuchen) ist es ein signifikanter Vorteil, primäre Zellkulturen als Ersatzmethode zu *in vivo*-Tierversuchen einsetzen zu können (Broschüre Hightech statt Tiere; BMBF, 2001; MANCIOCCO et al., 2009). Die BDV-Infektion von primären Zellkulturen erfolgt erst nach deren Gewinnung aus den Gehirnen der Tiere (HERZOG UND ROTT, 1980; BILLAUD et al., 2000; BAJRAMOVIC et al., 2003; HANS et al., 2004; OVANESOV et al., 2006; KÖSTER-PATZLAFF et al., 2007; OVANESOV et al., 2008). Zellkulturen können

dabei durch Kokultivierung mit BDV-infizierten Gehirnzellen oder durch Inokulation mit Gehirnhomogenaten BDV-erkrankter Tiere infiziert werden (DE LA TORRE, 2002a). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten primären Astrozytenkulturen wurden jeweils aus einem Wurf neonataler Ratten präpariert und am 1. DIV BDV-infiziert. Schmerzen und Leiden, die den Tieren bei *in vivo* Versuchen durch Virusinfektion und nachfolgende klinische Erkrankung entstehen würden, wurden so vermieden. Die Belastung für das Einzeltier durch die neurotrope Virusinfektion kann somit durch den Einsatz von verlässlichen *In-vitro*-Modellen signifikant gesenkt werden (*Refinement* und *relative Replacement*) (MANCIOCCO et al., 2009). Ein weiterer Vorteil der Verwendung primärer Astrozytenkulturen ist die Möglichkeit der Langzeitkultivierung infizierter Zellen, was bereits für BDV-infizierte primäre feline Astrozyten bis zum 100. dpi gezeigt werden konnte (BILLAUD et al., 2000). Auch eine Kryokonservierung der BDV-infizierten primären Astrozyten ist möglich. Dadurch steht jederzeit Material für die Etablierung neuer Methoden zur Verfügung, was zu einer Reduzierung an Versuchstieren führen kann (*Reduction*). Ein weiterer Gewinn der *in-vitro*-Studie gegenüber Tiermodellen ist darüber hinaus die Möglichkeit durch gezielte Intervention die virale Ausbreitung zu hemmen ohne Nebenwirkungen bei *in vivo*-Versuchen befürchten zu müssen (GARTEN et al., 1989; HALLENBERGER et al., 1992; BAYER, 2010; BECKER et al., 2010, 2012; LABITZKE, 2011; Lennartz et al., 2015). Die Hemmung der BDV-Ausbreitung mittels Furin Inhibitor MI-0701 wurde auch in der vorliegenden Studie erfolgreich durchgeführt. Zum einen kann dadurch auf die Mechanismen der viralen Ausbreitung rückgeschlossen werden. Zum anderen können *in vitro* geeignete Substanzen für eine mögliche spätere therapeutische Anwendung getestet werden (persönliche Mitteilung WOLFGANG GARTEN).

Grundsätzlich stellen *In vitro*-Studien etablierte Strategien zum Ersatz von Tierversuchen dar. Trotzdem ist es wichtig, die möglichen Beschränkungen und Grenzen dieses Ansatzes zu kennen (SEIFERT et al., 2006; MANCIOCCO et al., 2009; KIMELBERG, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012; AHLEMEYER et al., 2013). Die komplexe dreidimensionale anatomische und synaptische Organisation des ZNS kann weder durch Zelllinien noch durch primäre Zellkulturen nachgeahmt werden (MANCIOCCO et al., 2009; LANGE et al., 2012). Auch organotypische Schnittkulturen (*organotypic slice cultures*) werden aus ihrer natürlichen Umgebung entnommen und unterliegen während der Kultivierung experimentellen Variabilitäten (MANCIOCCO et al., 2009). Bei der Planung von Versuchen mit primären Astrozytenkulturen kann es deshalb problematisch sein davon auszugehen, dass es sich um genau die gleichen Zellen wie *in vivo* handelt. (HANSSON, 1986; CAHOY et al., 2008; KIMELBERG, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012; STIPURSKY et al., 2012a; AHLEMEYER et al., 2013). Wie bereits beschrieben und diskutiert, reifen die hier verwendeten primären Astrozytenkulturen nicht vollständig aus, sondern gleichen immaturren perinatalen oder reaktiven Astrozyten früherer Studien (NORTON UND FAROOQ, 1993; CAHOY et al., 2008; PUSCHMANN et al., 2010; LANGE et al., 2012). Bedacht werden sollte, dass während der Astrozytenreifung eine Veränderung der Astrozytenfunktion stattfindet (LANGE et al., 2012). Im Bereich der Astrozytenforschung gibt es zum Teil

widersprüchliche Daten und Interpretationen, die unter anderem durch die Verwendung von Astrozyten unbekanntem Differenzierungstyps oder Entwicklungsstadiums zustande kommen (KIMELBERG, 2010). Der Differenzierungsgrad der Zellen sowie deren Gen- und Rezeptorexpression, hängt unter anderem von der Zusammensetzung des extrazellulären Milieus, inklusive des Mediums und anderer in der Kultur vorhandener Zellen ab (HANSSON, 1986; GOURSAUD et al., 2009; LANGE et al., 2012; STIPURSKY et al., 2012a; STIPURSKY et al., 2012b; AHLEMEYER et al., 2013). Auch Antibiotikazusätze, Zusammensetzung des FBS/FCS, Glukosekonzentration, Beschichtung der Kultursysteme, Subkultivierung und Alter der Zellen können eine bedeutende Rolle spielen (SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; LANGE et al., 2012).

Je nach präparierter Gehirnregion erhält man unterschiedliche Astrozytenpopulationen (FEDOROFF et al., 1983; BROWN, 1998; GOURSAUD et al., 2009; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012), die sich funktionell, morphologisch sowie hinsichtlich ihrer Genexpressionsprofile, ihrer Oberflächenproteine und ihrer Enzymausstattung unterscheiden (WALLRAFF et al., 2004; JABS et al., 2008; GOURSAUD et al., 2009; KIMELBERG, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; SOFRONIEW UND VINTERS, 2010; VERKHRATSKY UND PARPURA, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010; LANGE et al., 2012; PARPURA et al., 2012). Deshalb sollten Beobachtungen, die durch den Gebrauch von Astrozyten einer Region gemacht werden, nicht automatisch auf alle Astrozyten übertragen werden (BACHOO et al., 2004; LANGE et al., 2012). Unser gegenwärtiges Wissen über die Heterogenität von Astrozyten, insbesondere bezüglich ihrer funktionellen Unterschiede sind allerdings immer noch rudimentär (JABS et al., 2008; ZHANG UND BARRES, 2010). Studien zeigen, dass neben den bekannten Typ-1- und Typ2-Astrozyten, sowie Bergmann Glia Zellen möglicherweise noch mehr Subtypen von Astrozyten existieren (NORTON und FAROOQ, 1993; FREEMAN, 2010; ROWITCH UND KRIEGSTEIN, 2010; ZHANG UND BARRES, 2010). Auch die spezifische Rolle der unterschiedlichen Astrozytensubtypen in neurologischen Erkrankungen muss erst noch erforscht werden (SEIFERT et al., 2006).

Auch die zur Präparation verwendete Tierspezies kann einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben. Astrozyten von Ratten und Mäusen unterscheiden selbst unter identischen Kulturbedingungen hinsichtlich ihres Phänotyps, des Reifungsgrades und ihrer Funktionen (PUSCHMANN et al., 2010; AHLEMEYER et al., 2013). AHLEMEYER et al., (2013) konnten zeigen, dass Rattenastrozyten im Vergleich zu Mausastrozyten *in vitro* weiter ausreifen, auch wenn beide partiell immatur verbleichen. Da die Proteinlevel von GLAST und GLT-1 bei Typ 1 Mausastrozyten, nicht jedoch bei Typ 1 Rattenastrozyten, im Laufe der Zeit abfallen, scheinen Rattenastrozyten für funktionelle Studien und für Langzeitexperimente besser geeignet zu sein (AHLEMEYER et al., 2013).

Diesen Problemen und Grenzen des *in vitro*-Ansatzes sollte man sich bei Forschungsarbeiten mit primären Astrozytenkulturen bewusst sein und insbesondere auch beim Vergleich von Ergebnissen aus unterschiedlichen Studien mit verschiedenen Präparationsmethoden oder Zellkulturtechniken bedenken (HANSSON, 1986; KIMELBERG, 2010; LANGE et al., 2012; AHLEMEYER et al., 2013).

Zur Untersuchung der BDV-Proteinexpression wurde als Referenz für die virale Translationsleistung BDV-N nachgewiesen. In Astrozyten konnte das *in vivo*-typische BDV-N Verteilungsmuster sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma infizierter Zellen bestätigt werden. In Zelllinien wie MDCK, COS-7, und Vero-Zellen findet sich BDV-N dagegen ausschließlich in den Zellkernen (PYPER UND GARTNER, 1997; BAYER, 2010; LABITZKE, 2010). Somit scheinen primäre Astrozytenkulturen die *In vivo*-Situation in BDV-infizierten Gehirnen besser widerzuspiegeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte aber auch gezeigt werden, dass die verwendeten primären Astrozyten nicht die gleichen Zellreifungsmarker exprimieren wie gleichalte *in vivo* Astrozyten. Stattdessen verbleiben sie in einem immaturren perinatalen Entwicklungsstadium bzw. ähneln reaktiven *in vivo* Astrozyten. Eine BDV-Infektion der Zellkulturen hatte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Astrozytenreifung und –differenzierung.

Ein Ziel dieser Studie war die Untersuchung der glia-glialen BDV-Ausbreitung. Zu diesem Zweck wurde die Expression der Hüllproteine BDV-M und BDV-GP in Astrozyten untersucht. Weiterhin konnte durch Zugabe eines Furin-Inhibitors zu den Kulturen die Notwendigkeit des BDV-Glykoproteins für die glia-gliale BDV-Ausbreitung gezeigt werden. Zur Beantwortung dieser, speziell die BDV-infizierten Astrozyten betreffenden Fragen, erwiesen sich die primären Astrozytenkulturen als sehr wertvolle Werkzeuge. Aufgrund der Beschränkungen des *in vitro* Ansatzes sollten die Ergebnisse *in vivo* in Tierversuchen überprüft werden. Dieses Vorgehen des kombinierten Ansatzes von *in vitro*- und *in vivo*-Studien wird auch von HANSSON et al., 1986, MANCHIOCCO et al., 2009 und LANGE et al., 2012 empfohlen und steht im Einklang mit den 3R-Prinzipien. Eine weitere Möglichkeit, den Verhältnissen *in vivo* näher zu kommen, wäre, die Ausreifung der primären Astrozytenkulturen durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren zu induzieren (GOURSAUD et al., 2009; LANGE et al., 2012; STIPURSKY et al., 2012b). Dabei sollte allerdings eine mögliche Beeinflussung der BDV-Replikation bedacht werden (CARBONE et al., 1993; IBRAHIM et al., 2002; HANS et al., 2004).

5.4 AUSBREITUNG UND EXPRESSION VON BDV PROTEINEN UND RNA IN PRIMÄREN CORTICALEN ASTROZYTEN

In der vorliegenden Arbeit sollten die Expressionsstrategien des in der Virushülle gelegenen Strukturproteins BDV-GP und des mit BDV-GP und dem viralen RNP assoziierten Strukturproteins BDV-M sowie deren korrespondierenden mRNAs in primären Astrozytenkulturen untersucht werden. Damit sollten Aussagen zur viralen Ausbreitungsstrategie, dem zellulären Tropismus des BDV und der Regulation der viralen Transkription und Translation in Astrozyten getroffen werden. Außerdem sollte überprüft werden, inwieweit die Regulation der viralen Transkription und Translation in primären Astrozytenkulturen mit den Regulationsstrategien in Rattengehirnen übereinstimmen (POROMBKA, 2006; WERNER-KEISŠ et al., 2008). BDV-N wurde, als das am meiste exprimierte BDV-Protein, als Referenz der viralen Translationsleistung und beim Nachweis

der für die Proteine kodierenden mRNAs als Referenz für die virale Transkriptionsleistung herangezogen.

5.4.1 Expression von BDV-N, BDV-M und BDV-GP

Als Methoden zum Nachweis der viralen Proteine BDV-N, BDV-M und BDV-GP am Tag 14., 28. und 42. p.i. wurden sowohl die *Indirekte Immunfluoreszenz* (IF) als auch der *Western Blot* (WB) verwendet. Die Expression der Strukturproteine des BDV wurde bereits in früheren *in vivo*- und *in vitro*-Studien analysiert (GOSZTONYI et al., 1993; PYPER et al., 1998; RICHT et al., 1998; HERDEN et al., 2000; KRAUS et al., 2001; KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005; KRAUS et al., 2005; POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; LABITZKE, 2010, 2011).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass **BDV-N** nicht nur in Neuronen sondern auch in Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen exprimiert wird (CARBONE et al., 1991b; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN et al., 2000; HERDEN et al., 2005; WERNER-KEIŠŠ, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). BDV-N erwies sich auch in primären Astrozytenkulturen als das am stärksten exprimierte Protein, was sich mit den Ergebnissen früherer Studien deckt (BRIESE et al., 1992; CUBITT et al., 1994a; KOBAYASHI et al., 1998; KOBAYASHI et al., 2001; PEREZ et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2004b; HERDEN, 2009) und seine bedeutende Funktion für die virale Transkription und Replikation unterstreicht. Am Tag 14 p.i. waren in etwa vergleichbar viele Zellen BDV-N und BDV-M positiv (weniger als 30%). Die BDV-N Expression stieg im Untersuchungsverlauf deutlich, wenn auch nicht signifikant, an und erreichte am Tag 42 eine mäßig bis starke Reaktion (>50 bis <80% positive Zellen). Dies deckt sich mit den Ergebnissen früherer *in vivo* Studien, in denen das Maximum der BDV-N Expression zwischen Tag 31 und 42 im Rattengehirn erreicht war (WERNER-KEIŠŠ, 2006). *In vivo* bleibt die hohe Expression bis zum 90. dpi weitgehend erhalten (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Insgesamt weisen die Ergebnisse, wie erwartet, auf eine effektive BDV-N Translation in Astrozyten hin (HERDEN, 2009). BDV-N war dabei sowohl im Kern als auch im Zytoplasma und den Fortsätzen lokalisiert. Der Nachweis im Zytoplasma und den Fortsätzen nahm dabei über die Zeit zu, während der nukleäre Nachweis annähernd konstant blieb. Diese disseminierte zelluläre Lokalisation entsprach früheren *in vivo*-Untersuchungen (WERNER-KEIŠŠ, 2006) und lässt sich durch die NLS und NES des BDV-N erklären, die für den nukleozytoplasmatischen Transport verantwortlich sind (KOBAYASHI et al., 1998; DE LA TORRE, 2006; HERDEN, 2009). In Zelllinien wie MDCK-, Vero- und Cos-7-Zellen, liegt BDV-N dagegen nur intranukleär vor (PYPER UND GARTNER, 1997, BAYER, 2010, LABITZKE 2010). Die primären Astrozytenkulturen scheinen die *in vivo*-BDV-Proteinexpression besser widerzuspiegeln. Die für BDV-N und BDV-M typischen punktförmigen Reaktionsprodukte im Kern stellen vermutlich die intrazelluläre Lokalisation dar, in denen sich die RNPs hauptsächlich befinden, denn nur dort treffen alle Komponenten für eine RNP-Formation aufeinander (CHASE et al., 2007). Die möglichen Einflüsse des BDV-N auf die Viruspersistenz werden detailliert unter 5.5 beschrieben.

BDV-M war am Tag 14 p.i. in primären Astrozyten schwach exprimiert (< 30% der Zellen positiv), die Anzahl positiver Zellen stieg bis zum Tag 28 deutlich, wenn auch nicht signifikant, auf ein mittleres Niveau an (30-80% positive Zellen). Vom Tag 28 zum Tag 42 p.i. war nur noch ein geringgradiger Anstieg der BDV-M-Expression zu verzeichnen. BDV-M wird somit in primäre Astrozyten effektiv translatiert. Dies deckt sich mit Beobachtungen *in vivo*, wo BDV-M in Astrozyten besonders zu späteren Zeitpunkten p.i. bevorzugt exprimiert wird (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Eine Ursache für diese Verschiebung der BDV-M-Expression von Neuronen zu Astrozyten in der chronischen Infektionsphase ist nicht genau bekannt. Möglicherweise spielen zelluläre Faktoren eine Rolle, die zu einer effektiven Transkription, Kernexport der BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA), Translation oder Akkumulation von BDV-M in Astrozyten führen (WERNER-KEIŠŠ, 2006). BDV-M ist *in vivo* und *in vitro* vor allem im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert (KRAUS et al., 2005; WERNER-KEIŠŠ, 2006; CHASE et al., 2007). Dies konnte auch in Kultur mit Astrozyten bestätigt werden. Die bevorzugt intrazytoplasmatische Lokalisation des BDV-M erklärt sich durch seine Funktion als Bindeglied zwischen RNP und viralen Hüllproteinen, wodurch es an der Reifung und Freisetzung von BDV-Partikeln beteiligt ist (MARTIN UND HELENIUS, 1991; KLICHE et al., 1994; STOYLOFF et al., 1997; GAROFF et al., 1998; KRAUS et al., 2001; KRAUS et al., 2005; WERNER-KEIŠŠ, 2006; HERDEN, 2009). MITTLER et al. (2013) konnten zeigen, dass das Matrixprotein des Marburg-Virus sich in filamentösen Ausstülpungen der Plasmamembran (Filopodien) ansammelt und den Glykoproteintransport und -Einbau an diesen Stellen fördert. Durch einen Trigger des Matrixproteins wird das Nukleokapsid direkt zu den Filopodien geleitet, wo das Budding der neu gebildeten Virionen stattfindet. Eine ähnliche Funktion könnte auch das BDV-M haben. Im Nukleus der infizierten primären Astrozyten war BDV-M nur schwach exprimiert und nicht immer nachweisbar. Diese Beobachtung stimmt mit früheren *in vivo*- und *in vitro*-Studien überein (WERNER-KEIŠŠ, 2006; CHASE et al., 2007). Durch *in vitro*-Studien konnte eine Kolo-kalisation von BDV-M mit BDV-P und BDV-X, vermutlich im Nukleolus belegt werden (CHASE et al., 2007). Dies stellt ein weiterer Hinweis auf die Interaktion mit dem RNP dar (CHASE et al., 2007). Die möglichen Einflüsse des BDV-M auf die Viruspersistenz werden detailliert unter 5.5 beschrieben.

In die Auswertung der indirekten Immunfluoreszenz für **BDV-N** und **BDV-M** ging lediglich die Anzahl positiver Zellen ein. Die Stärke der Immunfluoreszenz-Reaktion ist dagegen experimentellen Schwankungen unterworfen und wurde deshalb nicht gewertet. Insgesamt ist aber eine deutliche Tendenz stärkerer BDV-N und BDV-M Fluoreszenzreaktionen im Zytoplasma der infizierten Zellen zu späten Zeitpunkten p.i. zu erkennen, wo sich deutlich eine diffuse Anfärbung zeigte. Zu frühen Zeitpunkten scheint wesentlich weniger Protein im Zytoplasma zu liegen, wodurch sich eine eher punktförmige Fluoreszenz ergibt. Eine hohe Proteinexpression in der persistierenden Phase der Infektion wurde auch schon in früheren Studien gezeigt (SCHNEIDER et al., 2005). Diese Beobachtung deckt sich mit der Erkenntnis, dass BDV-M im Gegensatz zum Matrixprotein der Tollwutviren die virale Transkription nicht hemmt (CHASE et al., 2007).

BDV-GP wird nur in ca. 1-10% der persistierend infizierten Zellen exprimiert (Richt et al., 1998; DE LA TORRE, 2002a, 2002b) und konnte in Astrozyten *in vivo* bisher nicht nachgewiesen werden (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; Herden, 2009). *In vivo* treten die meisten BDV-GP-positiven Neuronen zu frühen Zeitpunkten in der akuten Phase der Infektion auf (Expressionsmaximum zwischen 18. und 24 dpi), was sich mit der initialen Phase der Virusausbreitung deckt (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; Herden, 2009). Die Abnahme der BDV-GP-positiven Zellen korrespondiert mit dem Anstieg der entzündlichen Infiltrate (Maximum zwischen 31. und 42 dpi) (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). In der chronischen Phase am 91. dpi ist die BDV-GP-Expression nur noch in Neuronen zu finden (Richt et al., 1998). Eine Restriktion der BDV-GP-Expression scheint offenbar nötig zu sein um die antivirale Immunantwort zu umgehen und eine persistierende Infektion zu etablieren (Herden, 2009). *In vivo* zeigt sich außerdem ein deutlicher regionaler Tropismus des BDV-GP mit Bevorzugung des Hippocampus, Cortex cerebri, Amygdala und Thalamus (Richt et al., 1998; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). Als Ursache für dieses Phänomen werden regionenspezifisch unterschiedlich vorkommende Regulationsfaktoren für die Reifung und den nukleären Export der für BDV-GP kodierenden mRNA sowie für die posttranslationelle Modifikation des BDV-GP diskutiert (Grabowski, 2007; Herden, 2009). Möglicherweise existieren solche Faktoren auch auf zellulärer Ebene.

In der vorliegenden Arbeit konnte weder durch IF noch im Western Blot BDV-GP-C bzw. ungespaltenes BDV-GP in primären Astrozyten am Tag 14, 28 und 42 p.i. nachgewiesen werden. Im Western Blot zeigten die als Positivkontrollen verwendeten MDCK-Zellen eine deutliche Bande bei 43 kDa und eine undeutlichere Bande bei 94 kDa, was darauf hinweist, dass nur wenig ungespaltenes GP vorhanden ist. Interessanterweise ließ sich in einem Vorversuch bei zu 94% BDV-infizierten primären Astrozyten ebenfalls eine schwache Bande bei 43 kDa detektieren (LABITZKE, 2011). Dies zeigt, dass Astrozyten in der Lage sind BDV-GP zumindest in geringen Mengen und zu späten Infektionszeitpunkten zu bilden.

Positive BDV-GP-Nachweise in Zelllinien gelangen auch nur durch Vorinkubation der Antikörper auf nicht infizierten Zellen in der IF bzw. Lektinanreicherung der Glykoproteine vor dem Nachweis im Western Blot. Die positiven Fluoreszenzsignale und Banden waren jedoch nur sehr schwach ausgeprägt (BAYER, 2010; LABITZKE, 2011). Für den Nachweis von BDV-GP-C standen in Voruntersuchungen zwar zahlreiche polyklonale Antikörper zur Verfügung, jedoch erwiesen sich nur wenige als geeignet (BAYER, 2010).

Denkbar wäre auch, dass das Expressionslevel des BDV-GP in primären Astrozyten bis zum Tag 42 p.i. unter der Nachweisgrenze der indirekten Immunfluoreszenz und des Western Blots liegt (HERDEN, 2009). Der Proteinnachweis im Western Blot gelingt mit der Chemilumineszenzmethode üblicherweise bis zu Proteinmengen 10 pg und ist oft sensitiver als die IF (MOORE, 2009). Zusätzlich wurde nach der Proteinisolation aus den Zellkulturen eine Lektinanreicherung der Glykoproteine durchgeführt. Die Möglichkeit durch die korrekte Bandengröße spezifische von unspezifischen Reaktionen zu unterscheiden, macht diese Methode im Fall des BDV-GP-Nachweises darüber hinaus überlegen gegenüber dem Nachweis mittels IF. Bei der Proteinisolation für den Western Blot ergab sich jedoch ein

Problem, welches zu einer sehr geringen Totalproteinausbeute von nur 2,13 bis 14,91 µg/µl geführt hat. Wie im AllPrep RNA/Protein Kit® (Qiagen GmbH, Hilden) angegeben, können RNA stabilisierende Komponenten des Lysispuffers Präzipitate mit SDS formen, deshalb wurden nach Aufreinigung der Proteine eine zusätzliche Acetonaufreinigung der eluierten Totalproteine vorgenommen. Leider ließ sich das so gereinigte Proteinpellet kaum noch im Puffer der nachfolgenden Anwendung lösen, so dass vermutlich erhebliche Proteinverluste zu verzeichnen waren. Die im Vorversuch verwendeten, BDV-GP-positiven, zu 94% BDV-infizierten Astrozyten wurden dagegen nicht mit Aceton aufgereinigt, sondern direkt in SDS-Probenpuffer gelöst und in den Western Blot eingesetzt. Vermutlich war die Proteinausbeute bei diesen Zellen nicht nur wegen der stärkeren BDV-Infektionsrate sondern auch wegen der problemloseren Proteinextraktion deutlich höher, so dass auch bei geringer BDV-GP-Expression ein Nachweis im Western Blot möglich war. Eine geringe BDV-GP-Expression wurde bereits in einer zu 98% BDV-infizierten Ratten Astrozytomzelllinie beschrieben (GONZALEZ-DUNIA, 1997).

Weiterhin ist auch eine Maskierung der antigenen Epitope mit N-Glykanen ein denkbarees Hindernis für einen Nachweis des BDV-GP mittels Antikörper, wie es bereits für GP-N gezeigt wurde (KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005). Ein zelltypeigenes, oder auch im Infektionsverlauf divergierendes Glykosylierungsmuster des BDV-GP wäre vorstellbar, so dass in nicht neuronalen Zellen die N-Glykane lineare antigene Epitope maskieren könnten. Auch bei Filoviren (Marburgvirus, Ebolavirus) existiert ein zelltypspezifisches Glykosylierungsmuster, das zu unterschiedlichen Modifikationen der Glykoproteine führt (MODROW, 2010). Weitere Untersuchungen mit Deglykosylierung der Proteinproben vor der Untersuchung im Western Blot könnten Aufschluss geben, ob auch in primären Astrozyten das Glykoprotein zellspezifisch glykosyliert und dadurch für eine direkte Detektion maskiert wird.

Die möglichen Einflüsse des BDV-GP auf die Viruspersistenz werden detailliert unter 5.5 beschrieben. Vermutlich tragen sowohl eine Maskierung antigener Isotope des BDV-GP als auch eine restriktive Expression des Proteins zur nichtzytolytischen Infektion des Virus bei, was die virale Persistenz begünstigt.

5.4.2 Expression von BDV-N mRNA, BDV-M mRNA, BDV-GP mRNA und BDV-N vRNA

Als Methoden zum Nachweis der viralen RNAs wurden sowohl die *Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung* (FISH) als auch die *real-time* PCR (qPCR) verwendet. Dies diente dem Nachweis der Expression der positiv orientierten mRNAs zur Translation von BDV-N, BDV-M und BDV-GP sowie der negativ orientierten genomischen BDV-N vRNA (nur FISH) am Tag 21., 28. und Tag 42 p.i..

In primären Astrozytenkulturen fand sich die **BDV-N mRNA** sowohl am Tag 28 als auch Tag 42 p.i. als diffuses bis granuläres Reaktionsprodukte im Zytoplasma. Bei etwas weniger Zellen lagen punktförmige bis granuläre Kernsignale vor. Die Ergebnisse decken sich mit denen früherer Studien, wobei die punktförmigen Kernsignale morphologisch dem Nukleolus

entsprechen könnten (PYPER et al., 1998). WERNER-KEIŠŠ et al. (2008) fanden die BDV-N mRNA im infizierten Rattengehirn dagegen überwiegend im Nukleus der Astrozyten (und Oligodendrozyten). Insgesamt ging in der vorliegenden *in vitro*-Studie die Anzahl positiver Astrozyten vom Tag 28 zum Tag 42 zurück, allerdings ohne statistische Signifikanz. *In vivo* erreichte der Nachweis von BDV-N mRNA am Tag 24 sein Maximum und ging dagegen erst zu sehr späten Untersuchungszeitpunkten (90. dpi) leicht zurück (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Es wird vermutet, dass *in vivo* unter anderem Astrozyten zu späteren Infektionszeitpunkten an der viralen Proteinsynthese beteiligt sind, wobei die BDV-N mRNA zur früheren Infektionszeitpunkten möglicherweise im Kern zurückgehalten wird (CARBONE et al., 1991a; RICHT et al., 1991; HERDEN, 2009), was in primären Astrozytenkulturen allerdings nicht der Fall war. Ob es auch *in vitro* zu sehr späten Untersuchungszeitpunkten zu einer erneuten Aufregulation der Transkripte kommt kann nicht beurteilt werden, da die Zeitpunkte nicht untersucht wurden.

Insgesamt waren BDV-N-spezifische Transkripte zu allen Untersuchungszeitpunkten in deutlich höherer Kopienzahl nachweisbar als BDV-M mRNA (BDV-Intron I haltige +ssRNA) und BDV-GP mRNA (BDV-Intron II haltige +ssRNA). Diese Ergebnisse decken sich mit denen früherer quantitativer Studien in Astrozyten *in vivo* (POROMBKA, 2006; POROMBKA et al., 2008). Da auch das BDV einem 3`-5`-Transkriptionsgradienten folgt und der ORF des BDV-N-Gens deutlich näher am 3`-Ende des Genoms liegt als der des BDV-M und des BDV-GP, wird entsprechend mehr BDV-N mRNA transkribiert und letztendlich auch mehr Nukleoprotein translatiert (RICHT et al., 1993; GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN et al., 2000; TOMONAGA et al., 2000). Quantitativ zeigte sich in der qPCR in primären Astrozytenkulturen ein deutlicher Abfall der BDV-N-Kopienzahl von Tag 21, 28 und 42 p.i.. Am Tag 42 p.i. waren nur noch 1/3 der Kopien des Tages 21 vorhanden. Dies kann mit dem Rückgang BDV-N mRNA positiver Zellen erklärt werden, wobei mittels FISH nicht beurteilt werden kann, ob die BDV-N mRNA-Menge pro Zelle am 42. dpi ebenfalls geringer war. *In vivo* fiel die BDV-N-Kopienzahl in Astrozyten des Ammonshorns vom Tag 24 zum Tag 42 p.i. zwar leicht ab, jedoch ohne statistische Signifikanz (POROMBKA, 2006).

Es ist bereits bekannt, dass **BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA)** *in vivo* am 24. und 42. dpi in Astrozyten lediglich in Einzelzellen v.a. im Cortex cerebri, Ammonshorn und einigen anderen Gehirnregionen zu finden ist (POROMBKA, 2006). Diese Ergebnisse könnten *in vitro* bestätigt werden, es waren am Tag 28 und Tag 42 p.i. jeweils nur einzelne Astrozyten positiv (deutlich weniger als 30% der Zellen). In der absoluten Quantifizierung der Kopienzahlen fiel ein deutlicher Transkriptabfall vom Tag 21 zum 28 und ein geringgradiger weiterer Abfall zum Tag 42 auf. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die BDV-Intron I +ssRNA Kopienzahlen in den Einzelzellen über den Untersuchungszeitraum absinken. *In vivo* zeigte sich dagegen in Astrozyten des Ammonshorns zunächst ein Transkriptanstieg vom Tag 14 zum Tag 24 p.i., gefolgt von einem Abfall zum Tag 42 p.i. (POROMBKA, 2006).

In vivo konnte die BDV-M mRNA mittels ISH bisher nicht mit Sicherheit im astrozytären Zytoplasma detektieren werden (POROMBKA, 2006). Ob dies durch Kolokalisation mit dem Astrozytenmarker GFAP erschwert wurde, die RNA im Zytoplasma abgebaut oder tatsächlich

nicht ins astrozytäre Zytoplasma exportiert wurde, war bisher nicht bekannt (HERDEN, 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals eindeutig BDV-M mRNA im Zytoplasma von Astrozyten nachgewiesen werden. Die Reaktionsprodukte fanden sich zu allen Untersuchungszeitpunkten variabel, mal im Nukleus, mal im Zytoplasma der Zellen. Sehr selten gab es Zellen, in denen Reaktionsprodukte gleichzeitig in beiden Zellkompartimenten vorlagen. Insgesamt war die Färbung nur sehr schwach zu erkennen. In anderen Studien sind gleichartige Signale beschrieben worden, weshalb es nicht gelang neben der nukleären auch eine eindeutige zytoplasmatische Reaktion nachzuweisen (POROMBKA, 2006; LABITZKE, 2011). Die Sonde ist mit 88 Nukleotiden aufgrund der Kleinheit des Intron I sehr kurz und könnte eine Erklärung für die schwache Färbung sein (LABITZKE, 2011). Die Fähigkeit des BDV virale RNA im Kern zurückzuhalten oder ungespleißte mRNA aus dem Zellkern zu exportieren scheint regionenspezifisch und zellabhängig gesteuert zu sein und wird möglicherweise im Infektionsverlauf unterschiedlich reguliert (JEHLE et al., 2000; POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). Bisher konnte nicht klar nachgewiesen werden, ob Astrozyten die Fähigkeit besitzen, BDV-M mRNA aus dem Zellkern zu exportieren (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ, 2006). Dies konnte hier erstmals gezeigt werden, da die RNA *in vitro* im astrozytären Zytoplasma nachweisbar war.

Die Interpretation der Ergebnisse des **BDV-GP mRNA-Nachweises (BDV-Intron II +ssRNA)** ist nicht einfach, da Spleißen des Intron I bei Erhalt des Intron II essentiell für die Translation des BDV-GP ist (SCHNEIDER et al., 1997b). Alle Transkripte, die Intron I enthalten, kodieren für BDV-M, auch wenn sie zusätzlich Intron II enthalten (SCHNEEMANN et al., 1994; SCHNEIDER et al., 1997b; WERNER-KEIŠŠ, 2006). Beim Nachweis der Intron II haltigen +ssRNA kann auch unreife, Intron I haltige oder aber zur BDV-GP-Translation bereite, Intron I gespleißte RNA bestimmt werden (POROMBKA, 2006; WERNER-KEIŠŠ, 2006). Zum besseren Verständnis wurde in der vorliegenden Arbeit überwiegend vereinfacht von „BDV-GP mRNA“ gesprochen.

Morphologisch fand sich die Intron II +ssRNA in etwas mehr Zellen als die Intron I-haltige +ssRNA. Für BDV-Intron I +ssRNA (BDV-M mRNA) waren sowohl am Tag 28 als auch am Tag 42 p.i. deutlich weniger als 30% der Zellen positiv. Für BDV-Intron II +ssRNA (BDV-GP mRNA) waren am Tag 28 p.i. weniger als 30% der Zellen positiv, am Tag 42 p.i. zeigten zwischen 30 und 80% der Zellen eine positive Reaktion. Überwiegend fanden sich die Reaktionsprodukte in primären Astrozyten im Nukleus und nur vereinzelt im Zytoplasma. Diese Beobachtung deckt sich mit denen *in vivo*, wo Intron II +ssRNA vorrangig in Neuronen und Ependymzellen aber auch in Astrozyten und Oligodendrozyten und zwar vor allem in den Zellkernen nachweisbar war (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass BDV-Intron II +ssRNA entweder im Kern zurückgehalten und/oder ihre Reifung limitiert wird (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Die genauen Mechanismen des Kernexports oder der Retention sind nur unvollständig verstanden (JEHLE et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; DE LA TORRE, 2002a; CROS UND PALESE, 2003; SANDRI-GOLDIN, 2004; DE LA TORRE, 2006). Spleißen erhöht den nukleären Export von mRNAs, die Exportfaktoren können aber auch im ungespleißten Zustand mit der RNA interagieren (RODRIGUES et al., 2001; SANDRI-

GOLDIN, 2004). Der überwiegende Nachweis der BDV-Intron II mRNA in den Zellkernen spricht für einen kontrollierten nukleären Export dieser mRNA als einen Mechanismus zur limitierten BDV-GP Translation. Dies wiederum ist für eine persistierende Infektion förderlich (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008).

Die zur absoluten Quantifizierung der BDV-GP-spezifischen Transkriptmengen verwendeten Primer und TaqMan® Sonden liegen komplett im viralen Intron II, deshalb wäre durch Spleißen von Intron II aus den primären Transkripten kein Signal in der qPCR zu erwarten (POROMBKA, 2006). Eine Aussage über den Spleißzustand von Intron I kann aber auch hier nicht getroffen werden. Die quantifizierten Mengen an BDV-GP-spezifischen Transkripten veränderte sich in primären Astrozyten über den Untersuchungszeitraum von Tag 21, 28 und 42 kaum, es war nur ein geringgradiger Abfall festzustellen. Insgesamt wurden nur etwa halb so viele BDV-GP mRNA-Kopien nachgewiesen wie BDV-M mRNA. Dies steht im Gegensatz zu den *in vivo* Daten, wo annähernd gleich viele Kopien vorlagen (POROMBKA, 2006).

Die hier vorhandene Intron I zu Intron II Transkriptrelation von ca. 2:1 kann unterschiedliche Gründe haben. Zum einen könnte viel mehr Intron I-haltige aber Intron II-gespleißte RNA vorliegen. Ein kleiner Anteil BDV-GP soll auch von Intron-I haltiger subgenomischer RNA durch Überlesen des AUG-Codons für die BDV-M-Synthese (*leaky ribosomal scanning*) hergestellt werden (SCHNEIDER et al., 1997b; JEHLE et al., 2000). Dies könnte den Nachweis von BDV-GP-C bei zu 94% BDV-infizierten Astrozyten im Western Blot erklären.

BDV transkribiert und repliziert im Nukleus der infizierten Zellen (CARBONE et al., 1991a; BRIESE et al., 1992; CUBITT UND DE LA TORRE, 1994; CUBITT et al., 1994a; CUBITT et al., 1994b; KOBAYASHI et al., 2001; DE LA TORRE, 2002b; TOMONAGA et al., 2002). Aus diesem Grund überrascht es nicht, die **genomische BDV-N vRNA** am Tag 28 p.i. fast ausschließlich als granuläre und selten diffuse Reaktionsprodukte im Zellkern zu finden. Diese Beobachtungen decken sich mit denen andere Studien (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Am Tag 28 p.i. war BDV-N – ssRNA außerdem im Zytoplasma einzelner Zellen nachweisbar (<30% positiv). Die Expression der genomischen BDV-N RNA nahm vom Tag 28 zum Tag 42 p.i. zu, wo deutlich über 30%, jedoch noch unter 80% der Zellen positiv waren. Dieser Anstieg deckt sich mit den Verhältnissen *in vivo* (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Möglicherweise findet hier, analog zum intraaxonalen Transport in Neuronen (WERNER-KEIŠŠ, 2006), ein Transport genomischer RNA zu astrozytären Fortsätzen statt, wo Reifung und Freisetzung des BDV stattfinden könnte. Interessanterweise lagen in primären Astrozyten am Tag 42 p.i. annähernd gleich viele intrazytoplasmatische wie intranukleäre Reaktionsprodukte vor. Möglicherweise findet zu späten Infektionszeitpunkten eine gesteigerte glia-gliale BDV-Ausbreitung statt.

5.4.3 Korrelation der viralen Transkription und Proteinexpression

Beim Vergleich der **BDV-N-Expression** mit der Expression der für das Protein kodierenden **BDV-N mRNA** ergeben sich Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Die Anzahl BDV-N-positiver Zellen steigt im Verlauf der Untersuchung deutlich an, was den Ergebnissen *in vivo* entspricht (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Auch die disseminierte intrazelluläre Proteinexpression entspricht wie erwartet den Ergebnissen in infizierten Rattengehirnen (WERNER-KEIŠŠ,

2006). Interessanterweise verlief die Expression der BDV-N +ssRNA genau gegenläufig. Sowohl die Anzahl positiver Zellen als auch die BDV-N +ssRNA Kopienzahl ging im Verlauf der Untersuchung zurück. Möglicherweise blieb somit aber die absolute Kopienzahl pro Zelle konstant. Dies entspräche den Verhältnissen in Astrozyten des Ammonshorns BDV-infizierter Lewis-Ratten (POROMBKA, 2006).

Auch in anderen *in vivo*-Studien ging die BDV-N-Transkriptmenge in den Gehirnschnitten und Neuronen zum Tag 90 p.i. deutlich zurück, obwohl BDV-N konstant auf hohem Niveau nachweisbar war (GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN et al., 2000; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). Die starke zytoplasmatische Lokalisation der BDV-N +ssRNA weist auf eine hohe Menge an verfügbaren BDV-N-spezifischen Transkripten hin (HERDEN, 2009). Offenbar scheint trotz abnehmender Transkriptmenge am Tag 42 die Proteinmenge zuzunehmen. Dies könnte auf eine effektive BDV-N-Translation in primären corticalen Astrozytenkulturen zu späten Zeitpunkten p.i. hinweisen. Analysen zur Halbwertszeit des BDV-N könnten ebenfalls hilfreich sein, um den Transkriptabfall bei steigender Proteinexpression zu klären (HERDEN, 2009).

Die **BDV-M-Expression** blieb in primären Astrozytenkulturen vom Tag 28 zum Tag 42 auf annähernd gleichem, mittleren Niveau erhalten. Auch die Anzahl **BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA)** positiver Zellen veränderte sich an diesen Untersuchungszeitpunkten nicht, wobei die RNA teils im Nukleus, teils im Zytoplasma lag. Nur selten war BDV-M mRNA in beiden Zellkompartimenten nachweisbar. BDV-M spezifische Transkripte ließen sich allerdings nur in wenigen Einzelzellen nachweisen, während das entsprechende Protein in deutlich mehr Zellen vorhanden war. Offenbar scheint eine effektive BDV-M-Translation aus geringen mRNA-Mengen stattzufinden und/oder die mRNA sehr schnell abgebaut zu werden. Auch eine Weitergabe von BDV-M mRNA an eine benachbarte Zelle wäre denkbar. Die Anzahl der BDV-M-spezifischen Kopien blieb an Tag 28 und 42 annähernd konstant bzw. ging nur geringgradig zurück, und lag deutlich unter der der BDV-N +ssRNA. Dies entsprach, wie erwartet, dem 3`-5`-Transkriptionsgradient des BDV (GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN et al., 2000; TOMONAGA et al., 2002).

BDV-GP konnte bisher weder *in vivo* (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008), noch *in vitro* in Astrozyten nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit dem vorrangigen Nachweis von **BDV-Intron II +ssRNA** im Kern. Dabei kann es sich um zurückgehaltene oder um unreife, ungespleißte mRNA handeln. Spleißen kann in unterschiedlichen Gehirnzellen und während der Gehirnentwicklung unterschiedlich reguliert sein, so ist unter anderem ein abweichendes Spleißverhalten mit herabgesetzter Expression für EAAT2/GLT-1 in Astrozyten bekannt (GRABOWSKI, 1998). Astrozyten besitzen als Speißregulator unter anderem das gliaspezifische RNA-bindende Protein m-Msi-1, während Neuronen PTB (*polypyrimidin tract-binding protein*) und Nova-1 als Regulatoren für alternatives Spleißen exprimieren (GRABOWSKI, 1998; GRABOWSKI, 2007). Auch für virale mRNA, wie die für BDV-GP kodierende, wäre ein zellspezifisch differierendes Spleißmuster möglich und eventuell eine Erklärung, warum BDV-GP in Neuronen, nicht aber in Astrozyten nachgewiesen werden kann. Auch eine regulierte Translation des BDV-GP in Astrozyten wäre denkbar und eine

Erklärung für den fehlenden Proteinnachweis (HERDEN, 2009). Auch in Neuronen ist die BDV-GP-mRNA-Produktion signifikant höher als die Proteinexpression, was zumindest in diesem Zelltyp für eine regulierte Translation spricht (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008). JEHLE et al. (2000) zeigten in BDV-infizierten COS7-Zellen, dass nur ca. 20% der Transkripte der III Transkriptionseinheit als BDV-GP-kodierende Form, d.h. Intron I gespleißt, vorlagen. Die Transkripte befanden sich, wie auch *in vivo*, v.a. intranukleär (JEHLE et al., 2000; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008).

5.4.4 Ausbreitungsstrategien des BDV

Die glia-glialen Ausbreitungsstrategien des BDV sind bisher nicht bekannt (HERDEN et al., 1999; RICHT et al., 1998; WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; ALGERMISSEN, 2010) und sollten deshalb in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Um die Frage zu klären, ob BDV von Astrozyten in den Zellkulturüberstand abgegeben werden, um dann andere Zellen zu infizieren, wurde der Zellkulturüberstand auf das Vorhandensein infektiöser BDV-Partikel untersucht. Die Rolle des BDV-GP für die glia-gliale Virusausbreitung wurde mittels eines Furininhibitor getestet, der die Spaltung des Glykoproteins in seine beiden funktionellen Untereinheiten verhindert (BECKER et al., 2010).

5.4.4.1 Untersuchung der Infektiosität des Zellkulturüberstandes

Es ist bekannt, dass verschiedene Zelllinien unterschiedliche Mengen an infektiösem BDV-Virus freisetzen (PAULI UND LUDWIG, 1985; CARBONE et al., 1993; BAYER, 2010; BECKER et al., 2010; LENNARTZ et al., 2015).

Die Freisetzung von infektiösem Virus aus primären Astrozytenkulturen in den Zellkulturüberstand wurde in der vorliegenden Arbeit am Tag 27 p.i. untersucht, an dem Zellkulturüberstand gewonnen wurde. Weder 21 noch 42 Tage nach Inkubation dieses Zellkulturüberstandes auf nicht infizierte Astrozyten fand sich BDV-N. Daraus kann gefolgert werden, dass BDV-infizierte primäre Astrozyten keine oder wenn dann nur verschwindend geringe Mengen an infektiösen BDV-Partikeln in den Extrazellularraum freisetzen. Die Ergebnisse entsprachen somit früheren *in vitro* Studien, die zeigen konnten, dass BDV sich nicht ohne weiteres durch Abgabe von Viruspartikeln in den Zellkulturüberstand auszubreiten scheint (DANNER et al., 1978; DANNER UND MAYR, 1979; HERZOG UND ROTT, 1980; PAULI UND LUDWIG, 1985; CARBONE et al., 1993; GOSZTONYI et al., 1993; CUBITT UND DE LA TORRE, 1994; TOMONAGA et al., 2002; BAYER, 2010; LABITZKE, 2011; LENNARTZ et al., 2015). Die Ergebnisse decken sich außerdem mit den Befunden BDV-infizierter primärer feline Astrozytenkulturen (BILLAUD et al., 2000).

Eine verminderte BDV-GP-Expression soll nach EICKMANN et al. (2005) an einer limitierten Freisetzung reifer Viruspartikel beteiligt sein. In Übereinstimmung mit dieser Feststellung konnte in der vorliegenden Arbeit BDV-GP in primären Astrozyten weder am Tag 14, 28, noch 42 p.i. nachweisen werden.

5.4.4.2 Rolle des BDV-Glykoproteins bei der glia-glialen Ausbreitung

Die Rolle des BDV-GP bei der glia-glialen Ausbreitung war bisher nicht bekannt. Einige Autoren gehen von der Weitergabe ganzer Viruspartikel aus, bei der das BDV-GP eine essentielle Rolle bei der rezeptormediierten Endozytose spielt (DUCHALA et al., 1989; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2007; HERDEN, 2009). Einige Zellkulturen geben zunächst freie Viruspartikel in das Zellkulturmedium ab (BAYER, 2010, LENNARTZ et al., 2015). Hierfür ergab sich aus dem Zellkulturüberstand der infizierten Astrozyten kein Hinweis.

Eine andere Möglichkeit der BDV-Ausbreitung wäre ein nur sehr kurzes Vorhandensein kompletter Viruspartikel. Eine eher lokalisierte Freisetzung von Viruspartikeln an Kontaktstellen zwischen infizierter Zelle und ihrem uninfizierten Nachbarn kann dabei die Exposition im Extrazellularraum deutlich verkürzen und weniger Angriffsmöglichkeiten für das Immunsystem bieten (FLINT, 2009, ZHONG et al., 2013). Dabei könnten sich an Zellmembranausstülpungen, sogenannten „virologischen Synapsen“, zwischen benachbarten Zellen für kurze Zeit komplette BDV-GP-haltige Viruspartikel bilden, die rezeptorvermittelt zwischen den benachbarten Zellen weitergegeben werden. Auf diesem Weg würde, ähnlich wie bei HIV-1 und anderen Retroviren, eine lokale, BDV-GP-vermittelte Fusionspore entstehen, bei der Budding, Endozytose und Fusion zeitlich und räumlich schnell aufeinander folgen (SMITH UND HELENIUS, 2004; SHERER UND MOTHESE, 2008; FLINT, 2009; BAYER, 2010; WANG et al., 2011; ZHONG et al., 2013). Diese Art der Virusweitergabe ist 2-3 x effektiver als die Infektion über Aufnahme extrazellulärer Virionen und erlaubt eine effiziente Ausbreitung bei niedriger viraler Genexpression und relativ geringer Viruspartikelfreisetzung (ZHONG et al., 2013). Viruspartikel wandern entlang der Außenseite dieser sogenannten Filopodienbrücke (Cytone) zur uninfizierten Zelle (SMITH UND HELENIUS, 2004; SHERER UND MOTHESE, 2008; FLINT, 2009; WANG et al., 2011). Auch für Marburg- und Ebolaviren sowie Pseudorabiesvirus und Herpes simplex-Virus wird eine Beteiligung dieser Zellmembranbrücken oder Tunnel an der viralen Ausbreitung vermutet (SHERER UND MOTHESE, 2008; MITTLER et al., 2013).

Dieser Infektionsweg setzt allerdings die posttranslationelle, furinmedierte Spaltung des BDV-GP in seine beiden funktionellen Untereinheiten BDV-GP-N und BDV-GP-C voraus (RICHT et al., 1998; BAYER, 2010). Da Furin und ähnliche Proteasen essentiell für diese Spaltung sind, entscheidet so die Proteaseausstattung der infizierten Zelle, ob neue infektiöse Viren entstehen können oder nicht (GARTEN et al., 1994; RICHT et al., 1998). Im Gehirn konnte Furin jedoch sowohl in Neuronen als auch in Gliazellen nachgewiesen werden (SCHÄFER et al., 1993; DONG et al., 1995; SEIDAH et al., 1996).

Für BDV-infizierte Neuronen wurde schon gezeigt, dass die Virusausbreitung BDV-GP-abhängig verläuft (BAJRAMOVIC et al., 2003). Die BDV-Ausbreitung in benachbarte Zellen konnte sowohl durch den Einsatz eines Furin-Inhibitors decRVKRCmk als auch durch neutralisierende Antikörper und Antisense-Peptid-Aminosäuren gegen BDV-GP gehemmt werden (BAJRAMOVIC et al., 2003). Peptidmimetische Inhibitoren wie Chloroalkylketone haben allerdings den Nachteil, sehr anfällig für Proteolyse zu sein und weisen deshalb nur

eine sehr begrenzte Stabilität von ca. 4-8 Stunden auf (HALLENBERGER et al., 1992; BECKER et al., 2010). BECKER et al. gelang es 2010 einen Furin-Inhibitor (MI-0701) zur Inhibition der Glykoprotein-Spaltung zu synthetisieren, der eine wesentlich höhere Stabilität aufweist. Der neue peptidmimetische Furininhibitor MI-0701 wurde bereits erfolgreich zur Hemmung der BDV-Ausbreitung in MDCK- und Cos7-Zellen verwendet (BAYER, 2010; LABITZKE, 2011; LENNARTZ et al., 2015). Der Inhibitor ist analog der BDV-GP-Spaltstelle und hemmt dadurch dessen Prozessierung durch Furin oder Furin-ähnliche Proteasen (BAYER, 2010; BECKER et al., 2010).

Die Hemmung der BDV-Ausbreitung durch MI-0701 konnte in der vorliegenden Studie nun erstmals auch für primäre Astrozytenkulturen belegt werden. Ohne Zugabe des Furininhibitors war eine signifikante Zunahme BDV-infizierter Zellen über die Zeit feststellbar. Am Tag 2 nach Kokultivierung waren 3% der Zellen BDV-positiv und am Tag 23 waren bereits 39% der Zellen BDV-positiv ($p=0,0002$). Die positiven Zellen lagen überwiegend in über die Zeit immer größeren Inseln zusammen, was eine BDV-Weitergabe zwischen benachbarten Zellen vermuten lässt. Auch BAYER (2010) und LABITZKE (2011) konnten durch Mischen von BDV-infizierten MDCK-Zellen mit stabil SI-YFP exprimierender MDCK-Zellen sicher zeigen, dass die BDV Zell-zu-Zell Infektion schneller fortschreitet als eine durch Zellteilung verursachte Virusausbreitung oder über infizierten Zellkulturüberstand.

In der mit Inhibitor behandelten Gruppe fand dagegen keine Zunahme der BDV-positiven Zellen statt, auch am Tag 23 nach Mischen der Zellen waren maximal 7% der Zellen BDV-positiv. Es kam somit zu keiner signifikanten Virusausbreitung. Die geringgradige Zunahme der BDV-Infektion in den Kulturen ist vermutlich durch Teilung BDV-infizierter Zellen entstanden (Ergebnisse veröffentlicht in LENNARTZ et al., 2015). Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen von BAYER (2010) und LABITZKE (2011) in Cos7- bzw. MDCK-Zellen. Interessanterweise konnte BAYER (2010) im Western Blot noch bei Zugabe von 25 μ M Inhibitor gespaltenes Glykoprotein nachweisen. Vermutlich reicht jedoch eine Reduktion der GP-Spaltung um ein Drittel aus, um die biologische Aktivität der Glykoproteine zu inhibieren, da diese nur als Trimere biologisch aktiv sind (BAYER, 2010). Die Hemmung der astrozytären BDV Ausbreitung durch den Furin-Inhibitor MI-0701 konnte mittlerweile in Neuro-glialen Mischkulturen bestätigt werden (LENNARTZ et al., 2015). In Übereinstimmung mit BAYER (2010) und LABITZKE (2011) konnte nach Inhibitorzugabe keine Veränderung der Zellmorphologie der Astrozyten festgestellt werden. Auch BECKER et al. (2010) konnten selbst bei höheren Inhibitorkonzentrationen von 25 und 50 μ M MI0701 nur eine geringgradige Zellschädigung durch den Inhibitor feststellen. Eine nennenswerte glia-gliale BDV-Ausbreitung über RNPs kann somit aufgrund der Ergebnisse des Furin-Inhibitionsversuchs weitgehend ausgeschlossen werden.

Möglich wäre jedoch auch eine Beeinflussung des Stoffwechsels der infizierten Zelle, beispielsweise eine verminderte NGF-Produktion, was zu einer indirekten Hemmung der viralen Transkription, Replikation oder Exozytose führen könnte (persönliche Mitteilung CHRISTIANE HERDEN). Die Zellvitalität und uneingeschränkte Produktion von BDV-N spricht jedoch gegen eine starke Beeinträchtigung der Zellen. Eine weitere *in vitro*-Abklärung der

Zellstoffwechselbeeinflussung bzw. Toxizität von MI-0701 wäre jedoch auch im Hinblick auf eine Anwendung des Inhibitors *in vivo*, zunächst im Tierversuch, von großem Interesse.

Insgesamt stellen SPC-Inhibitoren wichtige potentielle Medikamente für den therapeutischen Einsatz einer Vielzahl an Erkrankungen dar und können darüber hinaus weiteren Aufschluss über die physiologische Rolle der Subtilisin-ähnlichen Proprotein-Convertasen geben (BERGERON et al., 2000; BASAK, 2005; BECKER et al., 2010, 2012; LENNARTZ et al., 2015). Beim Einsatz dieser Inhibitoren sollte abgewogen werden, ob ganz spezifisch eine bestimmte SPC inhibiert werden soll, auch mit dem Risiko, dass andere SPCs deren Aufgabe übernehmen könnten, oder ob verschiedene SPCs simultan geblockt werden sollen, was ein größeres Nebenwirkungspotential haben könnte (BERGERON et al., 2000; BECKER et al., 2012). Der Furin-Inhibitor MI-0701 ist aufgrund seiner eher lipophilen Eigenschaften eher zum Einsatz im Trans-Golgi-Netzwerk gedacht, weniger z.B. an der hydrophilen Zellmembran (BERGERON et al., 2000).

Zusammenfassend wurde durch diesen Versuch gezeigt, dass die BDV-Ausbreitung in primären Astrozytenkulturen, ebenso wie in MDCK- und COS7- Zellen durch den peptidmimetischen Inhibitor MI-0701 bei einer Konzentration von 10 μ M verhindert wird und somit analog zu Neuronenkulturen vom gespaltenen BDV-GP abhängt.

Durch Western-Blot Analyse ließ sich nur zu sehr späten Infektionszeitpunkten, bei denen bereits 94% der Zellen BDV-infiziert waren, BDV-GP nachweisen. BDV-GP kodierende Transkripte fanden sich nur vereinzelt im Zytoplasma infizierter Zellen (siehe 5.4.1 und 5.4.2). Aus diesen Gründen scheinen offenbar relativ geringe Mengen an BDV-GP auszureichen, um eine effektive BDV-Ausbreitung zu gewährleisten. Ähnlich wie bei der transneuronalen Ausbreitung oder der Ausbreitung in Zelllinien könnte es bei der glia-glialen BDV-Ausbreitung nur zu einem kurzzeitigen Zusammenbau vollständiger BDV-GP-haltiger Viruspartikel an Zellmembranausstülpungen (Fusionsporen) zwischen benachbarten Zellen kommen, die rezeptorvermittelt weitergegeben werden (DANNER et al., 1978; IBRAHIM et al., 2002; BAJRAMOVIC et al., 2003; BAYER, 2010). Auch eine BDV-Virusweitergabe über Zytoplasmabrücken oder Tunnel zwischen benachbarten Zellen ist denkbar und ist bereits für andere Viren belegt (SHERER UND MOTHES, 2008; MITTLER et al., 2013). In astrozytären Fortsätzen wurde sowohl das mit dem RNP assoziierte BDV-N als auch das als Bindeglied zwischen Virushülle und RNP fungierende BDV-M nachgewiesen. Über diese Fortsätze stehen die Zellen in Kontakt mit benachbarten Astrozyten (siehe Abbildung 30). Auch die genomische BDV-N –ssRNA fand sich im Zytoplasma von Astrozyten (siehe Abbildung 32), aufgrund der Verwendung von Zellpellets konnten hier allerdings keine Zellfortsätze dargestellt werden. Möglicherweise findet, analog zum intraaxonalen Transport in Neuronen (WERNER-KEIŠS, 2006), ein Transport genomischer RNA und BDV spezifischer Proteine zu astrozytären Fortsätzen statt, wo Reifung und Freisetzung des BDV stattfinden könnte.

5.5 PERSISTENZMECHANISMEN DES BDV

Um eine persistierende Infektion zu etablieren umgeht das BDV *in vivo* zum einen die Beseitigung durch das wirtseigene Immunsystem und verfügt zum anderen über einen nicht-zytolytischen Vermehrungszyklus (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997a). Scheinbar bevorzugt BDV bestimmte Gehirnareale wie Ammonshorn, Neocortex und Thalamus, da in diesen Arealen virales Antigen bzw. virale Nukleinsäure früh und über einen langen Infektionszeitraum nachgewiesen werden konnten (GOSZTONYI UND LUDWIG, 1995; HERDEN et al., 2000). Welche zellulären Faktoren die Präferenzen für definierte Gehirnbereiche begünstigen ist bis dato nur unzureichend geklärt (persönliche Mitteilung CHRISTIANE HERDEN) und wurde in der vorliegenden Arbeit für Astrozyten untersucht.

BDV infiziert bevorzugt Neuronen, andere Zellen werden mit geringerer Effizienz und erst zu deutlich späteren Zeitpunkten befallen (STAEHELI et al., 2001). Neuronen fehlt offenbar die Fähigkeit, IFN- α/β als Antwort auf virale Infektionen zu bilden, während Astrozyten und Mikroglia zumindest *in vitro* IFN- α/β produzieren. BDV scheint also die frühe Infektion dieser IFN-produzierenden Zellen zu vermeiden und somit eine neue Strategie zur Umgehung des wirtseigenen Immunsystems gefunden zu haben (STAEHELI et al., 2001). Interessanterweise kann BDV *in vivo* aber auch direkt Einfluss auf die Entstehung von **Entzündungsreaktionen in Astrozyten** nehmen. Dies geschieht über eine Herabregulierung von S100 β (GONZALEZ-DUNIA et al., 2005; OHTAKI et al., 2007; PENG et al., 2007). S100 β scheint über Bindung an den zellulären Oberflächenrezeptor RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) als ein Zytokin zu fungieren, welches vaskuläre Entzündungsreaktion und dadurch die enzephalitogene T-Zell Infiltration fördert (OHTAKI et al., 2007). Eine BDV induzierte Herabregulation der S100 β -Expression und damit der Entzündungsreaktion könnte *in vivo* die virale Persistenz in Astrozyten fördern. In der vorliegenden *in vitro*-Studie wurde dagegen eine gleichbleibend hohe S100 β -Expression festgestellt. *In vitro* fehlen die vaskulären Strukturen und immunologischen Effektorzellen. Dass dies über eine fehlende Rückkopplung zu einer gleichbleibend hohen S100 β -Expression geführt hat, erscheint möglich. Eine weitere Strategie zur direkten Beeinflussung des wirtseigenen Immunsystems ist die aktive Unterdrückung der Interferon 1-Induktion, die durch BDV-P vermittelt wird (ZHAI et al., 2013). Die Interferonproduktion wurde in dieser Studie nicht untersucht.

Astrozyten scheinen *in vivo* vor allem in der chronischen Infektionsphase eine wichtige **Rolle bei der Virusreplikation** zu spielen (CARBONE et al., 1991a), und zur Etablierung der Viruspersistenz beizutragen (WERNER-KEIŠŠ, 2006). Auch in der vorliegenden Arbeit fanden sich Hinweise, die diese These unterstützen. Zu späteren Infektionszeitpunkten war neben BDV-M auch genomische BDV-N-RNA im Zytoplasma der Zellen nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis auf eine verstärkte Syntheseleistung und Freisetzung ganzer Viruspartikel sein. Eine disseminierte BDV-Ausbreitung findet *in vivo* allerdings schon in der akuten Phase der Infektion statt (HERDEN et al., 2000; WERNER-KEIŠŠ et al., 2002, POROMBKA, 2008) und im Falle einer persistierenden Virusinfektion wäre eigentlich mit einer limitierten Virusreplikation zu rechnen (OLDSTONE, 2001; POROMBKA, 2008). Möglicherweise wird in der chronischen Phase der Infektion die aktive BDV-Replikation nicht nur in bestimmten

Gehirnregionen wie dem Ammonshorn (POROMBKA, 2008) sondern auch bevorzugt in Astrozyten aufrechterhalten und somit eine Persistenz ermöglicht. Infizierte Gliazellen scheinen somit ein Reservoir für eine persistente Virusreplikation in der chronischen Infektionsphase zu sein (CARBONE et al., 1987; HERDEN, 2009).

BDV-N wurde in primären corticalen Astrozyten effektiv translatiert, die Proteinmenge stieg trotz geringem Rückgang der BDV-N mRNA am 42 dpi leicht an. BDV-N ummantelt als Teil des RNP noch während der Replikation das neu synthetisierte Antigenom und Virusgenom und schützt die RNAs dadurch vor RNA-spaltenden zellulären Enzymen. Außerdem verhindert es die Bildung von dsRNA-Hybriden und somit die Aktivierung antiviraler Abwehrmechanismen (LEAMAN, 1998). Exzessive Mengen an BDV-N tragen außerdem zum Schutz vor Superinfektionen bei und können so zur genomischen Stabilität des BDV beitragen (FORMELLA et al., 2000; GEIB et al. 2003; HERDEN, 2009). Insofern ist BDV-N nicht nur für die Regulation der viralen Transkription und Replikation sondern auch für die Aufrechterhaltung der viralen Persistenz essentiell.

In vivo findet zu späten Infektionszeitpunkten ein Switch der **BDV-M**-Expression von Neuronen hin zu Astrozyten statt (WERNER-KEIŠS, 2006). In primären Astrozyten stieg *in vitro* die Expression des BDV-M vom Tag 14 zum Tag 28 an und blieb dann bis zum 42. dpi konstant auf mittlerem Niveau. In dieser Studie konnte BDV-M tendenziell eher zu frühen Infektionszeitpunkten intranukleär nachgewiesen werden. BDV-M könnte, ähnlich wie das Matrixprotein von Influenzaviren, an der Steuerung des nukleären Exports beteiligt sein (MARTIN UND HELENIUS, 1991; HERDEN, 2009). Möglicherweise wird zu späten Zeitpunkten p.i., wenn bereits eine disseminierte Virusausbreitung stattgefunden hat, dadurch ein weiterer Kernexport beschränkt (HERDEN, 2009). Matrixproteine anderer Viren sind außerdem potente Inhibitoren der viralen Polymerase. Wenn genug virale Strukturproteine vorhanden sind, induzieren sie eine Art Stoppsignal für die Transkription und führen zum Wechsel Richtung Genomreplikation, Zusammenbau und nachfolgender Knospung neuer Virionen (FINKE et al., 2003; FINKE und CONZELMANN, 2003; CHASE et al, 2007). Das BDV-M inhibiert in Zelllinien jedoch die virale Transkription und Replikation nicht. Möglicherweise besteht aufgrund des niedrigen Titers an infektiösen BDV-Partikeln keine Notwendigkeit für einen starken Wechsel des viralen Lebenszyklus Richtung Zusammenbau und Knospung (CHASE et al., 2007). Das Matrixprotein des Ebola-Virus (VP40) hat die Tendenz sich selber zu Hexameren und Octameren zusammenzulagern. Die hexamere Form ist mit zellulären Membranen assoziiert, wo es das virale Budding initiiert. Die monomere Form findet man dagegen im Zytoplasma. Oligomerisation ist eine Voraussetzung für virales Budding und für die Unterdrückung der viralen Transkription, nicht aber der viralen Genomreplikation (LILJEROOS und BUTCHER, 2013). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für das BDV-M denkbar. So könnte die Menge an BDV-M zu einer balancierten Freisetzung neuer Viruspartikel beitragen und somit die nichtzytolytische persistierende BDV-Infektion fördern. Inwieweit die Polymerasefunktion in primären Astrozyten durch andere virale Strategien beeinflusst wird, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden. Durch limitiertes Durchlesen des Stoppsignals T3 des viralen Genoms kommt es zur

eingeschränkten Bereitstellung der viralen Polymerase (SCHNEEMANN et al., 1994, ROSARIO et al., 2005; DE LA TORRE, 2006). Außerdem beeinflussen die Expression und das Mengenverhältnis von BDV-N, BDV-P und BDV-X (POENISCH et al., 2004, 2008) und das Kürzen der 5'-Genomenden (SCHNEIDER et al., 2005) die Polymeraseaktivität. Eine aktuelle Studie konnte in primären Neuronenkulturen eine Interaktion des BDV-P mit zelleigenen Histonen nachweisen, was zu einer verminderten BDV-Replikation, geringeren zellalterierenden Effekten und somit zur einer Förderung der Viruspersistenz führte (BONNAULD et al., 2015). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch in Astrozyten denkbar. BDV-M bindet nicht wie die meisten Matrixproteine anderer –ssRNA Viren an BDV-N, sondern an BDV-P und kann auch direkt mit einzelsträngiger RNA interferieren (CHASE et al., 2007; LILJEROOS und BUTCHER, 2013). Auch über diese Interaktionen könnte BDV-M indirekt die Regulation der Polymerasefunktion beeinflussen.

Eine wichtige Schlüsselrolle für die virale Persistenz spielt das **BDV-GP**. Virale Glykoproteine stellen häufig Determinanten für die antivirale Immunantwort dar. Durch die Herabregulierung der BDV-GP-Expression auf der Oberfläche der infizierten Zellen bzw. durch die Maskierung viraler Epitope mittels wirtseigener N-Glykane kann eine effektive Virusabwehr durch neutralisierende Antikörper unterlaufen werden (OLDSTONE, 1991; KIERMAYER et al., 2002; EICKMANN et al., 2005). In bisherigen Studien konnte in Astrozyten kein BDV-GP nachgewiesen werden (WERNER-KEIŠŠ et al., 2008; HERDEN, 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass in primären Astrozytenkulturen fast kein BDV-GP produziert wird, es war erst zu ganz späten Zeitpunkten p.i in nachweisbaren Mengen vorhanden. Die entsprechende BDV-Intron II +ssRNA fand sich dagegen fast ausschließlich in den Astrozytenkernen. Somit scheinen Astrozyten mit ihrer extrem restriktiven BDV-GP-Expression die virale Persistenz effektiv zu unterstützen. Die Herabregulierung der BDV-GP-Expression geschieht dabei auf verschiedenen Wegen. So dient eine geringe Spleißeffizienz der dritten Transkriptionseinheit und eine Retention BDV-GP-kodierender Transkripte zusammen mit einer regulierten Translation der Feinregulation der BDV-GP-Expression (JEHLE et al., 2000; POROMBKA, 2006). Astrozyten besitzen von Neuronen abweichende Spleißregulatoren (GRABOWSKI, 1998, 2007), ein möglicher Grund für die geringere BDV-GP-Expression in Astrozyten. Durch restriktives Spleißen und damit Schonung der zellulären Spleißapparatur kann auch eine Überlastung und Schädigung der infizierten Wirtszelle vermieden werden. Diese Mechanismen können ebenfalls zum Erhalt der viralen Persistenz beitragen (POROMBKA, 2006). Eventuell findet darüber hinaus auch eine Restriktion der BDV-GP-Translation statt. EICKMANN et al. 2005 konnten außerdem zeigen, dass die BDV-GP-Expression und Funktion über eine Herabregulation von BDV-GP auf der Zelloberfläche moduliert wird, da das Protein im endoplasmatischen Retikulum/cis-Golgi Region akkumuliert. Dies geschieht über limitierte proteolytische Prozessierung und durch Maskierung durch zelleigene N-Glykane. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die extrem limitierte BDV-GP-Expression in Astrozyten trotzdem für eine effektive BDV-GP-abhängige Virusausbreitung ausreicht.

Durch verschiedene Mechanismen scheint das BDV **Virus-Wirts-Interaktionen** zu beschränken und dadurch seine Persistenz zu begünstigen (DE LA TORRE, 2002b). *In vivo* sind nur extrem geringe Mengen behüllter Viruspartikel detektierbar (GONZALEZ-DUNIA et al., 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass primäre Astrozyten keine oder nur nicht detektierbare Mengen an infektiösen Viruspartikeln in den Zellkulturüberstand abgeben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass sich das Virus analog zum intraaxonalen Transport, über astrozytäre Fortsätze ausbreitet, über die sie in engem Kontakt mit Nachbarzellen stehen. Dort könnten Zytoplasmabrücken oder lokale Fusionsporen entstehen über die das Virus übertragen wird. Dies würde eine effektive Ausbreitung trotz relativ niedriger viraler Genexpression und geringer Bildung neuer Viruspartikel erlauben (ZHONG et al., 2013). Diese Restriktion kann dazu beitragen virusinduzierte zellalterierende Effekte zu minimieren, um das Überleben des infizierten Wirtes zu sichern (LUDWIG et al., 1988; GILBERT et al., 1996; AHMED UND LYLES, 1997; HERDEN, 2009; ZHONG et al., 2013). Darüber hinaus kann dadurch ein effektiver Schutz vor der antiviralen Immunantwort gewährleistet werden.

Im Gegensatz dazu steht die erhöhte Virusfreisetzung aus epithelialen MDCK-Zellen (BAYER, 2010). Diese **erhöhte BDV-Freisetzung aus Epithelzellen** könnte für das Virus von Vorteil sein, da die BDV-Übertragung und –Ausscheidung vermutlich über Speicheldrüsensekrete oder über Kot und Urin (Darmepithelzellen, Nierenepithelien) von statten geht (JORDAN UND LIPKIN, 2001; BAYER, 2010; Nobach et al., 2015).

Insgesamt benutzt das BDV *in vivo* vielschichtige zeitliche, zellspezifische und regionenspezifische Regulationen seiner viralen Replikation, Transkription und Translation (HERDEN, 2009). Darüber hinaus findet ein restriktiver Kernexport bestimmter RNAs, abweichendes Spleißverhalten für manche RNAs und Zurückhaltung bestimmter Proteine in zellulären Kompartimenten statt, um die virale Persistenz zu fördern. Nicht zuletzt werden antigen wirksame Determinanten an der Oberfläche infizierter Zellen nur sehr restriktiv exprimiert (EICKMANN et al., 2005) und das Virus vermutlich über Zellfortsätze an die Nachbarzellen weitergegeben, so dass kaum freie Viruspartikel entstehen, die einen Angriffspunkt für die körpereigene Immunabwehr bieten würden. BDV ist aufgrund dieser komplexen Persistenzmechanismen, mit denen es einen nicht-zytolytischen Lebenszyklus gewährleistet, ein sehr gut geeignetes Modell zur Erforschung persistenter viraler ZNS-Infektionen (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997b; CLEMENTE UND DE LA TORRE, 2009a; HERDEN, 2009).

5.6 SCHLUSSBETRACHTUNG

Ziel der Arbeit war es zunächst, primäre Astrozytenkulturen des Cortex cerebri von Lewis-Ratten *in vitro* auf ihre Reifung und Differenzierung zu testen. Es wurden sowohl BDV-infizierte als auch nicht infizierte Kulturen untersucht. Aufgrund ihrer Glutamattransporter-Expression konnten die Zellen klar als protoplasmatische Typ 1-Astrozyten angesprochen werden. Allerdings stellte sich in der Untersuchung heraus, dass die kultivierten Astrozyten nicht wie *in vivo* zu adulten Zellen ausreifen, sondern auch nach 42 Tagen *in vitro* entweder

im Stadium immaturer, perinatalen Astrozyten verbleiben oder aber einen reaktiven Phänotyp aufweisen. Diese Ergebnisse konnten bei 8 Monate alten, langzeitkultivierten, Astrozyten bestätigt werden.

Zwischen BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozyten bestanden hinsichtlich ihrer Reifungs- und Differenzierungsmarkerexpression keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dies steht allerdings im Gegensatz zu der BDV-Infektion in adulten Rattengehirnen, wo zumindest eine Herabregulation von S100 β zu finden ist. Eine Ursache für die Diskrepanz zwischen *in vivo* und *in vitro* Ergebnissen ist unklar.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Ausbreitung- und Persistenzstrategien des BDV in primären Astrozyten. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, ob ganze, behüllte, BDV-GP-haltige Viruspartikel weitergegeben werden oder die glia-gliale BDV-Ausbreitung über unbehüllte RNPs möglich ist. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine BDV-GP-Expression in Astrozyten zu sehr späten Zeitpunkten p.i. belegt werden. Im Zellkulturüberstand konnten keine infektiöse Viruspartikel nachgewiesen werden. Die funktionelle Notwendigkeit des BDV-GP bei der Virusausbreitung wurde aber durch den Einsatz des Furininhibitors MI-0701 gezeigt. Das virale Hüllprotein BDV-M konnte in astrozytären Fortsätzen lokalisiert werden, wo sich zu späteren Infektionszeitpunkten auch genomische BDV-N –ssRNA fand. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich das BDV, analog zum intraaxonalen Transport, über astrozytäre Fortsätze ausbreitet. Dort könnten Zytoplasmabrücken oder lokale Fusionsporen entstehen über die das Virus BDV-GP-abhängig über Clathrin-medierte Endozytose übertragen wird. Dies würde einen effektiven Schutz vor der antiviralen Immunantwort bieten und somit die virale Persistenz begünstigen. Infizierte Gliazellen scheinen ein Reservoir für eine persistente Virusreplikation vor allem in der chronischen Infektionsphase zu sein (CARBONE et al., 1987; HERDEN, 2009), die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese These. Die Ergebnisse des Furininhibitor-Versuchs decken sich mit denen in Zelllinien sowie in neuronalen und neuroglialen Primärkulturen. Somit scheint der Inhibitor ein vielversprechender Kandidat für den therapeutischen Einsatz bei akuter BD zu sein (LENNARTZ et al., 2015).

Die Untersuchung viraler Proteine und deren mRNAs zeigten vielfältige und komplexe Regulationsmechanismen mit denen BDV seinen nicht zytolytischen Vermehrungszyklus reguliert und eine persistierende Infektion etabliert.

Die in der vorliegenden Studie verwendeten primären Astrozyten erwiesen sich als wertvolle Werkzeuge zur Untersuchung der glia-gliale BDV-Ausbreitungsstrategien sowie der astrozytären Persistenzstrategien. *In vivo* wäre es durch den komplexen Zellverband im Gehirn nur sehr schwer möglich, die Regulationsmechanismen des BDV in einer Einzelzellpopulation zu untersuchen. Da die Vorgänge in BDV-infizierten Rattengehirnen durch zelluläre Wechselwirkungen und insbesondere durch den Einfluss des Immunsystems wesentlich komplexer als *in vitro* sind, erscheint eine Überprüfung der Ergebnisse des Inhibitionsversuchs in Tierversuchen auch aus diesem Grunde sinnvoll.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Ziel der vorliegenden Dissertationsschrift war die Untersuchung der Rolle von Astrozyten bei der Ausbreitung und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit (*Borna Disease Virus*, BDV). Zunächst sollten der Reifung und Differenzierung primärer, BDV-infizierter und nicht infizierter Astrozytenkulturen aus den cerebralen Cortices von Lewis-Ratten untersucht werden, um die Eignungen und Grenzen dieser Kulturen zur Analyse persistenter Virusinfektionen zu erarbeiten. Außerdem sollte geklärt werden, ob in Astrozyten Unterschiede zwischen der akuten und der chronisch-persistenten Infektionsphase hinsichtlich der BDV-Protein und -mRNA Expression bestehen. Hierzu wurden die Virusproteine BDV-N (Nukleoprotein), BDV-M (Matrixprotein) und BDV-GP (Glykoprotein) und die dazu gehörenden mRNAs in einer Kinetik untersucht. Die Rolle des BDV-GP für die glia-gliale Virusausbreitung in primären Astrozytenkulturen wurde mittels Furininhibitor getestet, der die Spaltung des BDV-GP in seine beiden funktionellen Untereinheiten BDV-GP-C und BDV-GP-N verhindert (BECKER et al., 2010). Weiterhin wurde der Zellkulturüberstand BDV-infizierter Astrozyten auf infektiöses, BDV-GP-haltiges Virus untersucht.
2. In der Literaturübersicht wird ein Überblick über Physiologie und Pathologie von Astrozyten gegeben, Astrozytenreifungs- und -differenzierungsmarker beschrieben und der Verwendungszweck von primären astrozytären Zellkulturen charakterisiert. Es wird ein Überblick über den aktuellen Stand der Forschung bezüglich Pathogenese und Klinik der Bornaschen Krankheit gegeben. Das Virus, seine Proteine sowie sein Infektionszyklus und die viralen Persistenzmechanismen werden beschrieben. Die Ausbreitungsstrategien behüllter Viren und der aktuelle wissenschaftliche Stand zur BDV-Ausbreitung in Zellkulturen werden charakterisiert. Abschließend wird außerdem auf den Zelltropismus des BDV eingegangen. Abschließend wird ein kurzer Einblick in Prophylaxe und Therapieansätze bei Bornascher Krankheit und in die Funktionen der Pro-Protein-Konvertase Furin gegeben sowie der Furin-Inhibitor MI-0701 charakterisiert.
3. Im experimentellen Teil wurden aus den Gehirnen neonataler Lewis-Ratten primäre Astrozytenkulturen des Cortex cerebri gewonnen und *in vitro* mit einer Ratten-adaptierten BDV-Präparation (5/25/92) infiziert. Um die Einsatzmöglichkeiten und Grenzen primärer astrozytärer corticaler Zellkulturen zu untersuchen, wurden zunächst BDV-infizierte und nicht infizierte Kulturen auf ihre Reifungs- und Differenzierungsmarker getestet. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die Expression von GFAP, Vimentin, Nestin, S100 β , GLAST und GLT-1 am 7. 28. und 42 Tag *in vivo* (*day in vivo*, DIV) semiquantitativ bestimmt. BDV-Nukleoprotein (BDV-N) BDV-Matrixprotein (BDV-M) und BDV-Glykoprotein (BDV-GP) wurden durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen und in einer Kinetikstudie am Tag 14, 28. und 42 nach Infektion (*post infection*, p.i.) semiquantitativ untersucht und deren intrazelluläre Lokalisation bestimmt. Die Ergebnisse wurden durch Western-Blot

Untersuchungen der gleichen Antigene überprüft. Zum Nachweis verschiedener viraler RNAs wurde eine *Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)* mit Digoxigenin (DIG)-markierten RNA Sonden durchgeführt. Es wurden Sonden verwendet, die vorwiegend positiv orientierte mRNAs (+ss) detektieren, die für die Virusproteine BDV-N, BDV-M und BDV-GP kodieren. Für BDV-N wurde außerdem die genomische, negativ orientierte (-ss) RNA dargestellt. Die Zeitpunkte 28 und 42 p.i. wurden semiquantitativ ausgewertet und die intrazelluläre Lokalisation der RNAs bestimmt. Mittels *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (*real-time PCR*) wurde die Transkriptionseffizienz der BDV-N, BDV-M und BDV-GP spezifischen Transkripte in einer Kinetik (Tag 21, 28 und 42 p.i.) quantitativ untersucht. Der Zellkulturüberstand primärer Astrozyten wurde am Tag 27 p.i. auf das Vorhandensein freier, infektiöser Viruspartikel überprüft. Zur Untersuchung der Rolle des BDV-GP bei der glia-glialen Virus-Ausbreitung wurden nicht infizierte Astrozyten im Verhältnis 100:1 mit zu 94% BDV-infizierten Astrozyten gemischt und für 23 Tage kokultiviert. Einem Teil der Zellen wurde der Furin-Inhibitor MI-0701 zugegeben, der die Spaltung des BDV-GP in seine funktionellen Untereinheiten GP-C und GP-N verhindert. Der andere Teil der Zellen wurde ohne Inhibitorzugabe kultiviert. Der Prozentsatz BDV-infizierter Zellen wurde bei beiden Untersuchungsgruppen mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen BDV-N kinetisch untersucht.

4. Die Astrozyten-Reifungsmarker GFAP, Vimentin, Nestin, S100 β waren am Tag 7, 28 und 42 *in vitro* in fast allen Zellen nachweisbar. Primäre Astrozytenkulturen des Cortex cerebri von Lewis-Ratten reiften folglich unter den hier verwendeten Kulturbedingungen nicht wie Astrozyten *in vivo* vollständig aus, sondern ähnelten immaturren perinatalen Astrozyten früherer *in vivo* Studien. Die Expression der Astrozyten-Differenzierungsmarker GLAST und GLT-1 charakterisierte die Zellen als protoplasmatische Astrozyten (Typ 1-Astrozyten). Es konnte kein Unterschied zwischen BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen festgestellt werden, so dass die BDV-Infektion die Reifung und Differenzierung der Astrozyten nicht zu beeinflussen scheint. Die primären Astrozyten erwiesen sich für die Untersuchung der BDV-Ausbreitung und speziell BDV-infizierte Astrozyten betreffende Fragestellungen als sehr wertvolle Werkzeuge. *In vitro*-Astrozyten exprimieren nicht die gleichen Zellreifungsmarker wie gleichalte *in vivo*-Astrozyten. Dies zeigt die Beschränkungen dieses *in vitro*-Ansatzes auf, so dass bei Verwendung primärer Astrozyten die Ergebnisse gegebenenfalls im Tierversuch überprüft werden müssen oder die Ausreifung der Zellen durch Zugabe von Wachstumsfaktoren induziert werden sollte.
5. Durch indirekte Immunfluoreszenz ließ sich BDV-GP zu keinem Untersuchungszeitpunkt nachweisen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den *in vivo* Verhältnissen, wo BDV-GP ebenfalls noch nie in Astrozyten nachgewiesen werden konnte. BDV-N fand sich zu allen Untersuchungszeitpunkten sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma und in Zellfortsätzen. BDV-M war dagegen nur sehr selten im

Kern nachweisbar, sondern befand sich überwiegend im Zytoplasma und Zellfortsätzen. BDV-N und BDV-M waren am Tag 14 p.i. jeweils in weniger als 30% der Zellen exprimiert. Die BDV-N Expression stieg vom Tag 28 zum Tag 42 kontinuierlich an und erreichte eine Expression in >80% der Zellen. Bei BDV-M war der Anstieg vom Tag 28 zum Tag 42 nur geringgradig ausgeprägt, zu beiden Zeitpunkten fand sich eine Reaktion in 30-80% der Astrozyten.

6. BDV-N und BDV-M ließen sich mittels Western Blot zu allen Untersuchungszeitpunkten nachweisen. BDV-GP war in den untersuchten Proben vom 21., 28. und 42. dpi nicht nachweisbar. Der BDV-GP Nachweis gelang jedoch in persistent BDV-infizierten Astrozyten. BDV-GP konnte dadurch erstmals in Astrozyten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten jedoch auf eine starke Restriktion der BDV-GP-Expression in Astrozyten hin.
7. BDV-N RNA und mRNA, BDV-M mRNA sowie BDV-GP mRNA wurden morphologisch mittels FISH nachgewiesen. BDV-N mRNA trat sowohl im Zytoplasma als auch in Kernen auf und wurde am stärksten exprimiert, was den 3´-5´-Transkriptionsgradient des BDV bestätigt. Die Expression fiel im Untersuchungsverlauf leicht ab. Dagegen stieg die BDV-GP mRNA Expression von geringem auf mittleres Niveau an. Die mRNA befand sich allerdings fast ausschließlich in Zellkernen. Dies deutet auf eine effektive Transkription, aber Restriktion des nukleären Exportes der mRNA hin, was eine Erklärung für das fast völlige Fehlen des BDV-GP-Nachweises in Astrozyten sein kann und den Verhältnissen *in vivo* entspricht. BDV-M mRNA war zu allen Untersuchungszeitpunkten nur schwach nachweisbar und fand sich variabel sowohl in Zellkernen als auch im Zytoplasma. Möglicherweise ist der schwache Nachweis auf Verwendung der mit 88 Nukleotiden nur sehr kurzen FISH Sonde zurückzuführen. Da BDV-M am 28. und 42 dpi in 30-80% der Zellen nachweisbar ist, scheint eine ausreichende Translation stattzufinden. Genomische BDV-N RNA stieg von geringem auf mittleres Niveau an und fand sich besonders am Tag 42 p.i. sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Möglicherweise findet zu späten Infektionszeitpunkten ein gesteigerter Transport genomischer RNA zu astrozytären Fortsätzen statt, wo Reifung und Freisetzung des BDV stattfinden könnten.
8. BDV-N spezifische Transkripte waren in primären Astrozytenkulturen zu allen Untersuchungszeitpunkten und in allen Proben mittels real-time PCR in signifikant höherer Kopienzahl nachweisbar als BDV-M mRNA und BDV-GP mRNA. Dies entspricht wie erwartet dem 3´-5´-Transkriptionsgradient des BDV. Eine Regulation der Transkriptmenge zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. fand sich für BDV-N mRNA und BDV-M mRNA, die Transkripte fielen vom Tag 21 zum Tag 42 stetig ab. Die BDV-GP mRNA blieb dagegen in etwa konstant.
9. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Notwendigkeit des BDV-GP für die glia-gliale Virusausbreitung belegt werden. Im Zellkulturüberstand BDV-infizierter Astrozyten am Tag 27 p.i. war kein infektiöses Virus nachweisbar. Daraus kann

gefolgert werden, dass BDV-infizierte primäre Astrozytenkulturen, wenn überhaupt, dann nur ganz geringe Mengen an infektiösen BDV-Partikeln in den Extrazellularraum abgeben, die für eine Neuinfektion von Zellen nicht ausreichen. Dies zeigt, dass sich die BDV-Infektion überwiegend zwischen benachbarten Zellen ausbreitet. Die Virusausbreitung ist außerdem von einer korrekten Spaltung des BDV-GP in seine funktionellen Untereinheiten abhängig, da die Ausbreitung durch Zugabe des Inhibitors MI-0701, der die GP-Spaltung verhindert, signifikant reduziert wird. Eine Virusausbreitung über unbehüllte Ribonukleoproteinkomplexe scheint somit unwahrscheinlich. Es kann gefolgert werden, dass für die transgliale BDV-Ausbreitung ganze, BDV-GP-haltige Viruspartikel gebraucht werden. Die Übertragung scheint durch bisher noch unbekannte Mechanismen von infizierte auf uninfizierte Nachbarzellen stattzufinden. Als mögliche Mechanismen kämen die Weitergabe über Zytoplasmabrücken oder die Bildung lokaler Mikrofusionsporen in Frage. Auch eine lokale Abschnürung von Viren wäre denkbar. Sowohl das mit dem RNP assoziierte BDV-N als auch das mit der Virushülle und dem RNP assoziierte BDV-M sowie genomische BDV-N vRNA konnten in astrozytären Fortsätzen nachgewiesen werden. Möglicherweise findet, analog zum intraaxonalen Transport in Neuronen, ein Transport genomischer RNA und BDV-spezifischer Proteine zu astrozytären Fortsätzen statt, wo Reifung und Weitergabe des BDV an die Nachbarzelle stattfinden könnte.

10. Zur Aufrechterhaltung der viralen Persistenz benutzt das BDV in Astrozyten vielschichtige Regulationsmechanismen, die dazu beitragen könnten, den nicht-zytolytischen persistierenden Lebenszyklus im ZNS zu etablieren. Insbesondere zu späten Infektionszeitpunkten könnten Astrozyten *in vivo* zur Aufrechterhaltung der BDV-Replikation und Virusfreisetzung beitragen und dadurch die virale Persistenz ermöglichen. Die starke Restriktion der Glykoproteinexpression und die fehlende Freisetzung infektiöser Viruspartikel stellen *in vivo* vermutlich wichtige Faktoren zur Umgehung des körpereigenen Immunsystems dar. Diese Mechanismen konnten auch in primären Astrozytenkulturen nachgewiesen werden. Weiterhin scheint das BDV durch verschiedene Mechanismen in der Lage zu sein, aktiv das körpereigene Immunsystem zu unterdrücken. In Astrozyten geschieht dies *in vivo* unter anderem durch eine Herabregulation von S100 β , welches als Zytokin fungiert und Entzündungsreaktionen fördert. Eine BDV bedingte Verringerung der S100 β -Expression konnte in primären corticalen Astrozytenkulturen jedoch nicht gezeigt werden, was möglicherweise an einer fehlenden Rückkopplung durch immunologische Effektorzellen liegen könnte. Die Proteinexpression wird in Astrozyten vielschichtig reguliert. Das am höchsten exprimierte Protein BDV-N schützt das Virusgenom, wirkt einer Aktivierung des Immunsystems entgegen und trägt durch Schutz vor Superinfektionen zur genomischen Stabilität des BDV bei. BDV-M wird *in vivo* vor allem in der späten Infektionsphase exprimiert. Es fanden sich Hinweise, dass das Mengenverhältnis von BDV-M zu einer balancierten Freisetzung

neuer Viruspartikel beitragen könnte. Möglicherweise beeinflusst BDV-M außerdem über seine Bindung an BDV-P indirekt die Polymeraseaktivität. BDV-GP ist eine wichtige Determinante für die antivirale Immunantwort und wird in Astrozyten extrem restriktiv exprimiert. Die Herabregulierung der BDV-GP-Expression geschieht unter anderem durch eine geringere Spleißeffizienz, die sich aufgrund möglicher abweichender Spleißregulatoren in Astrozyten von der in Neuronen unterscheiden könnte. Eine restriktive BDV-GP Expression wird außerdem durch Retention der BDV-GP mRNA im Zellkern, regulierte Translation und Akkumulation des Proteins in zellulären Kompartimenten erreicht.

7. SUMMARY

1. Aim of this study was to analyse the role of astrocytes in Borna disease virus (BDV) spread and persistence. Initially, the maturation and differentiation of BDV-infected and not infected primary cortical astrocyte cultures, prepared from cerebral cortices of Lewis rats, were studied. Thus, their applicability and limitations for analyzing persistent virus infections were tested. In addition the potential differences in astrocytes between the acute and chronic-persistent phase of infection in respect to the expression of BDV-proteins and –mRNAs was analysed. For that purpose a kinetic study of the expression of virus proteins BDV-N (nucleoprotein), BDV-M (matrixprotein) and BDV-GP (glycoprotein) and their respective mRNAs was performed. The role of BDV-GP for glia-glia BDV-spread in primary astrocyte cultures was examined using a furin inhibitor, which prevents the cleavage of BDV-GP into its functional subunits BDV-GP-C and BDV-GP-N (BECKER et al., 2010). Furthermore, the cell-culture supernatant of BDV-infected astrocytes was tested for infectious virus particles.
2. In the bibliographic survey, an overview of the current knowledge on physiology and pathology of astrocytes, astrocytic maturation- and differentiation-markers and the application of primary astrocyte cell cultures is given. A survey of the actual state of research in respect to pathogenesis and clinical manifestation of BDV is given. The virus, its proteins as well as its infection cycle and the viral persistence strategies are described. Dissemination mechanisms of enveloped viruses including the current knowledge of BDV spread in cell cultures were characterized. Additionally, the cellular tropism of BDV is discussed. A short insight in prophylaxe and therapie against Borna disease is given. Finally, function of the proprotein-convertase furin and of furin inhibitor MI-0701 are briefly described.
3. In the experimental part, primary astrocyte cultures were prepared from cerebral cortices of neonatal Lewis rats. At day 1 *in vitro* the cells were inoculated with a rat-adapted BDV preparation 5/25/92. To evaluate their applicability and limitations, BDV infected and not infected cultures were investigated for expression of astrocytic maturation and differentiation antigens. By means of indirect immunofluorescence GFAP, vimentin, nestin, S100 β , GLAST and GLT-1 were detected and semiquantitatively analysed at day 7, 28 and 42 *in vitro* (day *in vitro*, DIV). Various BDV-specific antigens were detected by indirect immunofluorescence by using a monoclonal antibody directed against nucleoprotein (BDV-N) and polyclonal, monospecific antibodies against matrixprotein (BDV-M) and glycoprotein (BDV-GP). Their temporal distribution at day 14., 28. and 42. post infection (dpi) was semiquantitatively reviewed and the subcellular distribution of the proteins evaluated. The results were verified by Western blot analysis of the same BDV-specific antigens. For the detection of different viral RNAs, fluorescence *in situ*-hybridisation (FISH) was performed using DIG-labelled RNA probes specific for

SUMMARY

+ssRNA species coding for BDV-N, BDV-M and BDV-GP and for genomic BDV-N – ssRNA. The expression was semiquantitatively evaluated at 28. and 42. dpi and the distribution as well as the subcellular localization of the RNAs was analyzed. Transcripts specific for BDV-N, BDV-M and BDV-GP were quantified at 21. 28 and 42 dpi using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). Cell culture supernatant of primary astrocytes at 27. dpi was examined for the presence of infectious virus particles. To explore the significance of BDV-GP in glia-glial BDV spread, non-infected astrocytes were mixed with 94% BDV-infected astrocytes in a ratio of 100:1 and co-cultivated for 23 days. Furin-Inhibitor MI-0701 was added to one part of the cells, in order to prevent the cleavage of BDV-GP in its functional subunits BDV-GP-C and BDV-GP-N. The other part of the cells was cultivated without inhibitor. In a kinetic study, the percentage of BDV-infected cells of both groups was examined by using indirect immunofluorescence assay on BDV-N.

4. Astrocytic maturation markers, such as GFAP, Vimentin, Nestin and S100 β were detected at 7., 28. and 42. DIV in nearly all cells. The result implies that the maturation of primary astrocytes prepared from cortices cerebri of neonatal Lewis rats is not completed using the cell culture conditions of this study. The cells resemble immature perinatal astrocytes of previous *in vivo* studies. By the expression of astrocytic differentiation markers GLAST and GLT-1 the cells were characterized as protoplasmic astrocytes (type 1 astrocytes). No difference could be detected between BDV-infected and non-infected astrocyte cultures, thus, the BDV infection does not seem to influence maturation and differentiation of these cells. Primary astrocytes are useful tools to examine glia-glial BDV spread and BDV-protein and –mRNA expression in astrocytes. *In vitro* astrocytes do not express the same cellular maturation markers as *in vivo* astrocytes of the same age, which exhibit the limitations of this *in vitro* method. For this reason it is recommended to verify the results in animal experiments. Alternatively, cell maturation could maybe induced by addition of growth-factors to astrocytic cultures.
5. At no time point analyzed, BDV-GP could be detected in primary cortical astrocytes using indirect immunofluorescence. This result is consistent with *in vivo* experiments, where BDV-GP was never detected in astrocytes. BDV-N was found at every time point investigated in nuclei as well as in cytoplasm and astrocytic processes. In contrast, BDV-M was detectable mainly in cytoplasm and processes, in nuclei it could only be found infrequently. BDV-N and BDV-M were discovered at 14 dpi at low levels in less than 30% of the cells. The expression of BDV-N continuously increased from day 28 to day 42 and resulted in an expression in more than 80% of cells. In comparison, the increase of BDV-M-expression from day 28 to 42 was moderate. At both points of time a reaction in 30-80% of the astrocytes was evident.
6. BDV-N and BDV-M were present using the Western blot method at every time point analyzed. Unlike that, BDV-GP was not detected in the samples at 21., 28. and 42 dpi. However, BDV-GP was present in astrocytes that were BDV infected to 94%.

SUMMARY

Thus, for the first time BDV-GP-expression in astrocytes was confirmed. However, the results indicate a strong restriction in BDV-GP-Expression in this cell type.

7. BDV-N vRNA and mRNA, BDV-M mRNA and BDV-GP mRNA were morphological analyzed using FISH. BDV-N mRNA was found in the cytoplasm as well as in the nuclei of infected cells. The mRNA was expressed most abundantly, following the 3'-5'-transcriptional gradient of BDV. Expression of BDV-N mRNA decreased slightly in the investigation period. In contrast, BDV-GP mRNA expression increased from less than 30% expression in cells up to 30-80%. The transcript was found nearly exclusively in cell nuclei. Thus, BDV-GP mRNA transcription seems to be effective, but nuclear export of mRNAs appears to be restricted. This could explain the barely detectable amounts of BDV-GP in astrocytes. During the investigation period, BDV-M mRNA was detectable only in a few cells in cell nuclei or in the cytoplasm. Maybe, the poor confirmation of BDV-M mRNA is due to a very short FISH probe, which possesses only 88 nucleotides. Given that BDV-M is detectable in 30-80% of astrocytes at 28. and 42 dpi., a sufficient translation may occur. Genomic BDV-N vRNA increased from day 28 to day 42 p.i., and was found especially at day 42 p.i. in nuclei and in the cytoplasm. This observation suggests an increased transport of genomic RNA to astrocytic processes, as potential sites of BDV maturation and budding.
8. At any time point investigated, BDV-N specific transcripts were most abundantly verified by real-time PCR. BDV-Intron I and Intron II +ssRNA were found in lower amounts, which is consistent with the 3'-5'-transcription gradient of BDV. BDV-N +ssRNA and BDV-Intron I +ssRNA displayed different transcription efficiency at the time points investigated. Both transcripts decreased from day 21 to day 42. BDV-Intron II +ssRNA varied not considerably during analysis.
9. In the present study, the necessity of BDV-GP for glia-glia BDV dissemination could be proven for the first time. Furthermore, there were no detectable amounts of virus particles in the cell culture supernants of astrocytes 27 dpi. Thus, astrocytes seem to release not any or at least not detectable amounts of infectious BDV particles, which are not sufficient to infect other cells. This result implicates that BDV spreads predominantly between neighboring cells. Besides, adding the furin inhibitor MI-0701 showed a significant reduction of BDV spread, demonstrating that viral dissemination depends on correct cleavage of BDV-GP in its functional subunits. Hence, viral spread of non-enveloped ribonucleoprotein complexes (RNPs) seems unlikely. Thus, for glia-glia BDV dissemination, BDV-GP containing viral particles seems to be necessary, which are not released in the culture supernant. Viral propagation from infected to uninfected adjoining cells seems to occur by yet not determined mechanism. Potentially, there are elements of cytoplasmatic bridges or locally formed fusion pores involved. Alternatively, dissemination takes place via locally released virus particles. RNP associated BDV-N as well as envelope-associated BDV-M and genomic BDV-N vRNA was detected in astocytic processes. Therefore, it is possible that, as in neuronal axons, transport of genomic RNA and BDV specific

proteins appears in processes of astrocytes, where maturation and transfer of BDV to neighboring cells might take place.

10. To maintain viral persistence, BDV uses complex regulatory mechanisms, which helps to establish its non-cytolytic, persistent live cycle in the ZNS. Astrocytes contribute *in vivo* to maintain BDV replication and virus release and hence enable viral persistence. Strong restriction of BDV-GP-expression as well as the absent release of infectious virus particles in the extracellular space seem to play important roles to avoid immune response. These mechanisms could be proved in primary astrocyte cultures. Besides, BDV seems to be able to suppress the immune system by various mechanisms. In astrocytes *in vivo*, this happens through decreased S100 β -Expression, which acts as a cytokine and promotes inflammatory reaction. However, a BDV mediated decrease in S100 β -Expression in primary cortical astrocyte cultures was not found in this study. Maybe this is caused by an absent feedback of immunological effector cells in cell cultures. BDV protein expression is modulated by various methods. BDV-N is most abundant expressed. It contributes to guard the virus genome, counteracts the activation of immune response and maintains BDV genomic stability by preventing super-infection. BDV-M is expressed in astrocytes *in vivo* mainly in the later state of infection. The proportion of BDV-M could possibly account for balanced virus release. BDV potentially affects polymerase activity through binding of BDV-P. BDV-GP is an important contact point for antiviral immune response. Its expression in astrocytes is extremely low. Downregulation of BDV-GP expression could happen through decreased splicing efficiency, which could differ in neurons and astrocytes due to divergent splicing regulatory factors. Furthermore, retention of BDV-GP mRNA in the nucleus, downregulation of protein translation and accumulation of BDV-GP in cellular compartments lead to restrictive BDV-GP expression.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AHLEMEYER B., KEHR K., RICHTER E., HIRZ M., BAUMGART-VOGT E., HERDEN C. (2013):

Phenotype, differentiation, and function differ in rat and mouse neocortical astrocytes cultured under the same conditions. *J. Neurosci. Methods* 212: 156–164.

AHMED M., LYLES D. S. (1997):

Identification of a consensus mutation in M protein of vesicular stomatitis virus from persistently infected cells that affects inhibition of host-directed gene expression. *Virology* 237: 378–388.

ALGERMISSEN D. A. (2010):

Nachweis von Borna Disease Virus-spezifischen Proteinen und deren subgenomischer RNA bei natürlich infizierten Pferden [Elektronische Ressource]. Hannover, Hochsch., Diss., 2010. Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover.

ALOISI F., AGRESTI C., LEVI G. (1988):

Establishment, characterization, and evolution of cultures enriched in type-2 astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 21: 188–198.

ANDERSON C. M., SWANSON R. A. (2000):

Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32: 1–14.

ANDERSSON C., BRUNSO-BECHTOLD J., TYTELL M. (1994):

Immunocytochemical and ultrastructural characterization of type 1 astrocytes and 0-2A lineage cells in long-term co-cultures. *Brain Res.* 646: 100–117.

ASOU H., HIRANO S., UYEMURA K. (1989):

Ganglioside composition of astrocytes. *Cell Struct. Funct.* 14: 561–568.

AUTHENRIETH C.F. (1823):

Ueber die hitzige Kopf-Krankheit der Pferde. Auf Verlangen des Müsinger-Vereins zur Beförderung der Pferdezucht auf der Alp, und zunächst für diese Geged. bey Heinrich, Tübingen: Laupp

BACHMANN S., CAPLAZI P., FISCHER M., EHRENSPERGER F., CONE R. W. (1999):

Lack of association between Borna disease virus infection and neurological disorders among HIV-infected individuals. *J. Neurovirol.* 5: 190–195.

BACHOO R. M., KIM R. S., LIGON K. L., MAHER E. A., BRENNAN C., BILLINGS N., CHAN S., LI C., ROWITCH D. H., WONG W. H., DEPINHO R. A. (2004):

Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 8384–8389.

BAJRAMOVIC J. J., MÜNTER 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.

BAJRAMOVIC J. J., SYAN S., BRAHIC M., DE LA TORRE J. C. DE, GONZALEZ-DUNIA D. (2002):

1-beta-D-arabinofuranosylcytosine inhibits borna disease virus replication and spread. *J. Virol.* 76: 6268–6276.

- BAJRAMOVIC J. J., VOLMER R., SYAN S., POCHET S., GONZALEZ-DUNIA D. (2004):**
2'-fluoro-2'-deoxycytidine inhibits Borna disease virus replication and spread. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1422–1425.
- BANGHAM C. R., KIRKWOOD T. B. (1990):**
Defective interfering particles: effects in modulating virus growth and persistence. *Virology* 179: 821–826.
- BARON J. M. (2008):**
Konstruktion, Expression und Charakterisierung von rekombinantem Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit, Marburg, Univ., Dipl.-Arb., 2008.
- BARR P. J., MASON O. B., LANDSBERG K. E., WONG P. A., KIEFER M. C., BRAKE A. J. (1991):**
cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues. *DNA Cell Biol.* 10: 319–328.
- BASAK A. (2005):**
Inhibitors of proprotein convertases. *J. Mol. Med.* 83: 844–855.
- BATTER D. K., CORPINA R. A., ROY C., SPRAY D. C., HERTZBERG E. L., KESSLER J. A. (1992):**
Heterogeneity in gap junction expression in astrocytes cultured from different brain regions. *Glia* 6: 213–221.
- BAUTISTA J. R., SCHWARTZ G. J., DE LA TORRE J. C. DE, MORAN T. H., CARBONE K. M. (1994):**
Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res. Bull.* 34: 31–40.
- BAYER K. (2010):**
Bedeutung der Glykoproteinspaltung in der Zell-zu-Zell Ausbreitung des Virus der Bornaschen Krankheit. Diplomarbeit, Marburg, 2010.
- BECKER G. L., SIELAFF F., THAN M. E., LINDBERG I., ROUTHIER S., DAY R., LU Y., GARTEN W., STEINMETZER T. (2010):**
Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J. Med. Chem.* 53: 1067–1075.
- BECKER G.L., LU Y., HARDES K., STREHLOW B., LEVESQUE C., LINDBERG I., SANDVIG K., BAKOWSKY U., DAY R., GARTEN W., STEINMETZER T. (2012)**
Highly potent inhibitors of proprotein convertase furin as potential drugs for treatment of infectious diseases. *J Biol Chem.* 207(26): 21992-22003
- BELYI V. A., LEVINE A. J., SKALKA A. M. (2010):**
Unexpected inheritance: multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. *PLoS Pathog.* 6: e1001030.
- BERG A. L. (1999):**
Borna disease in cats. *Vet. Rec.* 145: 87.
- BERGERON F., LEDUC R., DAY R. (2000):**
Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J. Mol. Endocrinol.* 24: 1–22.

BHELLA D., RALPH A., MURPHY L. B., YEO R. P. (2002):

Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J. Gen. Virol.* 83: 1831–1839.

BIGNAMI A., RAJU T., DAHL D. (1982):

Localization of vimentin, the nonspecific intermediate filament protein, in embryonal glia and in early differentiating neurons. In vivo and in vitro immunofluorescence study of the rat embryo with vimentin and neurofilament antisera. *Dev. Biol.* 91: 286–295.

BILLAUD J. N., LY C., PHILLIPS T. R., DE LA TORRE J. C. DE (2000):

Borna disease virus persistence causes inhibition of glutamate uptake by feline primary cortical astrocytes. *J. Virol.* 74: 10438–10446.

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.

BIRAN R., NOBLE M. D., TRESKO P. A. (1999):

Characterization of cortical astrocytes on materials of differing surface chemistry. *J. Biomed. Mater. Res.* 46: 150–159.

BODE L., DÜRRWALD R., LUDWIG H. (1994a):

Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet. Rec.* 135: 283–284.

BODE L., RECKWALD P., SEVERUS W. E., STOYLOFF R., FERSZT R., DIETRICH D. E., LUDWIG H. (2001):

Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies--the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol. Psychiatry* 6: 481–491.

BODE L., STEINBACH F., LUDWIG H. (1994b):

A novel marker for Borna disease virus infection. *Lancet* 343: 297–298.

BOENISCH T. (2005):

Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 13: 283–286.

BOLT G., PEDERSEN I. R. (1998):

The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology* 252: 387–398.

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

BOURG M., HERZOG S., ENCARNAÇÃO J. A., NOBACH D., LANGE-HERBST H., EICKMANN M., HERDEN C. (2013):

Bicolored White-toothed Shrews as Reservoir for Borna Disease Virus, Bavaria, Germany. *Emerging Infect. Dis.* 19: 2064–2066.

BOVOLENTA P., LIEM R. K., MASON C. A. (1984):

Development of cerebellar astroglia: transitions in form and cytoskeletal content. *Dev. Biol.* 102: 248–259.

- BRAMANTI V., TOMASSONI D., AVITABILE M., AMENTA F., AVOLA R. (2010):**
Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. *Front Biosci (Schol Ed)* 2: 558–570.
- BRIBIAN A, FIGUERES-ONATE M, MARTIN-LOPEZ E, LOPEZ-MASCARAQUE L (2015):**
Decoding astrocyte heterogeneity: New tools for clonal analysis. *Neuroscience* (2015), article in press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.036>
- BRIESE T., DE LA TORRE J. C. DE, LEWIS A., LUDWIG H., LIPKIN W. I. (1992):**
Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 11486–11489.
- BRIESE T., LIPKIN W. I., DE LA TORRE J. C. DE (1995):**
Molecular biology of Borna disease virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190: 1–16.
- BRIESE T., SCHNEEMANN A., LEWIS A. J., PARK Y. S., KIM S., LUDWIG H., LIPKIN W. I. (1994):**
Genomic organization of Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 4362–4366.
- BROWN D. R. (1998):**
A method for long term culture of murine type 2 astrocytes. *J. Neurosci. Methods* 79: 161–167.
- BRUNET J. F., ALLAMAN I., MAGISTRETTI P. J., PELLERIN L. (2010):**
Glycogen metabolism as a marker of astrocyte differentiation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30: 51–55.
- BRUNNE B., ZHAO S., DEROUICHE A., HERZ J., MAY P., FROTSCHER M., BOCK H. H. (2010):**
Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. *Glia* 58: 1553–1569.
- BUCHVALOV I. B., BÖCKER W. (2010):**
Immunohistochemistry. Springer, Heidelberg [u.a.].
- BUSHONG E. A., MARTONE M. E., ELLISMAN M. H. (2004):**
Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22: 73–86.
- CAHOY J. D., EMERY B., KAUSHAL A., FOO L. C., ZAMANIAN J. L., CHRISTOPHERSON K. S., XING Y., LUBISCHER J. L., KRIEG P. A., KRUPENKO S. A., THOMPSON W. J., BARRES B. A. (2008):**
A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28: 264–278.
- 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., WALDVOGEL A., STITZ L., BRAUN U., EHRENSPERGER F. (1994):**
Borna disease in naturally infected cattle. *J. Comp. Pathol.* 111: 65–72.
- CARBONE K. M., DUCHALA C. S., GRIFFIN J. W., KINCAID A. L., NARAYAN O. (1987):**
Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J. Virol.* 61: 3431–3440.

CARBONE K. M., MOENCH T. R., LIPKIN W. I. (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 K. M., PARK S. W., RUBIN S. A., WALTRIP R. W., VOGELSANG G. B. (1991b):

Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J. Virol.* 65: 6154–6164.

CARBONE K. M., RUBIN S. A., SIERRA-HONIGMANN A. M., LEDERMAN H. M. (1993):

Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J. Virol.* 67: 1453–1460.

CHAN-LING T., CHU Y., BAXTER L., WEIBLE II M., HUGHES S. (2009):

In vivo characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis. *Glia* 57: 39–53.

CHAN S. J., OLIVA A. A., LAMENDOLA J., GRENS A., BODE H., STEINER D. F. (1992):

Conservation of the prohormone convertase gene family in metazoa: analysis of cDNAs encoding a PC3-like protein from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6678–6682.

CHASE G., MAYER D., HILDEBRAND A., FRANK R., HAYASHI Y., TOMONAGA K., SCHWEMMLE M. (2007):

Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J. Virol.* 81: 743–749.

CHEN C. H., CHIU Y. L., WEI F. C., KOONG F. J., LIU H. C., SHAW C. K., HWU H. G., HSIAO K. J. (1999):

High seroprevalence of Borna virus infection in schizophrenic patients, family members and mental health workers in Taiwan. *Mol. Psychiatry* 4: 33–38.

CHU Y., HUGHES S., CHAN-LING T. (2001):

Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J.* 15: 2013–2015.

CIZZA G., STERNBERG E. M. (1994):

The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in susceptibility to autoimmune/inflammatory disease. *Immunomethods* 5: 73–78.

CLEMENTE R., DE LA TORRE J. C. DE (2007):

Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein. *J. Virol.* 81: 5968–5977.

CLEMENTE R., DE LA TORRE J. C. DE (2009):

Cell entry of Borna disease virus follows a clathrin-mediated endocytosis pathway that requires Rab5 and microtubules. *J. Virol.* 83: 10406–10416.

CLEMENTE R., PARSEVAL A. DE, PEREZ M., DE LA TORRE J. C. DE (2009):

Borna disease virus requires cholesterol in both cellular membrane and viral envelope for efficient cell entry. *J. Virol.* 83: 2655–2662.

CLEMENTE R., SISMAN E., AZA-BLANC P., DE LA TORRE J. C. DE (2010):

Identification of host factors involved in borna disease virus cell entry through a small interfering RNA functional genetic screen. *J. Virol.* 84: 3562–3575.

CONZELMANN K. K. (1998):

Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu. Rev. Genet.* 32: 123–162.

COSTANTINI C., LORENZETTO E., CELLINI B., BUFFELLI M., ROSSI F., DELLA-BIANCA V. (2010):

Astrocytes regulate the expression of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1-R) in primary cortical neurons during in vitro senescence. *J. Mol. Neurosci.* 40: 342–352.

CROS J. F., PALESE P. (2003):

Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* 95: 3–12.

CUBITT B., DE LA TORRE J. C. DE (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., LY C., DE LA TORRE J. C. DE (2001):

Identification and characterization of a new intron in Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 82: 641–646.

CUBITT B., OLDSTONE C., DE LA TORRE J. C. DE (1994a):

Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J. Virol.* 68: 1382–1396.

CUBITT B., OLDSTONE C., VALCARCEL J., LA CARLOS TORRE J. DE (1994b):

RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res.* 34: 69–79.

CZASCH S. D. (2001):

Untersuchungen über das Auftreten seniler Plaques und einer assoziierten Gliazellaktivierung im Gehirn alter Hunde [Elektronische Ressource]. Giessen, Univ., Diss., 2001.

DANNER K., HEUBECK D., MAYR A. (1978):

In vitro studies on Borna virus. I. The use of cell cultures for the demonstration, titration and production of Borna virus. *Arch. Virol.* 57: 63–75.

DANNER K., MAYR A. (1979):

In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. *Arch. Virol.* 61: 261–271.

DECROLY E., VANDENBRANDEN M., RUYSSCHAERT J. M., COGNIAUX J., JACOB G. S., HOWARD S. C., MARSHALL G., KOMPPELLI A., BASAK A., JEAN F. (1994):

The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *J. Biol. Chem.* 269: 12240–12247.

DEGIORGIS M. P., BERG A. L., HÂRD AF SEGERSTAD C., MÖRNER T., JOHANSSON M., BERG M. (2000):

Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *J. Clin. Microbiol.* 38: 3087–3091.

DELNATTE P., BERKVEN S., KUMMROW M., SMITH D. A., CAMPBELL D., CRAWSHAW G., OJKIC D., DELAY J. (2011):

New genotype of avian bornavirus in wild geese and trumpeter swans in Canada. *Vet. Rec.* 169: 108.

DENAULT J. B., CLAING A., D'ORLÉANS-JUSTE P., SAWAMURA T., KIDO T., MASAKI T., LEDUC R. (1995):

Processing of proendothelin-1 by human furin convertase. *FEBS Lett.* 362: 276–280.

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.

DOCEUL V., HOLLINSHEAD M., VAN DER LINDEN L., SMITH G. L. (2010):

Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* 327: 873–876.

DONG W., MARCINKIEWICZ M., VIEAU D., CHRÉTIEN M., SEIDAH N. G., DAY R. (1995):

Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J. Neurosci.* 15: 1778–1796.

DUBOIS C. M., LAPRISE M. H., BLANCHETTE F., GENTRY L. E., LEDUC R. (1995):

Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem.* 270: 10618–10624.

DUBOIS-DALCQ M. (1987):

Characterization of a slowly proliferative cell along the oligodendrocyte differentiation pathway. *EMBO J.* 6: 2587–2595.

DUCHALA C. S., CARBONE K. M., NARAYAN O. (1989):

Preliminary studies on the biology of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 12): 3507–3511.

DÜRRWALD R., KOLODZIEJEK J., HERZOG S., NOWOTNY N. (2007):

Meta-analysis of putative human bornavirus sequences fails to provide evidence implicating Borna disease virus in mental illness. *Rev. Med. Virol.* 17: 181–203.

DÜRRWALD R., KOLODZIEJEK J., MULUNEH A., HERZOG S., NOWOTNY N. (2006):

Epidemiological pattern of classical Borna disease and regional genetic clustering of Borna disease viruses point towards the existence of to-date unknown endemic reservoir host populations. *Microbes Infect.* 8: 917–929.

DÜRRWALD R., LUDWIG H. (1997):

Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralblatt Veterinarmedizin Reihe B* 44: 147–184.

EDDLESTON M., MUCKE L. (1993):

Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54: 15–36.

EICKMANN M., KIEMAYER S., KRAUS I., GÖSSL M., RICHT J. A., GARTEN W. (2005):

Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Lett.* 579: 4751–4756.

ENG L. F., LEE Y. L. (1995):

Neuroglial cells. Intermediate filaments in astrocytes. Oxford University Press: 650–667.

FAN D., GROOMS S. Y., ARANEDA R. C., JOHNSON A. B., DOBRENIS K., KESSLER J. A., ZUKIN R. S. (1999):

AMPA receptor protein expression and function in astrocytes cultured from hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 57: 557–571.

FEDOROFF S., WHITE R., NEAL J., SUBRAHMANYAN L., KALNINS V. I. (1983):

Astrocyte cell lineage. II. Mouse fibrous astrocytes and reactive astrocytes in cultures have vimentin- and GFP-containing intermediate filaments. *Brain Res.* 283: 303–315.

FINKE S. und CONZELMANN K., 2003:

Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J. Virol.*, Nov. 2003, 12074-12082

FINKE S., MUELLER-WALDECK R., CONZELMANN K., 2003:

Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *Journal of General Virology* (2003), 84, 1613-1621

Flint SJ (Hrsg.) (2009):

Principles of virology. ASM Press, Washington, DC.

FORMELLA S., JEHL C., SAUDER C., STAEHELI P., SCHWEMMLE M. (2000):

Sequence variability of Borna disease virus: resistance to superinfection may contribute to high genome stability in persistently infected cells. *J. Virol.* 74: 7878–7883.

FREEMAN M. R. (2010):

Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330: 774–778.

FURRER E., BILZER T., STITZ L., PLANZ O. (2001a):

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., BILZER T., STITZ L., PLANZ O. (2001b):

Neutralizing antibodies in persistent borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *J. Virol.* 75: 943–951.

GALABRU J., SARON M. F., BERG M., BERG A. L., HERZOG S., LABIE J., ZIENTARA S. (2000):

Borna disease virus antibodies in French horses. *Vet. Rec.* 147: 721–722.

GARCÍA-SASTRE A., PALESE P. (1993):

Genetic manipulation of negative-strand RNA virus genomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 765–790.

GAROFF H., HEWSON R., OPSTELTEN D. J. (1998):

Virus maturation by budding. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1171–1190.

GARRY C. E., GARRY R. F. (2009):

Proteomics computational analyses suggest that the bornavirus glycoprotein is a class III viral fusion protein (gamma penetrene). *Virol. J.* 6: 145.

GARTEN W., HALLENBERGER S., ORTMANN D., SCHÄFER W., VEY M., ANGLIKER H., SHAW E., KLENK H. D. (1994):

Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* 76: 217–225.

GARTEN W., STIENEKE A., SHAW E., WIKSTROM P., KLENK H. D. (1989):

Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* 172: 25–31.

GERDES H.-H., BUKORESHTLIEV N. V., BARROSO J. F. V. (2007):

Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 581: 2194–2201.

GHAZANFARI F. A., STEWART R. R. (2001):

Characteristics of endothelial cells derived from the blood-brain barrier and of astrocytes in culture. *Brain Res.* 890: 49–65.

GIAUME C., KOULAKOFF A., ROUX L., HOLCMAN D., ROUACH N. (2010):

Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Review 2010 Neuron glial interactions. Nat. Rev. Neurosci.* 11: 87–99.

GILBERT M. J., RIDDELL S. R., PLACHTER B., GREENBERG P. D. (1996):

Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383: 720–722.

GILBERT C., MEIK J.M., DASHEVSKY D., CARD D.C., CASTOE T.A., SCHAACK S. (2014)

Endogenous hepadnaviruses, bornaviruses and circoviruses in snakes. *Proc Biol Sci* 281 (1791): 2014112. doi:10.1098/rspb.214.1122

GONZALEZ-DUNIA D., CUBITT B., GRASSER F. A., DE LA TORRE J. C. DE (1997a):

Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J. Virol.* 71: 3208–3218.

GONZALEZ-DUNIA D., CUBITT B., DE LA TORRE J. C. DE (1998):

Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J. Virol.* 72: 783–788.

GONZALEZ-DUNIA D., EDDLESTON M., MACKMAN N., CARBONE K., DE LA TORRE J. C. DE (1996):

Expression of tissue factor is increased in astrocytes within the central nervous system during persistent infection with borna disease virus. *J. Virol.* 70: 5812–5820.

GONZALEZ-DUNIA D., SAUDER C., DE LA TORRE J. C. DE (1997b):

Borna disease virus and the brain. *Brain Res. Bull.* 44: 647–664.

GONZALEZ-DUNIA D., VOLMER R., MAYER D., SCHWEMMLE M. (2005):

Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res.* 111: 224–234.

GOSZTONYI G., DIETZSCHOLD B., KAO M., RUPPRECHT C. E., LUDWIG H., KOPROWSKI H. (1993):

Rabies and borna disease. A comparative pathogenetic study of two neurovirulent agents. *Lab. Invest.* 68: 285–295.

GOSZTONYI G., LUDWIG H. (1995):

Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190: 39–73.

GOSZTONYI G., LUDWIG H. (2001):

Interactions of viral proteins with neurotransmitter receptors may protect or destroy neurons. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 253: 121–144.

GOURSAUD S., KOZLOVA E. N., MALOTEAUX J.-M., HERMANS E. (2009):

Cultured astrocytes derived from corpus callosum or cortical grey matter show distinct glutamate handling properties. *J. Neurochem.* 108: 1442–1452.

GRABOWSKI P. J. (1998):

Splicing regulation in neurons: tinkering with cell-specific control. *Cell* 92: 709–712.

GRABOWSKI P. J. (2007):

RNA-binding proteins switch gears to drive alternative splicing in neurons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 577–579.

GRÖTERS S. E. (2004):

Nachweis von MMP-9-, MMP-14- und TIMP-1-mRNS im Gehirn von Hunden mit einer Staupeenzephalitis mittels In-situ-Hybridisierung. Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2004. DVG Service, 1. Aufl., Gießen.

GRÖTERS S., ALLDINGER S., BAUMGÄRTNER W. (2005):

Up-regulation of mRNA for matrix metalloproteinases-9 and -14 in advanced lesions of demyelinating canine distemper leukoencephalitis. *Acta Neuropathol.* 110: 369–382.

HABJAN M., ANDERSSON I., KLINGSTRÖM J., SCHÜMANN M., MARTIN A., ZIMMERMANN P., WAGNER V., PICHLMAIR A., SCHNEIDER U., MÜHLBERGER E., MIRAZIMI A., WEBER F. (2008):

Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS ONE* 3: e2032.

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.

HALLENBERGER S., BOSCH V., ANGLIKER H., SHAW E., KLENK H. D., GARTEN W. (1992):

Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360: 358–361.

HALLENSLEBEN W., SCHWEMMLE M., HAUSMANN J., STITZ L., VOLK B., PAGENSTECHER A., STAEHELI P. (1998):

Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J. Virol.* 72: 4379–4386.

HANS A., BAJRAMOVIC J. J., 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.

HANS A., SYAN S., CROSIO C., SASSONE-CORSI P., BRAHIC M., GONZALEZ-DUNIA D. (2001):

Borna disease virus persistent infection activates mitogen-activated protein kinase and blocks neuronal differentiation of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276: 7258–7265.

HANSSON E. (1986):

Primary astroglial cultures. A biochemical and functional evaluation. *Neurochem. Res.* 11: 759–767.

HARDES K., BECKER G., LU Y., DAHMS S., KÖHLER S., BEYER W., SANDVIG K., YAMAMOTO H., LINDBERG I., WALZ L., VON MESSLING V., THAN M., GARTEN W., STEINMETZER T. (2015)

Novel Furin Inhibitors with Potent Anti-infectious Activity. *ChemMedChem* 10 (7): 1218-1231

HATALSKI C. G., HICKEY W. F., LIPKIN W. I. (1998a):

Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J. Neuroimmunol.* 90: 137–142.

HATALSKI C. G., HICKEY W. F., LIPKIN W. I. (1998b):

Humoral immunity in the central nervous system of Lewis rats infected with Borna disease virus. *J. Neuroimmunol.* 90: 128–136.

HAUSMANN J., PAGENSTECHER A., BAUR K., RICHTER K., RZIHA H.-J., STAEHELI P. (2005):

CD8 T cells require gamma interferon to clear borna disease virus from the brain and prevent immune system-mediated neuronal damage. *J. Virol.* 79: 13509–13518.

HEFFELS-REDMANN U., ENDERLEIN D., HERZOG S., HERDEN C., PIEPENBRING A., NEUMANN D., MÜLLER H., CAPELLI S., MÜLLER H., OBERHÄUSER K., GERLACH H., KALETA E. F., LIERZ M. (2011):

Occurrence of avian bornavirus infection in captive psittacines in various European countries and its association with proventricular dilatation disease. *Avian Pathol.* 40: 419–426.

HENKEL M., PLANZ O., FISCHER T., STITZ L., RZIHA H.-J. (2005):

Prevention of virus persistence and protection against immunopathology after Borna disease virus infection of the brain by a novel Orf virus rekombinant. *J. Virol.* 79: 314–325.

HERDEN C. (1997):

Immunzytochemische und histopathologische Untersuchungen zur biologischen Variabilität des Virus der Bornaschen Krankheit an intrazerebral infizierten Lewis-Ratten. Gießen, Univ., Diss., 1997.

HERDEN C. (2009):

Untersuchungen zu Pathogenese, Neurotropismus und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit [Elektronische Ressource]. Zugl.: Hannover, Tierärztliche Hochsch., Habil.-Schr., 2009. VVB Laufersweiler, 1. Aufl., Giessen.

HERDEN C., HERZOG S., RICHT J. A., NESSELER A., CHRIST M., FAILING K., FRESE K. (2000):

Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain Pathol.* 10: 39–48.

HERDEN C., HERZOG S., WEHNER T., ZINK C., RICHT J. A., FRESE K. (1999):

Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. In: Wernery U., Wade J., Mumford J. A. (Hrsg.), *Equine Infectious Disease VIII*, 286–290.

HERDEN C., SCHLUESENER H. J., RICHT J. A. (2005):

Expression of allograft inflammatory factor-1 and haeme oxygenase-1 in brains of rats infected with the neurotropic Borna disease virus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 31: 512–521.

HERRMANN H., AEBI U. (2000):

Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 79–90.

HERZOG S., FRESE K., ROTT R. (1991):

Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 3): 535–540.

HERZOG S., KOMPTER C., FRESE K., ROTT R. (1984):

Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med. Microbiol. Immunol.* 173: 171–177.

HERZOG S., ROTT R. (1980):

Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Med. Microbiol. Immunol.* 168: 153–158.

HILBE M., HERRSCHE R., KOLODZIEJEK J., NOWOTNY N., ZLINSZKY K., EHRENSPERGER F. (2006):

Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerging Infect. Dis.* 12: 675–677.

HIRANO N., KAO M., LUDWIG H. (1983):

Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J. Gen. Virol.* 64 (Pt 7): 1521–1530.

HOFER M. J., SCHINDLER A. R., EHRENSPERGER F., STAEHELI P., PAGENSTECHER A. (2006):

Absence of Borna disease virus in the CNS of epilepsy patients. *J. Clin. Virol.* 36: 84–85.

HOFFMANN B., TAPPE D., HOEPER D., HERDEN C., BOLDT A., MAWRIN C., NIEDERSTRASSER O., MUELLER T., JENCKEL M., VAN DER GRINTEN E., LUTTER C., ABEDNDROTH B., TEIFKE J.P., CADAR D., SCHMIDT-CHANASIT J., ULRICH R.G., BEER M. (2015):

A variegated squirrel Bornavirus Associated with Fatal Human Encephalitis. *N Engl J Med.* 2015 Jul 9; 373(2):154-162.

HONDA T., HORIE M., DAITO T., IKUTA K., TOMONAGA K. (2009):

Molecular chaperone BiP interacts with Borna disease virus glycoprotein at the cell surface. *J. Virol.* 83: 12622–12625.

HONKAVUORI K. S., SHIVAPRASAD H. L., WILLIAMS B. L., QUAN P. L., HORNIG M., STREET C., PALACIOS G., HUTCHISON S. K., FRANCA M., EGHOLM M., BRIESE T., LIPKIN W. I. (2008):

Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging Infect. Dis.* 14: 1883–1886.

HORIE M., HONDA T., SUZUKI Y., KOBAYASHI Y., DAITO T., OSHIDA T., IKUTA K., JERN P., GOJOBORI T., COFFIN J. M., TOMONAGA K. (2010):

Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. *Nature* 463: 84–87.

HORNIG M., BRIESE T., LICINIO J., KHABBAZ R. F., ALTSHULER L. L., POTKIN S. G., SCHWEMMLE M., SIEMETZKI U., MINTZ J., HONKAVUORI K., KRAEMER H. C., EGAN M. F., WHYBROW P. C., BUNNEY W. E., LIPKIN W. I. (2012):

Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol. Psychiatry* 17: 486–493.

HORNIG M., BRIESE T., LIPKIN W. I. (2001):

Bornavirus tropism and targeted pathogenesis: virus-host interactions in a neurodevelopmental model. *Adv. Virus Res.* 56: 557–582.

HORNIG M.; BRIESE T.; LICINIO J.; KHABBAZ R. F.; ALTSHULER L. L.; POTKIN S. G.; SCHWEMMLE M.; SIEMETZKI U.; MINTZ J.; HONKAVUORI K.; KRAEMER H. C.; EGAN M. F.; WHYBROW P. C.; BUNNEY W. E.; LIPKIN W. I. (2012):

Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol. Psychiatry.* 17: 486–493.

HORNIG M., WEISSENBÖCK H., HORSCROFT N., LIPKIN W. I. (1999):

An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 12102–12107.

IBRAHIM M. S., WATANABE M., PALACIOS J. A., 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.

IMHOFF H., VON MESSLING V., HERRLER G., HAAS L. (2007)

Canine distemper virus infection requires cholesterol in the viral envelope. *J. Virol.* 81(8): 4158-4165

IZIDORO M. A., GOUVEA I. E., SANTOS J. A. N., ASSIS D. M., OLIVEIRA V., JUDICE W. A. S., JULIANO M. A., LINDBERG I., JULIANO L. (2009):

A study of human furin specificity using synthetic peptides derived from natural substrates, and effects of potassium ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 487: 105–114.

JABS R., SEIFERT G., STEINHÄUSER C. (2008):

Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain. *Epilepsia* 49 Suppl 2: 3–12.

JACOBSEN B., ALGERMISSEN D., SCHAUDIEN D., VENNER M., HERZOG S., WENTZ E., HEWICKER-TRAUTWEIN M., BAUMGÄRTNER W., HERDEN C. (2010):

Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *J. Comp. Pathol.* 143: 203–208.

JEHLE C., LIPKIN W. I., STAEHELI P., MARION R. M., SCHWEMMLE M. (2000):

Authentic Borna disease virus transcripts are spliced less efficiently than cDNA-derived viral RNAs. *J. Gen. Virol.* 81: 1947–1954.

JOEST E.K., DEGEN K. (1909)

Über eigentümliche intranukleäre Einschlüsse bei der enzootischen Gehirn- und Rückenmarksentzündung. *Zeitschr Inf Krkh Haustiere* 6: 348-356

JOEST E.K., DEGEN K. (1911)

Untersuchung über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirnrückenmarksentzündung (BK) des Pferdes. *Zeitschr Inf Krkh Haustiere* 9: 1-98

JORDAN I., BRIESE T., AVERETT D. R., LIPKIN W. I. (1999):

Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin. *J. Virol.* 73: 7903–7906.

JORDAN I., LIPKIN W. I. (2001):

Borna disease virus. *Rev. Med. Virol.* 11: 37–57.

JORDAN P. M., CAIN L. D., WU P. (2008):

Astrocytes enhance long-term survival of cholinergic neurons differentiated from human fetal neural stem cells. *J. Neurosci. Res.* 86: 35–47.

KIEFER M. C., TUCKER J. E., JOH R., LANDSBERG K. E., SALTMAN D., BARR P. J. (1991):

Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* 10: 757–769.

- KIERMAYER S., KRAUS I., RICHT J. A., GARTEN W., EICKMANN M. (2002):**
 Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus. *FEBS Lett.* 531: 255–258.
- KIMELBERG H. K. (1983):**
 Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. *Cell. Mol. Neurobiol.* 3: 1–16.
- KIMELBERG H. K. (2010):**
 Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist* 16: 79–106.
- KIM Y. K., KIM S. H., CHOI S. H., KO Y. H., KIM L., LEE M. S., SUH K. Y., KWAK D. I., SONG K. J., LEE Y. J., YANAGIHARA R., SONG J. W. (1999):**
 Failure to demonstrate Borna disease virus genome in peripheral blood mononuclear cells from psychiatric patients in Korea. *J. Neurovirol.* 5: 196–199.
- KISHI M., NAKAYA T., NAKAMURA Y., KAKINUMA M., TAKAHASHI T. A., SEKIGUCHI S., UCHIKAWA M., TADOKORO K., IKEDA K., IKUTA K. (1995a):**
 Prevalence of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from blood donors. *Med. Microbiol. Immunol.* 184: 135–138.
- KISHI M., NAKAYA T., NAKAMURA Y., ZHONG Q., IKEDA K., SENJO M., KAKINUMA M., KATO S., IKUTA K. (1995b):**
 Demonstration of human Borna disease virus RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Lett.* 364: 293–297.
- KISTLER A. L., GANCZ A., CLUBB S., SKEWES-COX P., FISCHER K., SORBER K., CHIU C. Y., LUBLIN A., MECHANI S., FARNOUSHI Y., GRENINGER A., WEN C. C., KARLENE S. B., GANEM D., DERISI J. L. (2008):**
 Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virology* 375: 88–95.
- KLICHE S., BRIESE T., HENSCHEN A. H., STITZ L., LIPKIN W. I. (1994):**
 Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J. Virol.* 68: 6918–6923.
- KNIEPE D.M., HOWLEY P.M. (Hrsg.) (2013):**
 Fields virology. Sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD
- 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 P. K., IKUTA K., KAKINUMA M., KISHI M. (1998):**
 Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 243: 188–197.
- 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.
- KOLODZIEJEK 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.

- KORZHEVSKII D. E., LENTSMAN M. V., GILYAROV A. V., KIRIK O. V., VLASOV T. D. (2008):**
 Induction of nestin synthesis in rat brain cells by ischemic damage. *Neurosci. Behav. Physiol.* 38: 139–143.
- KÖSTER-PATZLAFF C., HOSSEINI S. M., REUSS B. (2007):**
 Persistent Borna Disease Virus infection changes expression and function of astroglial gap junctions in vivo and in vitro. *Brain Res.* 1184: 316–332.
- KRAMER K., SCHAUDIEN D., EISEL U. L. M., HERZOG S., RICHT J. A., BAUMGÄRTNER W., HERDEN C. (2012):**
 TNF-overexpression in Borna disease virus-infected mouse brains triggers inflammatory reaction and epileptic seizures. *PLoS ONE* 7: e41476.
- 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.
- KRAUS I., EICKMANN M., KIEMAYER S., SCHEFFCZIK H., FLUESS M., RICHT J. A., GARTEN W. (2001):**
 Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J. Virol.* 75: 12098–12104.
- KREMSKY I., MORGAN T. E., HOU X., LI L., FINCH C. E. (2012):**
 Age-changes in gene expression in primary mixed glia cultures from young vs. old rat cerebral cortex are modified by interactions with neurons. *Brain Behav. Immun.* 26: 797–802.
- KRUDEWIG C. (2006):**
 Einfluss einer Staupevirusinfektion auf die In-vitro-Expression von Matrix-Metalloproteinasen in Gehirnzellpopulationen adulter Hunde [Elektronische Ressource]. Zugl.: Hannover, Tierärztliche Hochsch., Diss., 2006. DVG-Service, 1. Aufl., Gießen.
- KUHN J.H., DÜRRWALD R., BÀO Y., BRIESE T., CARBONE C., CLAWSON A.N., DERISI J.L., GARTEN W., JAHRLING P.B., KOLODZIEJEK J., RUBBENSTROTH D., SCHWEMMLE M., STENGLEIN M., TOMONAGA K., WEISENBÖCK H., NOWOTNY N. (2015)**
 Taxonomic reorganization of the family *Bornaviridae*. *Arch Virol.* 2015 Feb;160(2):621-32.
- KYHSE-ANDERSEN J. (1984):**
 Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods:* 203–209.
- DE LA TORRE J. C. DE (1994):**
 Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J. Virol.* 68: 7669–7675.
- DE LA TORRE J. C. DE (2002a):**
 Bornavirus and the brain. *J. Infect. Dis.* 186 Suppl 2: S241-7.
- DE LA TORRE J. C. DE (2002b):**
 Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Front. Biosci.* 7: d569-79.
- DE LA TORRE J. C. DE (2006):**
 Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease virus. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 777–783.

- DE LA TORRE J. C. DE, BODE L., DÜRRWALD R., CUBITT B., LUDWIG H. (1996):**
Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus Res.* 44: 33–44.
- LABITZKE T. (2010):**
Vertiefungsmodulbericht in Molecular and Cellular Biology, Marburg.
- LABITZKE T. (2011):**
Ausbreitung und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit in primären Zellkulturen des Zentralen Nervensystems. Masterarbeit in Molecular and Cellular Biology, Marburg.
- LANCASTER K., DIETZ D. M., MORAN T. H., PLETNIKOV M. V. (2007):**
Abnormal social behaviors in young and adult rats neonatally infected with Borna disease virus. *Behav. Brain Res.* 176: 141–148.
- LANGAN T. J., PLUNKETT R. J., ASADA H., KELLY K., KASELOO P. (1995):**
Long-term production of neurotrophic factors by astrocyte cultures from hemiparkinsonian rat brain. *Glia* 14: 174–184.
- LANGAN T. J., SLATER M. C. (1991):**
Quiescent astroglia in long-term primary cultures re-enter the cell cycle and require a non-sterol isoprenoid in late G1. *Brain Res.* 548: 9–17.
- LANGE S. C., BAK L. K., WAAGEPETERSEN H. S., SCHOUSBOE A., NOREBERG M. D. (2012):**
Primary Cultures of Astrocytes: Their Value in Understanding Astrocytes in Health and Disease. *Neurochem. Res.*
- LEAMAN D.W. (1998):**
Mechanisms of interferon action. *Prog Mol Subcell Biol* 20: 101-142
- LEE B.-J., MATSUNAGA H., IKUTA K., TOMONAGA K. (2008):**
Ribavirin inhibits Borna disease virus proliferation and fatal neurological diseases in neonatally infected gerbils. *Antiviral Res.* 80: 380–384.
- LEND AHL U., ZIMMERMAN L. B., MCKAY R. D. (1990):**
CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585–595.
- LEWIS A. J., WHITTON J. L., HATALSKI C. G., WEISSENBOCK H., LIPKIN W. I. (1999):**
Effect of immune priming on Borna disease. *J. Virol.* 73: 2541–2546.
- LIERZ M., HAFEZ H. M., HONKAVUORI K. S., GRUBER A. D., OLIAS P., ABDELWHAB E. M., KOHLS A., LIPKIN W. I., BRIESE T., HAUCK R. (2009):**
Anatomical distribution of avian bornavirus in parrots, its occurrence in clinically healthy birds and ABV-antibody detection. *Avian Pathol.* 38: 491–496.
- LILJEROOS L., BUTCHER S.B. (2013):**
Matrix proteins as centralized organizers of negative-sense RNA virions. *Frontiers in Bioscience* 18, 696-715
- LINDSAY R. M., BARBER P. C., SHERWOOD M. R., ZIMMER J., RAISMAN G. (1982):**
Astrocyte cultures from adult rat brain. Derivation, characterization and neurotrophic properties of pure astroglial cells from corpus callosum. *Brain Res.* 243: 329–343.
- LIPKIN W. I., HORNIG M., BRIESE T. (2001):**
Borna disease virus and neuropsychiatric disease--a reappraisal. *Trends Microbiol.* 9: 295–298.

LIPKIN W. I., TRAVIS G. H., CARBONE K. M., WILSON M. C. (1990):

Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 4184–4188.

LOVATT D., SONNEWALD U., WAAGEPETERSEN H. S., SCHOUSBOE A., HE W., LIN J. H.-C., HAN X., TAKANO T., WANG S., SIM F. J., GOLDMAN S. A., NEDERGAARD M. (2007):

The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J. Neurosci.* 27: 12255–12266.

LUDWIG H., BODE L., GOSZTONYI G. (1988):

Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog. Med. Virol.* 35: 107–151.

MACLACHLAN N.J., FENNER F. (Hrsg.) (Acad. Press, 2011):

Fenner's veterinary virology. Elsevier, Amsterdam [u.a.].

MALIK T. H., KISHI M., LAI P. K. (2000):

Characterization of the P protein-binding domain on the 10-kilodalton protein of Borna disease virus. *J. Virol.* 74: 3413–3417.

MANCIOCCO A., CHIAROTTI F., VITALE A., CALAMANDREI G., LAVIOLA G., ALLEVA E. (2009):

The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: the case of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 18–32.

MANSOUR H., CHAMBERLAIN C. G., WEIBLE M. W., HUGHES S., CHU Y., CHAN-LING T. (2008):

Ageing-related changes in astrocytes in the rat retina: imbalance between cell proliferation and cell death reduces astrocyte availability. *Aging Cell* 7: 526–540.

MANZANO J., BERNAL J., MORTE B. (2007):

Influence of thyroid hormones on maturation of rat cerebellar astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* 25: 171–179.

MARÍN-PADILLA M. (1995):

Prenatal development of fibrous (white matter), protoplasmic (gray matter), and layer I astrocytes in the human cerebral cortex: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 357: 554–572.

MARTIN K., HELENIUS A. (1991):

Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* 67: 117–130.

MATTHIAS K., KIRCHHOFF F., SEIFERT G., HÜTTMANN K., MATYASH M., KETTENMANN H., STEINHÄUSER C. (2003):

Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 23: 1750–1758.

MAYER D., BAGINSKY S., SCHWEMMLE M. (2005):

Isolation of viral ribonucleoprotein complexes from infected cells by tandem affinity purification. *Proteomics* 5: 4483–4487.

MCCARTHY K. D., VELLIS J. DE (1978):

Alpha-adrenergic receptor modulation of beta-adrenergic, adenosine and prostaglandin E1 increased adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in primary cultures of glia. *J. Cyclic Nucleotide Res* 4: 15–26.

MCCARTHY K. D., VELLIS J. DE (1980):

Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 85: 890–902.

METZLER A., EHRENSPERGER F., WYLER R. (1978):

Natürliche Bornavirus-Infektion bei Kaninchen. *Zentralblatt Veterinärmedizin Reihe B* 25: 161–164.

MILLER R. H., RAFF M. C. (1984):

Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J. Neurosci.* 4: 585–592.

MITTLER E., KOLESNIKOVA L., HERWIG A., DOLNIK O., BECKER S. (2013)

Assembly of the marburg virus envelope. *Cellular Microbiology* 15(2), 270–284

MIZUTANI T., INAGAKI H., ARAKI K., KARIWA H., ARIKAWA J., TAKASHIMA I. (1998):

Inhibition of Borna disease virus replication by ribavirin in persistently infected cells. *Arch. Virol.* 143: 2039–2044.

Modrow S (Hrsg.) (2010):

Molekulare Virologie. Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg.

MONDINO A., GIORDANO S., COMOGLIO P. M. (1991):

Defective posttranslational processing activates the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor). *Mol. Cell. Biol.* 11: 6084–6092.

MOORE C. (2009):

Introduction to Western Blotting. MorphoSys UK Ltd, Kidlington, Oxford, UK

MORALES J. A., HERZOG S., KOMPTER C., FRESE K., ROTT R. (1988):

Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol.* 177: 51–68.

MORIKAWA Y., BARSOV E., JONES I. (1993):

Legitimate and illegitimate cleavage of human immunodeficiency virus glycoproteins by furin. *J. Virol.* 67: 3601–3604.

MÜLLER-DOBLIES D., BAUMANN S., GROB P., HÜLSMEIER A., MÜLLER-DOBLIES U., BRÜNKER P., EHRENSPERGER F., STAEHEL P., ACKERMANN M., SUTER M. (2004):

The humoral and cellular immune response of sheep against Borna disease virus in endemic and non-endemic areas. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 146: 159–172.

MURPHY M. F., LAZZARINI R. A. (1974):

Synthesis of viral mRNA and polyadenylate by a ribonucleoprotein complex from extracts of VSV-infected cells. *Cell* 3: 77–84.

NAKAMURA Y., TAKAHASHI H., SHOYA Y., NAKAYA T., WATANABE M., TOMONAGA K., IWAHASHI K., AMENO K., MOMIYAMA N., TANIYAMA H., SATA T., KURATA T., DE LA TORRE J. C. DE, IKUTA K. (2000):

Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J. Virol.* 74: 4601–4611.

NAKAYA T., TAKAHASHI H., NAKAMURA Y., ASAH I., TOBIUME M., KURATSUNE H., KITANI T., YAMANISHI K., IKUTA K. (1996):

Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from Japanese patients with chronic fatigue syndrome. *FEBS Lett.* 378: 145–149.

- 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 ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J. Infect. Dis.* 148: 305–315.
- NAVARRA M., BALTRONS M. A., SARDÓN T., PEDRAZA C. E., GARCÍA A. (2004):**
HIV-1 coat protein gp120 decreases NO-dependent cyclic GMP accumulation in rat brain astroglia by increasing cyclic GMP phosphodiesterase activity. *Neurochem. Int.* 45: 937–946.
- NEUMANN P., LIEBER D., MEYER S., DAUTEL P., KERTH A., KRAUS I., GARTEN W., STUBBS M. T. (2009):**
Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 3710–3715.
- NOBACH D., BOURG M., HERZOG S., LANGE-HERBST H., ENCARNÇÃO J.A., EICKMANN M., HERDEN C. (2015):**
Shedding of infectious Borna disease virus-1 in living bicolored white-toothed shrews. *PLoS One* 2015 Aug 27; 10(8):e0137018
- NOBLE M., MURRAY K. (1984):**
Purified astrocytes promote the in vitro division of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J.* 3: 2243–2247.
- NORTON W. T., FAROOQ M. (1993):**
Differentiation of glial precursor cells from developing rat brain in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 72: 193–202.
- NOWOTNY N., KOLODZIEJEK J. (2000):**
Human bornaviruses and laboratory strains. *Lancet* 355: 1462–1463.
- NOWOTNY N., KOLODZIEJEK J., JEHLE C. O., SUCHY A., STAEHELI P., SCHWEMMLE M. (2000):**
Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J. Virol.* 74: 5655–5658.
- OGAWA H., SANADA Y., SANADA N., KUDO M., TUCHIYA K., KODAMA T., UETSUKA K. (2011):**
Proventricular dilatation disease associated with avian bornavirus infection in a Citron-crested Cockatoo that was born and hand-reared in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 837–840.
- OHTAKI N., KAMITANI W., WATANABE Y., HAYASHI Y., YANAI H., IKUTA K., TOMONAGA K. (2007):**
Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus. *J. Virol.* 81: 5940–5948.
- OLDACH D., ZINK M. C., PYPHER J. M., HERZOG S., ROTT R., NARAYAN O., CLEMENTS J. E. (1995):**
Induction of protection against Borna disease by inoculation with high-dose-attenuated Borna disease virus. *Virology* 206: 426–434.

OLDSTONE M. B. (1991):

Molecular anatomy of viral persistence. *J. Virol.* 65: 6381–6386.

OVANESOV M. V., AYHAN Y., WOLBERT C., MOLDOVAN K., SAUDER C., PLETNIKOV M. V. (2008):

Astrocytes play a key role in activation of Mikroglia by persistent Borna disease virus infection. *J Neuroinflammation* 5: 50.

OVANESOV M. V., SAUDER C., RUBIN S. A., RICHT J., NATH A., CARBONE K. M., PLETNIKOV M. V. (2006):

Activation of Mikroglia by borna disease virus infection: in vitro study. *J. Virol.* 80: 12141–12148.

OZDEN S., LUCAS-HOURANI M., CECCALDI P.-E., BASAK A., VALENTINE M., BENJANNET S., HAMELIN J., JACOB Y., MAMCHAOU K., MOULY V., DESPRÈS P., GESSAIN A., BUTLER-BROWNE G., CHRÉTIEN M., TANGY F., VIDALAIN P.-O., SEIDAH N. G. (2008):

Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 283: 21899–21908.

PARPURA V., HENEKA M. T., MONTANA V., OLIET S. H. R., SCHOUSBOE A., HAYDON P. G., STOUT R. F., SPRAY D. C., REICHENBACH A., PANNICKE T., PEKNY M., PEKNA M., ZOREC R., VERKHRATSKY A. (2012):

Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 121: 4–27.

PATTNAIK A. K., BALL L. A., LEGRONE A. W., WERTZ G. W. (1992):

Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell* 69: 1011–1020.

PAULI G., LUDWIG H. (1985):

Increase of virus yields and releases of Borna disease virus from persistently infected cells. *Virus Res.* 2: 29–33.

PAYNE S., COVALEDA L., JIANHUA G., SWAFFORD S., BAROCH J., FERRO P. J., LUPIANI B., HEATLEY J., TIZARD I. (2011):

Detection and characterization of a distinct bornavirus lineage from healthy Canada geese (*Branta canadensis*). *J. Virol.* 85: 12053–12056.

PAYNE S., DELNATTE P., GUO J., HEATLEY J., TIZARD I., SMITH D.A. (2012)

Birds and bornaviruses. *Animal Health Research Reviews* 13(2); 145-156

PEKNY M., NILSSON M. (2005):

Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50: 427–434.

PENG G., ZHANG F., ZHANG Q., WU K., ZHU F., WU J. (2007):

Borna disease virus P protein inhibits nitric oxide synthase gene expression in astrocytes. *Virology* 366: 446–452.

PEREZ M., DE LA TORRE J. C. DE (2005):

Identification of the Borna disease virus (BDV) proteins required for the formation of BDV-like particles. *J. Gen. Virol.* 86: 1891–1895.

PEREZ M., SANCHEZ A., CUBITT B., ROSARIO D., DE LA TORRE J. C. DE (2003):

A reverse genetics system for Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 84: 3099–3104.

- PEREZ M., WATANABE M., WHITT M. A., DE LA TORRE J. C. DE (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.
- PERTUSA M., GARCÍA-MATAS S., RODRÍGUEZ-FARRÉ E., SANFELIU C., CRISTÒFOL R. (2007):**
Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J. Neurochem.* 101: 794–805.
- PFAFFL M. W. (2001):**
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29: e45.
- PIXLEY S. K., VELLIS J. DE (1984):**
Transition between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Brain Res.* 317: 201–209.
- PLANZ O., PLESCHKA S., LUDWIG S. (2001):**
MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *J. Virol.* 75: 4871–4877.
- PLANZ O., RZIHA H.-J., STITZ L. (2003):**
Genetic relationship of Borna disease virus isolates. *Virus Genes* 26: 25–30.
- PLESCHKA S., STAEHELI P., KOLODZIEJEK J., RICHT J. A., 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 M. V., RUBIN S. A., SCHWARTZ G. J., MORAN T. H., SOBOTKA T. J., CARBONE K. M. (1999):**
Persistent neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats. *Physiol. Behav.* 66: 823–831.
- PLETNIKOV M. V., RUBIN S. A., VOGEL M. W., MORAN T. H., CARBONE K. M. (2002):**
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.
- POENISCH M., WILLE S., STAEHELI P., SCHNEIDER U. (2008):**
Polymerase read-through at the first transcription termination site contributes to regulation of borna disease virus gene expression. *J. Virol.* 82: 9537–9545.
- POROMBKA D. (2006):**
Untersuchungen zur Transkription, Replikation und Persistenz des Virus der Bornaschen Krankheit im Gehirn von experimentell infizierten Lewis Ratten mittels real-time RT-PCR. Tierärztl. Hochsch., Institut für Pathologie, Diss.--Hannover, 2006. DVG-Service; Tierärztl. Hochsch, 1. Aufl., Gießen, Hannover.
- POROMBKA D., BAUMGÄRTNER W., EICKMANN M., HERDEN C. (2008a):**
Implications for a regulated replication of Borna disease virus in brains of experimentally infected Lewis rats. *Virus Genes* 36: 415–420.

POROMBKA D., BAUMGÄRTNER W., HERDEN C. (2008b):

A rapid method for gene expression analysis of Borna disease virus in neurons and astrocytes using laser microdissection and real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 148: 58–65.

PRIESTNALL S. L., SCHÖNIGER S., IVENS P. A. S., EICKMANN M., BRACHTHÄUSER L., KEHR K., TUPPER C., PIERCY R. J., MENZIES-GOW N. J., HERDEN C. (2011):

Borna disease virus infection of a horse in Great Britain. *Vet. Rec.* 168: 380b.

PRINGLE C. R. (1996):

Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch. Virol.* 141: 2251–2256.

PUORGER M. E., HILBE M., MÜLLER J.-P., KOLODZIEJEK J., NOWOTNY N., ZLINSZKY K., EHRENSPERGER F. (2010):

Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet. Pathol.* 47: 236–244.

PUSCHMANN T. B., DIXON K. J., TURNLEY A. M. (2010):

Species differences in reactivity of mouse and rat astrocytes in vitro. *Neurosignals* 18: 152–163.

PYPER J. M., CLEMENTS J. E., ZINK M. C. (1998):

The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J. Virol.* 72: 7697–7702.

PYPER J. M., GARTNER A. E. (1997):

Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of Borna disease virus. *J. Virol.* 71: 5133–5139.

REMACLE A. G., SHIRYAEV S. A., OH E.-S., CIEPLAK P., SRINIVASAN A., WEI G., LIDDINGTON R. C., RATNIKOV B. I., PARENT A., DESJARDINS R., DAY R., SMITH J. W., LEBL M., STRONGIN A. Y. (2008):

Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *J. Biol. Chem.* 283: 20897–20906.

REUSS B., DERMIETZEL R., UNSICKER K. (1998):

Fibroblast growth factor 2 (FGF-2) differentially regulates connexin (cx) 43 expression and function in astroglial cells from distinct brain regions. *Glia* 22: 19–30.

RICHT J. A., ALEXANDER R. C., HERZOG S., HOOPER D. C., KEAN R., SPITSIN S., BECHTER K., SCHÜTTLER R., FELDMANN H., HEISKE A., FU Z. F., DIETZSCHOLD B., ROTT R., KOPROWSKI H. (1997a):

Failure to detect Borna disease virus infection in peripheral blood leukocytes from humans with psychiatric disorders. *J. Neurovirol.* 3: 174–178.

RICHT J. A., FÜRBRINGER 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 J. A., GRABNER A., HERZOG S. (2000):

Borna disease in horses. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 16: 579-95, xi.

RICHT J. A., 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.* 182: 293–304.

RICHT J. A., PFEUFFER I., CHRIST M., FRESE K., BECHTER K., HERZOG S. (1997b):

Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging Infect. Dis.* 3: 343–352.

RICHT J. A., ROTT R. (2001):

Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet. J.* 161: 24–40.

RICHT J. A., SCHMEEL A., FRESE K., CARBONE K. M., NARAYAN O., ROTT R. (1994):

Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J. Exp. Med.* 179: 1467–1473.

RICHT J. A., STITZ L. (1992):

Borna disease virus-infected astrocytes function in vitro as antigen-presenting and target cells for virus-specific CD4-bearing lymphocytes. *Arch. Virol.* 124: 95–109.

RICHT J. A., VANDE WOUDE S., ZINK M. C., NARAYAN O., CLEMENTS J. E. (1991):

Analysis of Borna disease virus-specific RNAs in infected cells and tissues. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 9): 2251–2255.

RICHT J. A., VANDEWOUDE S., ZINK M. C., CLEMENTS J. E., 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.

RIMA B. K., DUPREX W. P. (2005):

Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res.* 111: 132–147.

RODRIGUES J. P., RODE M., GATFIELD D., BLENCOWE B. J., CARMO-FONSECA M., IZAURRALDE E. (2001):

REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 1030–1035.

ROEBROEK A. J., UMANS L., PAULI I. G., ROBERTSON E. J., VAN LEUVEN F., VAN DE VEN W. J., CONSTAM D. B. (1998):

Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125: 4863–4876.

ROSARIO D., PEREZ M., DE LA TORRE J. C. DE (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.

ROTHERMUNDT M., PETERS M., PREHN J. H. M., AROLT V. (2003):

S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60: 614–632.

ROTT R., BECHT H. (1995):

Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190: 17–30.

ROTT R., HERZOG S., BECHTER K., FRESE K. (1991):

Borna disease, a possible hazard for man? *Arch. Virol.* 118: 143–149.

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.

ROUILLÉ Y., MARTIN S., STEINER D. F. (1995):

Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J. Biol. Chem.* 270: 26488–26496.

ROWITCH D. H., KRIEGSTEIN A. R. (2010):

Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468: 214–222.

RUBIN S. A., SIERRA-HONIGMANN A. M., LEDERMAN H. M., WALTRIP R. W., EIDEN J. J., CARBONE K. M. (1995):

Hematologic consequences of Borna disease virus infection of rat bone marrow and thymus stromal cells. *Blood* 85: 2762–2769.

RUBIN S. A., WALTRIP R. W., BAUTISTA J. R., CARBONE K. M. (1993):

Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J. Virol.* 67: 548–552.

SANDRI-GOLDIN R. M. (2004):

Viral regulation of mRNA export. *J. Virol.* 78: 4389–4396.

SAUDER C., HERPFER I., HÄSSLER 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., MÜLLER A., CUBITT B., MAYER J., STEINMETZ J., TRABERT W., ZIEGLER B., WANKE K., MUELLER-LANTZSCH N., DE LA TORRE J. C. DE, GRÄSSER F. A. (1996):

Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J. Virol.* 70: 7713–7724.

SAUDER C., STAEHELI P. (2003):

Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J. Virol.* 77: 12886–12890.

SCHÄFER M. K., DAY R., CULLINAN W. E., CHRÉTIEN M., SEIDAH N. G., WATSON S. J. (1993):

Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: a comparative in situ hybridization analysis. *J. Neurosci.* 13: 1258–1279.

SCHMALENBACH C., MÜLLER H. W. (1993):

Astroglia-neuron interactions that promote long-term neuronal survival. *J. Chem. Neuroanat.* 6: 229–237.

SCHMID S., METZ P., PRAT C. M. A., GONZALEZ-DUNIA D., SCHWEMMLE M. (2010):

Protein kinase C-dependent phosphorylation of Borna disease virus P protein is required for efficient viral spread. *Arch. Virol.* 155: 789–793.

SCHMITZ S. (2011):

Der Experimentator: Zellkultur. Spektrum, Akad. Verl, 3. Aufl., Heidelberg.

SCHNEEMANN A., SCHNEIDER P. A., KIM S., LIPKIN W. I. (1994):

Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* 68: 6514–6522.

SCHNEEMANN A., SCHNEIDER P. A., LAMB R. A., LIPKIN W. I. (1995):

The remarkable coding strategy of borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* 210: 1–8.

SCHNEIDER P. A., BRIESE T., ZIMMERMANN W., LUDWIG H., LIPKIN W. I. (1994a):

Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J. Virol.* 68: 63–68.

SCHNEIDER P. A., HATALSKI C. G., LEWIS A. J., LIPKIN W. I. (1997a):

Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein. *J. Virol.* 71: 331–336.

SCHNEIDER P. A., KIM R., LIPKIN W. I. (1997b):

Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation. *J. Virol.* 71: 5614–5619.

SCHNEIDER P. A., SCHNEEMANN A., LIPKIN W. I. (1994b):

RNA splicing in Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J. Virol.* 68: 5007–5012.

SCHNEIDER U. (2005):

Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus. *Virus Res.* 111: 148–160.

SCHNEIDER U., BLECHSCHMIDT K., SCHWEMMLE M., STAEHELI P. (2004a):

Overlap of interaction domains indicates a central role of the P protein in assembly and regulation of the Borna disease virus polymerase complex. *J. Biol. Chem.* 279: 55290–55296.

SCHNEIDER U., MARTIN A., SCHWEMMLE M., STAEHELI P. (2007):

Genome trimming by Borna disease viruses: viral replication control or escape from cellular surveillance? *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 1038–1042.

SCHNEIDER U., NAEGELE M., STAEHELI P. (2004b):

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.

SCHNITZER J., FRANKE W. W., SCHACHNER M. (1981):

Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J. Cell Biol.* 90: 435–447.

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.

SCHWARTZ J. P., WILSON D. J. (1992):

Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum, and striatum. *Glia* 5: 75–80.

SCHWEMMLE M., BILLICH C. (2004):

The use of peptide arrays for the characterization of monospecific antibody repertoires from polyclonal sera of psychiatric patients suspected of infection by Borna Disease Virus. *Mol. Divers.* 8: 247–250.

SCHWEMMLE M., DE B., SHI L., BANERJEE A., LIPKIN W. I. (1997):

Borna disease virus P-protein is phosphorylated by protein kinase Cepsilon and casein kinase II. *J. Biol. Chem.* 272: 21818–21823.

SCHWEMMLE M., HEIMRICH B. (2011):

Viral interference with neuronal integrity: what can we learn from the Borna disease virus? *Cell Tissue Res.* 344: 13–16.

SCHWEMMLE M., JEHLE C., FORMELLA S., STAEHELI P. (1999):

Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* 354: 1973–1974.

SCHWEMMLE M., SALVATORE M., SHI L., RICHT J., LEE C. H., LIPKIN W. I. (1998):

Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J. Biol. Chem.* 273: 9007–9012.

SEEHUSEN F., ORLANDO E.A., WEWETZER K., BAUMGÄRTNER W. (2007)

Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelinating lesions? *Acta Neuropathol.* 114: 597–608

SEIDAH N. G., CHRÉTIEN M. (1999):

Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 848: 45–62.

SEIDAH N. G., HAMELIN J., MAMARBACHI M., DONG W., TARDOS H., MBIKAY M., CHRETIEN M., DAY R. (1996):

cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 3388–3393.

SEIFERT G., SCHILLING K., STEINHÄUSER C. (2006):

Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat. Rev. Neurosci.* 7: 194–206.

SERGENT-TANGUY S., MICHEL D. C., NEVEU I., NAVEILHAN P. (2006):

Long-lasting coexpression of nestin and glial fibrillary acidic protein in primary cultures of astroglial cells with a major participation of nestin(+)/GFAP(-) cells in cell proliferation. *J. Neurosci. Res.* 83: 1515–1524.

SHAPIRO J., SCIAKY N., LEE J., BOSSHART H., ANGELETTI R. H., BONIFACINO J. S. (1997):

Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 3–12.

SHERER N. M., MOTHE W. (2008):

Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* 18: 414–420.

- 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.
- SIDORYK-WEGRZYNOWICZ M., WEGRZYNOWICZ M., LEE E., BOWMAN A. B., ASCHNER M. (2011):**
Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol* 39: 115–123.
- SILVA G. A., THERIAULT E., MILLS L. R., PENNEFATHER P. S., FEENEY C. J. (1999):**
Group I and II metabotropic glutamate receptor expression in cultured rat spinal cord astrocytes. *Neurosci. Lett.* 263: 117–120.
- SMITH A. E., HELENIUS A. (2004):**
How viruses enter animal cells. *Science* 304: 237–242.
- SOFRONIEW M. V., VINTERS H. V. (2010):**
Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119: 7–35.
- SOLBRIG M. V. (2010):**
Animal models of CNS viral disease: examples from borna disease virus models. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010: 709791.
- SOLBRIG M. V., SCHLABERG R., BRIESE T., HORSCROFT N., LIPKIN W. I. (2002):**
Neuroprotection and reduced proliferation of Mikroglia in ribavirin-treated bornavirus-infected rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 2287–2291.
- STAEHELI P. (2002):**
Bornaviruses. *Virus Res.* 82: 55–59.
- STAEHELI P., SAUDER C., HAUSMANN J., EHRENSPERGER F., SCHWEMMLE M. (2000):**
Epidemiology of Borna disease virus. *J. Gen. Virol.* 81: 2123–2135.
- STAEHELI P., SENTANDREU M., PAGENSTECHE A., HAUSMANN J. (2001):**
Alpha/beta interferon promotes transcription and inhibits replication of borna disease virus in persistently infected cells. *J. Virol.* 75: 8216–8223.
- STENGLEIN M.D., LEAVITT E., ABRAMOVITCH M., McGUIRE J.A., DERISI J.L. (2014)**
Complete genome sequence of a reptile bornavirus recovered from a wild caught Elapsoidea loveridgei. *Genome Announce* 2: e00779-14
- STIENEKE-GRÖBER A., VEY M., ANGLIKER H., SHAW E., THOMAS G., ROBERTS C., KLENK H. D., GARTEN W. (1992):**
Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11: 2407–2414.
- STIPURSKY J., FRANCIS D., GOMES F. C. A. (2012a):**
Activation of MAPK/PI3K/SMAD pathways by TGF- β (1) controls differentiation of radial glia into astrocytes in vitro. *Dev. Neurosci.* 34: 68–81.
- STIPURSKY J., GOMES F. C. A. (2007):**
TGF-beta1/SMAD signaling induces astrocyte fate commitment in vitro: implications for radial glia development. *Glia* 55: 1023–1033.
- STIPURSKY J., SPOHR T. C. L. S. E. DE, SOUSA V. O., GOMES F. C. A. (2012b):**
Neuron-astroglial interactions in cell-fate commitment and maturation in the central nervous system. *Neurochem. Res.* 37: 2402–2418.

STITZ L., BILZER T., PLANZ O. (2002):

The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front. Biosci.* 7: d541-55.

STITZ L., DIETZSCHOLD B., CARBONE K. M. (1995):

Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 190: 75–92.

STITZ L., PLANZ O., BILZER T. (1998):

Lack of antiviral effect of amantadine in Borna disease virus infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 186: 195–200.

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.

SUN Y., LEHMBECKER A., KALKUHL A., DESCHL U., SUN W., ROHN K., TZWETANOVA I.D., NAVE K.-A., BAUMGÄRTNER W., ULRICH R. (2015)

STAT3 represents a molecular switch possibly including astroglial instead of oligodendroglial differentiation of oligodendroglial progenitor cells in Theiler's murine encephalomyelitis. *Neurpathology and applied Neurobiology* 41 347-370

TERWEL D., STEFFENSEN K. R., VERGHESE P. B., KUMMER M. P., GUSTAFSSON J.-Å., HOLTZMAN D. M., HENEKA M. T. (2011):

Critical role of astroglial apolipoprotein E and liver X receptor- α expression for Mikroglial A β phagocytosis. *J. Neurosci.* 31: 7049–7059.

THEIS M., GIAUME C. (2012):

Connexin-based intercellular communication and astrocyte heterogeneity. *Brain research.*

THOMAS G. (2002):

Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 753–766.

THOMAS G., THORNE B. A., THOMAS L., ALLEN R. G., HRUBY D. E., FULLER R., THORNER J. (1988):

Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 241: 226–230.

THOMPSON R. J., MACVICAR B. A.:

Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2: 81–86.

TOMONAGA K., KOBAYASHI T., IKUTA K. (2002):

Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes Infect.* 4: 491–500.

TOMONAGA K., KOBAYASHI T., LEE B. J., WATANABE M., KAMITANI W., IKUTA K. (2000):

Identification of alternative splicing and negative splicing activity of a nonsegmented negative-strand RNA virus, Borna disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 12788–12793.

VAHLENKAMP T. W., KONRATH A., WEBER M., MÜLLER H. (2002):

Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J. Virol.* 76: 9735–9743.

VANDESOMPELE J., PRETER K. DE, PATTYN F., POPPE B., VAN ROY N., PAEPE A. DE, SPELEMAN F. (2002):

Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

- VANDEWOUE S., RICHT J. A., ZINK M. C., ROTT R., NARAYAN O., CLEMENTS J. E. (1990):**
A borna virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioral diseases. *Science* 250: 1278–1281.
- VERKHRATSKY A., PARPURA V. (2010):**
Recent advances in (patho)physiology of astroglia. Review. *Acta Pharmacol. Sin.* 31: 1044–1054.
- VERKHRATSKY A., PARPURA V., RODRÍGUEZ J. J. (2010):**
Where the thoughts dwell: The physiology of neuronal-glia "diffuse neural net". *Brain Res Rev.*
- VERKHRATSKY A., STEINHÄUSER C. (2000):**
Ion channels in glial cells. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 32: 380–412.
- VERMEIREN C., NAJIMI M., MALOTEAUX J.-M., HERMANS E. (2005a):**
Molecular and functional characterisation of glutamate transporters in rat cortical astrocytes exposed to a defined combination of growth factors during in vitro differentiation. *Neurochem. Int.* 46: 137–147.
- VERMEIREN C., NAJIMI M., VANHOUTTE N., TILLEUX S., HEMPTINNE I. DE, MALOTEAUX J.-M., HERMANS E. (2005b):**
Acute up-regulation of glutamate uptake mediated by mGluR5a in reactive astrocytes. *J. Neurochem.* 94: 405–416.
- VOLCHKOV V. E., FELDMANN H., VOLCHKOVA V. A., KLENK H. D. (1998):**
Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5762–5767.
- VOLCHKOV V. E., VOLCHKOVA V. A., STRÖHER U., BECKER S., DOLNIK O., CIEPLIK M., GARTEN W., KLENK H. D., FELDMANN H. (2000):**
Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology* 268: 1–6.
- VOLMER R., BAJRAMOVIC J. J., SCHNEIDER U., UFANO S., POCHE S., GONZALEZ-DUNIA D. (2005):**
Mechanism of the antiviral action of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on Borna disease virus. *J. Virol.* 79: 4514–4518.
- VOLMER R., MONNET C., GONZALEZ-DUNIA D. (2006):**
Borna disease virus blocks potentiation of presynaptic activity through inhibition of protein kinase C signaling. *PLoS Pathog.* 2: e19.
- WALKER M. P., JORDAN I., BRIESE T., FISCHER N., LIPKIN W. I. (2000):**
Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J. Virol.* 74: 4425–4428.
- WALKER M. P., LIPKIN W. I. (2002):**
Characterization of the nuclear localization signal of the borna disease virus polymerase. *J. Virol.* 76: 8460–8467.
- WALLRAFF A., ODERMATT B., WILLECKE K., STEINHÄUSER C. (2004):**
Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia* 48: 36–43.

WALTRIP R. W., BUCHANAN R. W., SUMMERFELT A., BREIER A., CARPENTER W. T., BRYANT N. L., RUBIN S. A., CARBONE K. M. (1995):

Borna disease virus and schizophrenia. *Psychiatry Res* 56: 33–44.

WANG Y., CUI J., SUN X., ZHANG Y. (2011):

Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.* 18: 732–742.

WASIERI J. (2009):

Klonierung feliner Fibrosarkomzelllinien und deren zytogenetische Charakterisierung. Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2009. VVB Laufersweiler, 1. Aufl., Giessen.

WATANABE M., KOBAYASHI T., TOMONAGA K., IKUTA K. (2000):

Antibodies to Borna disease virus in infected adult rats: an early appearance of anti-p10 antibody and recognition of novel virus-specific proteins in infected animal brain cells. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 775–778.

WEHNER T., RUPPERT A., HERDEN C., FRESE K., BECHT H., RICHT J. A. (1997):

Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 10): 2459–2466.

WEINSTEIN D. E. (2001):

Isolation and purification of primary rodent astrocytes. *Curr Protoc Neurosci* 3: Unit 3.5.

WEISSENBÖCK H., BAKONYI T., SEKULIN K., EHRENSPERGER F., DONELEY R. J. T., DÜRRWALD R., HOOP R., ERDÉLYI K., GÁL J., KOLODZIEJEK J., NOWOTNY N. (2009):

Avian bornaviruses in psittacine birds from Europe and Australia with proventricular dilatation disease. *Emerging Infect. Dis.* 15: 1453–1459.

WEISSENBÖCK H., NOWOTNY N., CAPLAZI P., KOLODZIEJEK J., EHRENSPERGER F. (1998):

Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2127–2130.

WELBERG L. (2009):

Brain metabolism: Astrocytes bridge the gap. *Nat. Rev. Neurosci.* 10.

WELSCH S., MÜLLER B., KRÄUSSLICH H.-G. (2007):

More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett.* 581: 2089–2097.

WERNER-KEIŠŠ N. (2006):

Untersuchungen zur Expression von Strukturproteinen des Virus der Bornaschen Krankheit an intrazerebral infizierten Lewis-Ratten. *Tierärztl. Hochsch., Institut für Pathologie, Diss.-- Hannover, 2006. DVG-Service; Tierärztl. Hochsch., 1. Aufl., Gießen, Hannover.*

WERNER-KEIŠŠ N., GARTEN W., RICHT J. A., POROMBKA D., ALGERMISSEN D., HERZOG S., BAUMGÄRTNER W., HERDEN C. (2008):

Restricted expression of Borna disease virus glycoprotein in brains of experimentally infected Lewis rats. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 34: 590–602.

WILHELMSSON U., BUSHONG E. A., PRICE D. L., SMARR B. L., VAN PHUNG, TERADA M., ELLISMAN M. H., PEKNY M. (2006):

Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 17513–17518.

WILLIAMS B. P., ABNEY E. R., RAFF M. C. (1985):

Macroglial cell development in embryonic rat brain: studies using monoclonal antibodies, fluorescence activated cell sorting, and cell culture. *Dev. Biol.* 112: 126–134.

WISE R. J., BARR P. J., WONG P. A., KIEFER M. C., BRAKE A. J., KAUFMAN R. J. (1990):

Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 9378–9382.

WOLFF T., HEINS G., PAULI G., BURGER R., KURTH R. (2006):

Failure to detect Borna disease virus antigen and RNA in human blood. *J. Clin. Virol.* 36: 309–311.

WOLFF T., PFLEGER R., WEHNER T., REINHARDT J., RICHT J. A. (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.

WOLFF T., UNTERSTAB G., HEINS G., RICHT J. A., KANN M. (2002):

Characterization of an unusual importin alpha binding motif in the borna disease virus p10 protein that directs nuclear import. *J. Biol. Chem.* 277: 12151–12157.

WOLSWIJK G., NOBLE M. (1989):

Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development* 105: 387–400.

WU B., GUO S., JIANG T., REN X. (2011):

In vitro culture and characterization of oligodendrocyte precursor cells derived from neonatal rats. *Neurol. Res.* 33: 593–599.

YANG H., CHENG X.-P., LI J.-W., YAO Q., JU G. (2009):

De-differentiation response of cultured astrocytes to injury induced by scratch or conditioned culture medium of scratch-insulted astrocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 29: 455–473.

YANG H., QIAN X.-H., CONG R., LI J.-W., YAO Q., JIAO X.-Y., JU G., YOU S.-W. (2010):

Evidence for heterogeneity of astrocyte de-differentiation in vitro: astrocytes transform into intermediate precursor cells following induction of ACM from scratch-insulted astrocytes. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30: 483–491.

YANG P., HERNANDEZ M. R. (2003):

Purification of astrocytes from adult human optic nerve heads by immunopanning. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 12: 67–76.

YILMAZ H., HELPS C. R., TURAN N., UYSAL A., HARBOUR D. A. (2002):

Detection of antibodies to Borna disease virus (BDV) in Turkish horse sera using rekombinant p40. Brief report. *Arch. Virol.* 147: 429–435.

ZHAI A., QIAN J., KAO W., Li A., Li Y., HE J., ZHANG Q., SONG W., FU Y., WU J., CHEN X., LI H., ZHONG Z., LING H., ZHANG F. (2013):

Borna disease virus encoded phosphoprotein inhibits host innate immunity by regulating miR-155. *Antiviral Research* 98, 66-75

ZHANG Y., BARRES B. A. (2010):

Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr. Opin. Neurobiol.* 20: 588–594.

ZHENG K., LI H., HUANG H., QIU M. (2012):

MicroRNAs and glial cell development. *Neuroscientist* 18: 114–118.

ZHONG P., AGOSTO L.M., MUNRO J.B., MOTHE W. (2013):

Cell-to-cell transmission of viruses. *Current Opinions in Virology* 2013, 3:44-50

ZIMMERMANN W., BRETER H., RUDOLPH M., LUDWIG H. (1994):

Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *J. Virol.* 68: 6755–6758.

ZURBRIGGEN A., MÜLLER C., VANDELDELDE M. (1993):

In situ hybridization of virulent canine distemper virus in brain tissue, using digoxigenin-labeled probes. *Am. J. Vet. Res.* 54: 1457–1461.

ZWICK W. (1939)

Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. *Handbuch der Viruskrankheiten*. In: Gildemeister E., Haagen E., Waldmann O. (Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Jena, S 254-356

ZWICK W. UND SEIFRIED O. (1925)

Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). *Berl Tierärztl Wochenschr* 41: 129-132

ZWICK W., SEIFRIED O., WITTE J. (1927)

Experimentelle Untersuchung über die seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). *Zschr Inf Krkh Haustiere* 30: 42-136

9. ANHANG

9.1 BEZUGSQUELLEN FÜR GERÄTE UND SOFTWARE

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl

Laminar Flow Sicherheitswerkbank BDK-SK 1500

Bio-med GmbH, Oberschleißheim

Thermocycler 60

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA

Mini-PROTEAN® II™ Kammer

PowerN PAC 200 (Stromquelle)

Transblot® SD Semi-dry Transfer cell

Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf

Multicycler® PTC 200

Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf

Zentrifuge Eppendorf C5415

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim

Varioklav® Dampfsterilisator Typ 500 EP-Z (RL)

Heidolph Instruments GmbH Co. KG, Schwabach

Magnetrührer MR 2002

Vortexer Reax 2000

Heraeus Instruments, Bereich Thermotech, Hanau

Begasungsbrutschrank Typ B16

Hettrich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen

Zentrifuge Universal 16A, Rotina 48 RC

Zentrifuge Mikroliter 2022

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG

Pipettierhilfe pipetus®

J. Köttermann KG, Labortechnik, Hänsingen

Wasserbad

Kendo Laboratory Products GmbH, Langenselbold

Heraeus Instruments LaminAir® LB-48-C

Kodak GmbH, Stuttgart

Geldokumentationssystem 1.0 "Digital Imaging"

Labnet International Inc., Edison, USA

Heizblock Accublock™ Mini

MELAG Medizintechnik oHG, Berlin

Trockensterilisator Typ 601

Nikon GmbH, Düsseldorf

Digitalkamera Nikon D200/300
Mikroskop Eclipse 80i mit Kamera DS-Qi1Mc
NIS-Elements Software BR 3.10, SP3

Olympus Deutschland GmbH, Hamburg

Invertmikroskop IX70
Netzmikrometerplatte U-OCMSQ 10/10

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Neubauer Zählkammer, Glas, DIN 12847, 0,025 mm² x 0,1 mm Tiefe

Qiagen, Hilden

Termocycler Rotor-Gene® Q
Rotor-Gene® Software 2.0.2.

Reichert-Jung GmbH, Nußloch

Kryomikrotom Frigocut 2700

Sakure Finetec USA, Torrance, CA

Einbettautomaten Tissue-Tek® TEC 5™

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Cell dissociation sieve-Tissue Grinder Kit®, Kat.-Nr.: CD1-1KT
Screen 200 Mesh (wire diameter: 0,053 mm; opening size 73,7 µm), Kat.-Nr.: S4145-5EA

Thermo Fischer Scientific, Langenselbold

Nalgene™ Cryo 1°C Freezing Container
Thermo Scientific Coverplate™-Systems

Vilber Loumant, Torcy, Frankreich

UV-Transluminator 312 nm

WLD-TEC GmbH, Göttingen

Fireboy Fuego SCS basic RF

9.2 BEZUGSQUELLEN FÜR REAGENZIEN, KITS, ANTIKÖRPER UND EINMALWAREN

Biomol Feinchemikalien GmbH, Ilvesheim

HEPES, Kat.-Nr.: 5288

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA

Immun-Star AP Substrate, Kat.-Nr.: 170-5018
Immun-Star™ Enhancer, Kat.-Nr.: 170-5019
Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards, Kat.-Nr.: 161-0376
Precision Protein™ StrepTactin AP Conjugate, Kat.-Nr.: 161-0382

Biozym Scientific GmbH, Hess.-Oldendorf

Gel-bond®-Film, Kat.-Nr.: 863734
PCR Soft Tubes, 0,5 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710911

PCR Soft Tubes, 0,2 ml, Flachdeckel, Kat.-Nr.: 710920
gestopfte Pipettenspitzen, Safeseal-Tips bis 1000 µl: Kat.-Nr.: 781002
gestopfte Pipettenspitzen, Safeseal-Tips bis 200 µl: Kat.-Nr.: 780202
gestopfte Pipettenspitzen, Safeseal-Tips bis 100 µl: Kat.-Nr.: 780102
gestopfte Pipettenspitzen, Safeseal-Tips bis 20 µl: Kat.-Nr.: 780022
gestopfte Pipettenspitzen, Safeseal-Tips bis 10 µl: Kat.-Nr.: 780017

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Aceton, Kat.-Nr.: 9372.3
APS (Ammoniumpersulfat), 9592.3
Bovines Serum Albumin (BSA), Fraktion V, Kat.-Nr.: 8076.1
Bromphenolblau Natriumsalz, Kat.-Nr.: A512.1
DAPI® DNA Stain, Kat.-Nr.: 6335.1
Deckgläschen "rund", Durchmesser 12 mm, Kat.-Nr.: P 231.1
Deckgläschen 18 x 18 mm, Kat.-Nr.: 0657.2
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (MW 372,31 g/mol), Kat.-Nr.: X986.2
EGTA, Kat.-Nr.: 3054.1
Ethanol Rotipuran®, Kat.-Nr.: 9065.2
Formaldehyd ROTIPURAN® 37%, Kat.-Nr.: 4979.1
Formamid, ROTIPURAN®, nicht deionisiert, Kat.-Nr.: 6749.1
Heparin-Natriumsalz (180 I.U./mg), Kat.-Nr.: 7692.1
Isopropanol, Kat.-Nr.: 9866.3
Kaliumchlorid, KCl, Kat.-Nr.: 6781.1
Magermilchpulver, Kat.-Nr.: T145.1
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (MW 197,91 g/mol); MnCl₂, Kat.-Nr.: 0276.1
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices, Kat.-Nr.: AE94.1
Na-Citrat (Tri-Natriumcitrat-Di-Hydrat), Kat.-Nr.: 4088.2
Natriumchlorid; NaCl (MW 58,44 g/mol), Kat.-Nr.: 9265.2
Paraformaldehyd (PFA), reinst, DAC, Kat.-Nr.: 0335.3
Ribonuclease A (RNase A), 10 mg/ml Stocklösung, Kat.-Nr.: 7156.1
Roti-Histol®, Kat.-Nr.: 6640.1
Ponceau S, Kat.-Nr.: 5938.2
Proteinase K Lösung (20 mg/ml), Kat.-Nr.: 7528.2
TEMED (Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan), Kat.-Nr.: 2367.1
Trichlor-Essigsäure, Kat.-Nr.: 8789.2
Triethanolamin, Kat.-Nr.: 6300.1
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris (MW: 121,14 g/mol), Kat.-Nr.: 4855.3
Triton X-100, Kat.-Nr.: 3051.3
Tryp(t)anblau (C.I. 23850), Kat.-Nr.: CN76.3
1 N HCl (Säure); Kat.-Nr.: 4625.2
30% Acrylamid (Rotiporese® 30), Kat.-Nr.: 3029.1
Zellkulturschale, 10 cm Durchmesser (Plastikpetrischale), Kat.-Nr.: PK 39.1

DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Kaninchen-anti-GFAP polyklonaler Antikörper, Kat.-Nr.: Z033429-2

Kaninchen-anti-S100 polyklonaler Antikörper, Kat.-Nr.: Z031129-2

Dianova GmbH, Hamburg

Cy™2 Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L), Kat.-Nr.: 111-225-003

Cy™3 Ziege-anti-Maus IgG (H+L), Kat.-Nr.: 115-165-003

Cy™3 Ziege-anti-Meerschweinchen IgG (H+L), Kat.-Nr.: 106-225-003

Cy™3 Ziege-anti-Ratte IgG (H+L), Kat.-Nr.: 112-165-003

Dunn Labortechnik GmbH, Asbach

Multitest-Objektträger®, 10 Kreise á 6 mm Durchmesser, Kat.-Nr.: 40-410-06

Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf

DNA LoBind® Tube, 1,5 ml, Kat.-Nr.: 022431021

Safe-Lock-Reaktionsgefäße 1,5 ml, Kat.-Nr.: 0030.120.086

Safe-Lock-Reaktionsgefäße 2,0 ml, Kat.-Nr.: 0030.120.094

Eurogentec SA, Seraing, Belgien

Synthese der 5`-FAM-3`-TAMRA-markierte TaqMan®-Sonden

GATC, Gesellschaft für Analysetechnik und Consulting mbH, Konstanz

Borsäure, Kat.-Nr.: M201.11

GE Healthcare, Life Science, Uppsala, Schweden

Con A Sepharose™ 4B, Kat.-Nr.: 17-0440-03

Greiner, Bio-One GmbH, Frickenhausen

Cellstar Gewebekulturschale 35/10 mm (Plastikpetrischale), Kat.-Nr.: 627160

Cellstar Tissue Culture Plates, 24 Well, Kat.-Nr.: 662160

Kesla Pharma Wolfen GmbH, Bitterfeld-Wolfen

Wofasept® aha Händedesinfektion, Kat.-Nr.: 821292

Life Technologies GmbH, Darmstadt (Invitrogen)

20 x NuPAGE® Transferpuffer, Kat.-Nr.: NP0006

TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing with One Shot® TOP10 Chemically Competent

E.coli, Kat.-Nr.: K4575-01

DMEM, low Glucose (1g/l), Gibco, Kat.-Nr.: 31885

MAGV GmbH, Rabenau

Falcon Cell Culture Flask, 25 cm, canted neck, vented cap, Kat.-Nr.: 353109

Falcon Cell Culture Flask, 75 cm, canted neck, vented cap, Kat.-Nr.: 353136

Marabu GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen

Fix-o-gum®, Kat.-Nr.: 290117000

Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt

Venno®Vet 1 super, Kat.-Nr.: 58200-06

Menzel Gläser, Braunschweig

Super Frost Plus® Objektträger, Kat.-Nr.: J1800 AMNZ

Merck KGaA, Darmstadt

1,4-Dithiothreitol (DTT), Kat.-Nr.: 12013.0010

CaCl₂, Calciumchlorid-Dihydrat (MW 147,02 g/mol), Kat.-Nr.: 2382

Di-Natriumphosphat-Dihydrat (MW 177,99 g/mol), Kat.-Nr.: 1370365000

DMSO, Dimethylsulfoxid, Kat.-Nr.: 1.02931.1000

Salzsäure rauchend, HCl 37% reinst, Kat.-Nr.: 314.2500036

SDS, Dodecyl Natriumsalz, Kat.-Nr.: 1125330250

Entellan in Toluol, Kat.-Nr.: HX947912

KH₂PO₄, Kaliumdihydrogenphosphat (MW: 136,8 g/mol), Kat.-Nr.: 1370395000

MgCl₂ x 6H₂O, Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MW 203,3 g/mol), Kat.-Nr.: 1725711000

NaOH-Plättchen, Natriumhydroxid-Plättchen (MW: 40g/mol), Kat.-Nr.: 6469

Millipore GmbH, Schwallbach

Immobilon®-P PVDF Transfer Membran, Kat.-Nr.: IPVH 202000

Maus-anti A2B5 (neuron cell surface antigen) Antikörper; Kat.Nr.: MAB312

Maus-anti-Nestin Antikörper, Kat.-Nr.: MAB353

Meerschweinchen-anti-GLAST Antikörper, Kat.-Nr.: AB1782

Meerschweinchen-anti-GLT-1 Antikörper, Kat.-Nr.: AB1783 AB1783

MWG-Biotech, Ebersberg

Primersynthese

Nalgene Nunc International, Naperville, USA

Lab-Tek® II Chamber-Slides™, Kat.-Nr.: 154526

Nippon Genetics Europe GmbH, Düren

Midori Green® DNA Stain, Kat.-Nr.: MG02

Nunc A/S, Roskilde, Dänemark

Nunc Cryo Tube™ Vials, 1,8 ml, Kat.-Nr.: 368632

Nunclon™ Surface, 6-Wellplatte, Kat.-Nr.: 140675

PAA, Paschingen, AT

DMEM, high Glucose (4,5 g/l), with L-Glutamine, Kat.-Nr. E15-810

Fetal bovine serum "GOLD" (FBS), Kat.-Nr.: A15-151

Gentamycin (50 mg/ml), Kat.-Nr.: P11-005

Penicillin/Streptomycin (100x). Pen: 10000 U/ml, Strep: 10 mg/ml, Kat.-Nr.: P11-010

Trypsin-EDTA (1x), Kat.-Nr.: L11-660.100 ml

Pluradent AG & Co. KG, Offenbach

Kodak Dental ReadyMix Developer, Kat.-Nr.: 26954

Kodak Dental ReadyMix Fixierer, Kat.-Nr.: 26955

Preqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

PreqGold Universal Agarose, Kat.-Nr.: 35-1020

Q-BIO gene / MP Biomedicals, Heidelberg

deinonisiertes Formamid, Kat.-Nr.: FORMD003

Qiagen GmbH, Hilden

AllPrep RNA/Protein Kit®, Kat.-Nr.: 80404

QIAGEN® Multiplex PCR Kit, Kat.-Nr.: 206143

QuantiTect® Reverse Transcription Kit, Kat.-Nr.: 205310

Rotor-Gene® Probe PCR Kit, Kat.-Nr.: 204374

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Kat.-Nr.: 1093274

Complete, Mini-EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Kat.-Nr.: 4693159001

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), Kat.-Nr.: 11175025910

HNPP Fluorescent Detection Set, Kat.-Nr.: 11 758 888 001

Rnase T (500000 U/ml); Kat.-Nr.: 87925822

T3 RNA- Polymerase, Kat.-Nr.: 110 31163001

Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL

Tissue-Tec® O.C.T.™-Compound (OCT), Kat.-Nr.: 4583

Santa Cruz, Heidelberg

Ziege-anti-mGluR-1 Antikörper, Kat.-Nr.: sc-47131

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

15 ml Reagenz- und Zentrifugenröhren, Kat.-Nr.: 62554512

50 ml Reagenz- und Zentrifugenröhren, Kat.-Nr.: 62547254

Schleicher & Schnell, Dassel

Whatman Gel-Blotting-Papier GB003, Kat.-Nr.: 426881

Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt

Mikrozid AF liquid, Kat.-Nr.: 1191965

Serva Feinbiochemie GmbH & Co., Heidelberg

Diethylpyrokarbonat (DEPC), Kat.-Nr.: 18835

Ficoll® 400, Kat.-Nr.: 21373

Polyvinylpyrrolidone 90 (MW: 750 g/mol), Kat.-Nr.: 33410

Sodiumdodecyl-Sulfat, SDS (Dodecylsulfat natriumsalz), Kat.-Nr.: 20760

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Acetanhydrid, Kat.-Nr.: 45830

BioMax® MR Film, Kat.-Nr.: Z353949-50EA

Bradford Reagent, Kat.-Nr.: B 6916

Glycin (MW: 75,07 g/mol), Kat.-Nr.: G7126

Maus-anti-GFAP monoklonaler Antikörper, Kat.-Nr.: G 3893

Maus-anti-β-Actin monoklonaler Antikörper, Kat.-Nr.: A 5316

Maus-anti-Vimentin monoklonaler Antikörper, Kat.-Nr.: V 5255

Natriumfluorid (Sodiumfluoride), Kat.-Nr.: S7920-1009

Natriumorthovanadat (Sodiumorthovanadate), Kat.-Nr.: S6508-109
Natriumpyrophosphat-Decahydrat, Kat.-Nr.: 221368-1009
Nonidet P-40, Kat.-Nr.: N-6507
Piperazin-N,N´bis[2-ethansulfatsäure] (PIPES), MW 346,3 g/mol, Kat.-Nr.: P-1851
RNA-Lösung, Ribonucleic acid from calf liver (type IV), Kat.-Nr.: R7250
Ribonuclease T₁ (RNase T); Kat.-Nr.: R1003-100KU
Sheep Serum, sterilfiltriert (= Normales steriles Schafserum), Kat.-Nr.: S2263-100ml
ssDNA, Deoxyribonucleic acid sodium salt from Herring testes (type XIV) Kat.-Nr.: D6898
β-Glycerophosphat, Kat.-Nr.: G5422-256
β-Mercaptoethanol, Kat.-Nr.: M7154-100 ml
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan), Kat.-Nr.: P1379
Ziege-anti-Kaninchen Antikörper IgG, AP-konjugiert (Western Blot), Kat.-Nr.: A 3687
Ziege-anti-Maus Antikörper IgG, AP-konjugiert (Western Blot), Kat.-Nr.: A 7872

USB™ Cleveland, Ohio, USA

Dextransulfat-Natriumsalz (MW: 500 g/mol), Kat.-Nr.: 14489 50 GM

VWR™ International GmbH, Darmstadt

Salzsäure, HCl 2 N, Kat.-Nr.: 1.09063.1000

Whatman GmbH, Dassel

Protran® Nitrozellulose Transfer Membran, Kat.-Nr.: 10 401 196

9.3 LÖSUNGEN UND PUFFER

9.3.1 Zellkultur

Zellkulturmedium für Astrozyten

500 ml DMEM low Glucose (1g/l)
50 ml inaktivierte Fetale bovine Serum
5 ml Penicillin Streptomycin (100x)
0,5 ml Gentamycin (50mg/ml)
bei 4°C lagern

Zellkulturmedium für MDCK-Zellen

500 ml DMEM, high glucose (4,5 g/l), with L-Glutamin
50 ml inaktivierte Fetale bovine Serum
5 ml Penicillin Streptomycin (100x)
0,5 ml Gentamycin (50mg/ml)
bei 4°C lagern

Hitzeinaktivierung des Fetalen bovinen Serums

Serum in 55 ml Portionen in sterile Glasflaschen mit Deckel aliquotieren. 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad inkubieren um Komplement zu inaktivieren. Nach Abkühlen bei -20°C bis zum Gebrauch verwahren

10-fach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung (10 x PBS)

80 g NaCl

2 g KCl

11,5 g Na₂HPO₄

2 g KH₂PO₄

ad 1 Liter Aqua bidest., autoklavieren

1-fach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung (1 x PBS)

50 ml 10 x PBS

450 ml Aqua bidest., autoklavieren

0,36 % Tryptanblau-Lösung für Zellzählung und Vitalitätstest

0,36 g Tryptanblau

ad 100 ml 0,9% NaCl-Lösung

bei 4°C lagern

Einfriermedium

5 ml fertig angesetztes Zellkulturmedium (siehe oben)

4 ml inaktiviertes Fetale bovine Serum

1 ml DMSO

9.3.2 Indirekte Immunfluoreszenz

10 % Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS) Vorbehandlung

100 g Dodecyl Natriumsalz

ad 1000 ml Aqua bidest.

Multitest®-Objektträger und Deckgläschen werden für 30 Minuten in eine Küvette mit 10% SDS gestellt und anschließend unter fließendem Wasser und danach mit Aqua bidest. abgewaschen. Nach Trocknung erfolgt die Sterilisierung bei 160°C für 1 Stunde.

4% Paraformaldehyd (PFA)

6 g Paraformaldehyd

150 ml 1 x PBS

auf einem beheizbaren Magnetrührer bei ca. 70°C mischen bis die Lösung klar bleibt. pH Wert auf 7,4 einstellen. Vor Gebrauch immer frisch ansetzen, maximal 12 Stunden bei 4°C im Kühlschrank lagern.

0,25% Triton X-100

0,25 ml Triton X-100

ad 100 ml 1 x PBS

1 % PBS-BSA

0,1 g BSA

ad 10 ml 1 x PBS

bei 4°C 2 Wochen haltbar

5% PBS-BSA

0,5 g BSA

ad 10 ml 1 x PBS
bei 4°C 2 Wochen haltbar

DAPI®-Lösung 1:500

2 µl DAPI-Stocklösung
1 ml 1 x PBS

bis zum unmittelbaren Gebrauch dunkel lagern. Immer frisch ansetzen.

9.3.3 Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH)

Alle Puffer und Lösungen werden, wenn nicht anders angegeben in sterilen Glasbehältern angesetzt und bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Hybridisierungspuffer, Prähybridisierungspuffer und deren Bestandteile werden nicht autoklaviert.

Diethylpyrokarbonat (DEPC)-Aqua bidest.

1 ml Diethylpyrokarbonat Reinsubstanz
1000 ml Aqua bidest.

Unter einem Abzug über Nacht auf einem Magnetrührer lösen, anschließend bei 100°C autoklavieren

Aqua bidest. steril

Aqua bidest. in eine sterile Glasflasche füllen, autoklavieren

0,1 M CaCl₂

1,47 g CaCl (MW 147,02 g/mol)
100 ml Aqua bidest.

1 M MgCl₂

20,33 g MgCl₂ (Hexahydrat, MW 202,3 g/mol)
100 ml Aqua bidest.
nicht autoklavieren, stattdessen steril filtrieren

5 M NaCl (Bestandteil von Denhards)

29,22 g NaCl (MW: 58,44 g/mol)
100 ml Aqua bidest.

3 M NaCl

87,66 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
500 ml Aqua bidest.

1 M Tris, pH 8,0

12,11 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; MW: 121,14 g/mol)
100 ml Aqua bidest.
pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 8,0 einstellen

0,2 N HCl

50 ml 2 N HCl
450 ml Aqua bidest.
nicht autoklavieren

5 N NaOH

20 g NaOH-Plätzchen (MW: 40 g/mol)
100 ml Aqua bidest.

0,5 M EDTA-Na₂, pH 8,0

18,6 g Di-Natrium-EDTA-di-Hydrat (MW 372,31 g/mol)
ad 60 ml mit DEPC-Aqua bidest. auffüllen
pH-Wert mit 2 N NaOH auf 8,0 einstellen
ad 100 ml DEPC-Aqua bidest.

0,2 M EDTA-Na₂, pH 8,0

0,4 ml 0,5 M EDTA-Na₂-Lösung, pH 8,0
0,6 ml DEPC-Aqua bidest.
Lösungen mischen, autoklavieren

0,5 M Piperazin-N,N'bis[2-ethansulfatsäure] (PIPES), pH 7,0

8,6575 g PIPES (MW 346,3 g/mol)
50 ml DEPC-Aqua bidest.

10-fach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung (10 x PBS)

siehe 9.3.1

1-fach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung (1 x PBS)

siehe 9.3.1

20 x SSC („standard saline citrat“) Stammlösung, pH 7,0

175,3 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
88,2 g Na-Citrat (Tris-Natriumcitrat-Di-Hydrat)
ad 800 ml Aqua bidest.
mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 7,0 einstellen
ad 1000 ml Aqua bidest.

Puffer 1, pH 7,5

12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14 g/mol)
8,77 g NaCl (MW: 58,44 g/mol)
ad 800 ml Aqua bidest.
pH-Wert mit konzentrierter HCl auf 7,5 einstellen
ad 1000 ml Aqua bidest.

Puffer 3 (Waschpuffer)

500 µl Tween 20 (0,05 %ige Lösung)
1000 ml Puffer 1

Puffer 4 (Detektionspuffer)

12,1 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (MW 121,14 g/mol)
5,8 g NaCl (MW 58,44 g/mol)
pH Wert auf 8,0 einstellen
ad 900 ml Aqua bidest. , autoklavieren

anschließend 0,203 g MgCl_2 in 100 ml Aqua bidest. lösen (Endkonzentration: 10 mM MgCl_2) und sterilfiltriert zu den sterilisierten Komponenten hinzugeben.

1 x PBS + 5 mM MgCl_2

100 ml 10 x PBS

5 ml 1 M MgCl_2

ad 1000 ml DEPC-Aqua bidest.

steril filtrieren oder im Versuch frisch ansetzen

6 ml 10 x PBS

300 μl 1 M MgCl_2

ad 60 ml DEPC-Aqua bidest.

2 x SSC + 5 mM EDTA- Na_2

50 ml 20 x SSC

5 ml 0,5 M EDTA- Na_2

ad 500 ml DEPC-Aqua bidest.

0,2% Glycin in 1 x PBS

1 g Glycin

500 ml 1 x PBS

Lagerung bei 4°C

4% Paraformaldehyd

siehe unter 9.3.2

50 x Denhards

5 g Ficoll

5 g Polyvinylpyrrolidone

5 g bovines Serumalbumin

500 ml Aqua bidest.

Herstellung von Aliquots von je 50 ml, bei -20°C lagern

Heringssperma-DNA (ssDNA)-Lösung; 10 mg/ml

250 mg ssDNA-Lyophilisat (Deoxyribonucleic acid sodium salt from Hering testes)

25 ml Puffer 4

Aufbewahren bei 4°C

Ribonukleinsäure (RNA)-Lösung, 10 mg/ml

in Originalpackung ansetzen

250 mg Ribonucleic acid from calf liver (type IV)

25 ml DEPC-Aqua bidest.

Lagerung bei -20°C

Prähybridisierungspuffer (steril hergestellt)

450 ml 20 x SSC

675 ml 100%iges deionisiertes Formamid

150 ml 50 x Denhardts

210 ml DEPC-Aqua bidest.

Herstellen von 30 Aliquots á 49,5 ml, Lagerung bei -20°C

im Versuch werden je Aliquot hinzugefügt:

0,5 ml ssDNA-Lösung (vorher 5 Minuten bei 95°C inkubieren, anschließend auf Eis abkühlen)

1,25 ml RNA-Lösung

Hybridisierungspuffer (HB-Mix), steril hergestellt

16 ml 100%iges deionisiertes Formamid

8 ml 20 x Hybridisierungssalze

3,2 ml 50 x Denhardts

1600 µl Heparin-Natrium (1000 U/ml)

320 µl 10%iges Triton X-100

40 Aliquots zu je 696 µl hergestellt, Lagerung bei -20°C

im Versuch werden je Aliquot hinzugefügt:

18 µl RNA-Lösung

20 µl ss-DNA-Lösung

80 µl Dextransulfat

20 x Hybridisierungssalze

10 ml 0,5 M EDTA-Na₂, pH 8,0

10 ml 0,5 M PIPES, pH 7,0

30 ml 5 M NaCl

Nachfolgende Lösungen werden während der in-situ-Hybridisierung frisch angesetzt

(die Angaben beziehen sich jeweils auf eine 60 ml Standküvette für max. 20 Objektträger)

DIG-Antikörper Lösung (1:200), Menge für 10 Objektträger á 300 µl

31 µl normales steriles Schafserum

94 µl 10%iges Triton X-100

3 ml Puffer 1

zusammen bei 37°C im Wasserbad vorinkubieren

unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen:

15 µl Anti-DIG-Antikörper, AP konjugiert

0,25%iges Acetanhydrit in 0,1 M Triethanolamin, pH 7,5

894 mg Triethanolamin

60 ml DEPC-Aqua bidest.

pH-Wert mit 1-2 N HCl auf 7,5 einstellen

150 µl Acetanhydrit kurz vor Gebrauch hinzufügen und ca. 60 Sekunden rühren

Dextransulfatlösung

250 mg Dextransulfat

400 µl DEPC-Aqua bidest.

in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß geben und bei 70 °C im Wasserbad lösen.

Färbelösung (HNPP/Fast Red TR Mix), Menge für 10 Färbereaktionen

10 µl HNPP Lösung (10 mg/ml)

10 µl Fast Red TR Lösung (25 mg/ml)

1 ml Puffer 4

Bis zum unmittelbaren Gebrauch abdunkeln. Pro Objektträger werden für jeden

Färbeschritt 100 µl Färbelösung benötigt. Lagerung bei 4°C einige Tage haltbar

Fast Red TR Mix (25 mg/ml), Menge für 10 Färbereaktionen

0,25 mg Fast Red TR Pulver

10 µl Aqua bidest.

Bis zum unmittelbaren Gebrauch abdunkeln. Lagerung: bei 4°C für 4 Wochen haltbar

Proteinase K-Verdauung

1 ml 1 M Tris, pH 8,0

1 ml 0,1 M CaCl₂

60 ml DEPC-Aqua bidest.

zusammen bei 37°C vorinkubieren

unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen:

1,5 µl Proteinase K (Stocklösung: 20 mg/ml; entspricht 0,5 µg/ml Verdauung)

Puffer 2 (Blockingpuffer)

1,2 ml normales steriles Schafserum (NSS)

1,8 ml 10%iges Triton X-100

ad 60 ml Puffer 1

RNase-Lösung

10 ml 3 M NaCl

60 µl 1 M Tris, pH 8,0

120 µl 0,5 M EDTA-Na₂, pH 8,0

49 ml Aqua bidest.

zusammen bei 37°C vorinkubieren

unmittelbar vor Gebrauch hinzufügen:

0,6 µl RNase A (10 mg/ml Stocklösung)

1 µl RNase T (500.000 U/ml Stocklösung)

2 x SSC

24 ml 20 x SSC

ad 240 ml Aqua bidest.

0,2 x SSC

1,2 ml 20 x SSC

ad 120 ml Aqua bidest.

6 x SSC + 45%iges Formamid

36 ml 20 x SSC

54 ml 100%iges Formamid (nicht deionisiert)

30 ml Aqua bidest.

9.3.4 RNA- und Proteinisolierung, Lektinpräzipitation und Western Blot

Puffer GDK-1 (modifiziert nach Kiermayer et al., 2002)

6,06 g Tris (121,14 g/mol; 50 mM)

8,766 g NaCl (58,44 g/mol; 150 mM)

0,147 g CaCl₂ (147,02 g/mol; 1mM)

0,198 g MnCl₂ (197,91 g/mol; 1mM)

5 ml Triton X 100 (0,5%)

ad 1 Liter Aqua bidest.

Bei 4°C einige Tage haltbar. Vor Gebrauch bei 37°C erwärmen und eventuell ausgefallene Reagenzien durch Rühren erneut lösen.

Homogenisationspuffer (25 ml)

2,5 ml 0,5 M HEPES pH 7,4 (50 mM)

3,125 ml 1,2 M NaCl (150 mM)

50 µl 100 %Nonidet P-40 (0,2%)

10 ml 10 mM EGTA (4 mM)

1 ml 0,25 M EDTA (10 mM)

2,5 ml 150 mM Natriumpyrophosphat (15 mM)

2,5 ml 1 M β-Glycerophosphat (100 mM)

2,5 ml 0,5 M Natriumfluorid (50 mM)

0,625 ml 200 mM Natriumorthovanadat (5 mM)

3,85 mg 1M Dithiothreitol (DTT) (1mM)

1 Tablette Cocktail protease inhibitor, Complete, Mini-EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

0,44 ml Aqua bidest.

Die Lösung kann bei 4°C für eine Woche gelagert werden.

Lösungen zur Herstellung des Homogenisationspuffers:

0,5 M HEPES (pH 7,4)

1,19 g HEPES (MW: 238,31)

ad 10 ml Aqua bidest.

pH auf 7,4 einstellen

1,2 M NaCl

0,7 g NaCl (MW 58,44)

ad 10 ml Aqua bidest.

0,5 M EGTA (pH 8)

0,19 g EGTA (MW: 380,35)

ad 50 ml Aqua bidest.

pH noch vor dem Rühren auf 8 einstellen, damit EGTA in Lösung geht

0,25 M EDTA

4,65 g EDTA (MW 372,24)

ad 50 ml Aqua bidest.

150 mM Natriumpyrophosphat

0,67 g Natriumpyrophosphat (MW: 446,06)

ad 10 ml Aqua bidest.

1 M β -Glycerophosphat

2,16 g β -Glycerophosphat (MW: 216,04)

ad 10 ml Aqua bidest.

0,5 M Natriumfluorid

0,21 g Natriumfluorid (MW: 41,99)

ad 10 ml Aqua bidest.

200 mM Natriumorthovanadat

0,37 g Natriumorthovanadat (MW: 183,91)

ad 10 ml Aqua bidest

All Lösungen zur Herstellung des Homogenisationspuffers können bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden.

Lösungen zur Durchführung des Western-Blots

5 x SDS-(Sodiumdodecylsulfat) Probenpuffer

5 ml Glycerol

2,13 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

1 g SDS

eine Spatelspitze Bromphenolblau

Aliquots zu je 75 μ l werden bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch werden unter einem Abzug pro Aliquot 25 μ l β -Mercaptoethanol zugegeben. Die Proteinproben sollten mindestens 1:2 mit 5 x Probenpuffer versetzt werden.

12%iges Polyacrylamid-Trenngel

4 ml 30% Acrylamid

1 ml Aqua bidest.

5 ml Puffer A, pH 8,8

65 μ l 10% APS

7,5 μ l TEMED

Die Menge reicht für 2 Gele

Puffer A, pH 8,8

36,34 g Tris (MW: 121,14 g/mol)

0,8 g SDS (MW: 288,4 g/mol)
in 120 ml Aqua bidest. lösen
pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,8 einstellen.
ad 200 ml Aqua bidest., autoklavieren

10% APS (Ammoniumpersulfat)

1 g APS
10 ml Aqua bidest.

Sammelgel

2,5 ml Stocklösung für Sammelgele
30 µl 10 % APS
4 µl TEMED
Die Menge reicht für 2 Gele

Stocklösung für Sammelgele

1,25 ml 30 % Acrylamid
3,75 ml Aqua bidest.
5 ml Puffer B, pH 6,8
Eine Spatelspitze Bromphenolblau
Die Lösung kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Puffer B, pH 6,8

6,05 g Tris (MW: 121,14 g/mol)
0,4 g SDS (MW: 288,4 g/mol)
in 80 ml Aqua bidest. lösen
Mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 6,8 einstellen
ad 100 ml Aqua bidest., autoklavieren

5 x Elektrophoresepuffer

7,5 g Tris (MW: 121,14 g/mol)
37,5 g Glycin (MW: 75,07 g/mol)
2,5 g SDS (MW: 288,4 g/mol)
ad 500 ml Aqua bidest.

1 x Elektrophoresepuffer (Laufpuffer)

100 ml 5 x Elektrophoresepuffer
400 ml Aqua bidest.
Der Puffer wird direkt vor Gebrauch frisch hergestellt

1 x NuPAGE® Transferpuffer (für PVDF Membranen)

10 ml 20 x NuPAGE® Transferpuffer
ad 200 ml Aqua bidest.

10 x TBS-Puffer, pH 8,0

12,11 g Tris (MW: 121,14 g/mol)
87,66 g NaCl (MW 58,44 g/mol)

ad 800 ml Aqua bidest.
pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,0 einstellen
ad 1000 ml Aqua bidest., autoklavieren

1 x TBST-Puffer

100 ml 10 x TBS-Puffer
0,5 ml Tween 20
ad 1000 ml Aqua bidest.

10% Magermilchpulver in TBST (Blocking-Lösung)

20 g Magermilchpulver
ad 200 ml 1 x TBST-Puffer

5% Magermilchpulver in TBST (zum Ansetzen der Primär-Antikörper)

20 ml 10% Magermilchpulver in TBST
20 ml 1 x TBST-Puffer

Precision Strept Actin AP Conjugate, 1:7500

15 ml 1 x TBST
2µl Precision Strept Actin AP Conjugate

Die folgenden Lösungen und Puffer werden ausschließlich für die Verwendung von Nitrozellulose-Membranen benötigt:

Transferpuffer "Marburg" (für Nitrozellulose Membranen)

5,8 g Tris (MW: 121,14 g/mol)
2,9 g Glycin (MW: 75,07 g/mol)
200 ml Ethanol absolut
ad 1000 ml Aqua bidest.
Lagerung bei Raumtemperatur

Ponceau S-Lösung

0,2 % Ponceau S
in 3% Trichlor-Essigsäure

9.3.5 RT, Real-time PCR und Gelelektrophorese

5 x TBE Puffer, pH 8,16 (Stocklösung)

54 g Tris (MW: 121,14 g/mol)
27,5 g Borsäure
4,15 g EDTA*Na₂
ad 1000 ml Aqua bidest., autoklavieren

0,5 x TBE Puffer (Arbeitslösung)

100 ml 5 x TBE Puffer
ad 1000 ml Aqua bidest.

2% Agarosegel

2 g Agarose

100 ml 0,5 x TBE Puffer

3,25 µl Midori-Green (1:10 Verdünnung)

Die Agarose in 0,5 x TBE Puffer in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung aufkochen. Unter Rühren Midori Green® 1:10 Verdünnung hinzugeben. Gel luftblasenfrei in eine Gelkammer mit einem Gelkamm gießen. Den Kamm nach dem Erstarren des Gels ziehen

9.4 TABELLEN

Tabelle 17: Allgemeine virologische Arbeitsschritte

<ul style="list-style-type: none"> • Alle Arbeiten fanden ausschließlich unter einer für den S2-Betrieb nach Biostoff-Verordnung zugelassenen Sicherheitswerkbank (Heraeus Instruments LaminAir® LB-48-C, Kendo Laboratory Products GmbH, Langenselbold) statt.
<ul style="list-style-type: none"> • Vor Arbeitsaufnahme, bei Unterbrechungen oder Arbeitsende wurden die Hände mit dem Desinfektionsmittel Wofasept® aha (Kesla Pharma Wolfen GmbH, Bitterfeld-Wolfen) für 30 Sekunden desinfiziert.
<ul style="list-style-type: none"> • Für infizierte Zellkulturen wurden separate Gebrauchslösungen und Glaspipetten verwendet.
<ul style="list-style-type: none"> • Gebrauchslösungen, die direkten Kontakt mit BDV infizieren Zellen hatten, wurden in eine Glasflasche mit 100% Venno® Vet 1 super (Menno Chemie-Vertrieb GmbH, Norderstedt) überführt. Die Endkonzentration der Desinfektionslösung sollte nach maximaler Befüllung der Flasche 1-2% betragen. Die virushaltige Lösung sollte mindestens 2 Stunden in der Desinfektionslösung verbleiben, bevor der Flüssigabfall entsorgt wird.
<ul style="list-style-type: none"> • Flüssigkeiten wurden ausschließlich mit gestopften Glaspipetten- oder Plastikpipettenspitzen mithilfe einer Pipettierhilfe pipetus® (Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt) abgenommen und in 100% Venno® Vet 1 super überführt.
<ul style="list-style-type: none"> • Glaswaren wurden nach Gebrauch in 1%igem Venno® Vet 1 super für 2 Stunden desinfizieren
<ul style="list-style-type: none"> • Benutzte Plastikwaren und sonstige Einmalartikel wurden durch Autoklavieren bei 120°C für 30 min dekontaminiert (Varioklav Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim)
<ul style="list-style-type: none"> • Nach Beendigung der Arbeit und zwischendurch bei Kontamination wurden Arbeitsfläche, Flaschen oder Geräte mit Mikrozid® AF liquid (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) für 5 Minuten desinfiziert.
<ul style="list-style-type: none"> • Abschließend erfolgte unter der Sicherheitswerkbank 30 Minuten UV-Licht Einwirkung. Gefäße mit Glaspipetten, Flasche mit Flüssigabfall und Autoklavierbeutel wurden währenddessen verschlossen unter der Flow belassen.

Tabelle 18: Animpfkonzentration der Astrozyten in verschiedenen Zellkultursystemen

Zellkultursystem	Methode	Konzentration	Konzentration/cm ²
25 cm ² Flasche	P1	5 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴
75 cm ² Flasche	FISH	1,5 x 10 ⁶	2 x 10 ⁴
24-Well Platte	IF	2,85 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁵
6-Well Platte	WB, qPCR	1,9 x 10 ⁵	2 x 10 ⁴
Multitest®-Objektträger	IF	2 x 10 ⁴	7,1 x 10 ⁴
Vorversuche			
10 cm ² Petrischalen	IF	1,4 x 10 ⁵ – 1,9 x	1,4 x 10 ⁴ – 1,9 x 10 ⁵
10 cm ² Petrischalen	RNA-Isolation	1,4 – 3 x 10 ⁵	1,4–3 x 10 ⁴
Lab-Tek® II Chamber-Slides™	IF	2,6–6,4 x 10 ⁴ Zellen/K.	1,5–3,8 x 10 ⁴

Animpfkonzentration/cm² = Zellzahl pro cm² Zellkultursystem; P1 = 1. Zellkulturpassage nach Präparation der Zellen; FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; WB = Western Blot; qPCR = real-time PCR; IF = Indirekte Immunfluoreszenz; Zellen/K. = Zellen pro Kammer

Tabelle 19: Übersicht über die Astrozytenpräparationen und deren Verwendungszweck

Präp.	Tiere	Alter	Verwendungszweck	Methode	Zeitpunkt p.i.
1	9	0 Tage	Etablierung Zellkultursysteme, Virusinfektion		—
2	6	0 Tage	Optimierung der Präparationsmethode		—
			Gewinnung von Material zur Etablierung	IF, qPCR	—
3	11	1 Tag	Astrozytenreifung- und Differenzierung	IF	7, 28, 42
4	11	0 Tage	Astrozytenreifung- und Differenzierung	IF	28, 42
			Kinetik BDV-N, M und GP-Expression	IF	14, 28, 42
			Versuch zur Glia-glialen BDV-Ausbreitung	IF	2, 5, 9, 23
5	12	0 Tage	Kinetik BDV-N, M und GP-Expression	IF	42
			Versuch zur Glia-glialen BDV-Ausbreitung	IF	5, 23
			Astrozytenreifung- und Differenzierung	IF	52
			Kinetik mRNA-Expression BDV-N, -M, -GP	FISH	28, 42
			Test Infektiosität des Zellkulturüberstandes	IF, WB	—
6	8	1 Tag	Kinetik BDV-N, M und GP-Expression	WB	21, 28, 42

ANHANG

			Kinetik mRNA-Expression BDV-N, -M, -GP	qPCR	21, 28, 42
			Kinetik mRNA-Expression BDV-N, -M, -GP	FISH	42
7	4	0 Tage	Kinetik BDV-N, M und GP-Expression	WB	21, 28, 42
			Kinetik mRNA-Expression BDV-N, -M, -GP	FISH	28
			Kinetik BDV-N, M und GP-Expression	IF	28

Präp. = interne Bezeichnung der Zellkulturpräparation; Tiere = Anzahl der neonatalen Ratten, die für die Präparation primärer corticaler Astrozyten verwendet wurden (entspricht der Wurfgröße, bzw. Anzahl lebend geborener Jungtiere); Alter: Lebensalter in Tagen, 0 Tage = Tag der Geburt; Methode = Methode mit der das gewonnene Material untersucht wurde; IF = Indirekte Immunfluoreszenz; FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; WB = Western Blot, qPCR = quantitative PCR (real-time PCR); p.i. = post infectionem

Tabelle 20: Anzahl und Alter der Versuchstiere, die zu Kontrollzwecken verwendet wurden

Versuchstiernummer	Alter	Verwendung
V 06/10	0 Tage	
V 07/10		X
V08/10		
V 73/09	1 Tag	
V 74/09		
V 75/09		
V 30/09	3 Tage	
V 31/09		
V 32/09		
V 36/09	7 Tage	
V 37 /09		
V 38/09		
V 03/10		
V 04/10		
V 05/10		
V 21/09	21 Tage	
V 22/09		
V 23/09		
V 33/09	28 Tage	

ANHANG

V 34/09	42 Tage	
V35/09		
V 39/09		X
V 40/09		
V 41/09		

V = Versuchstiernummer; X = Gewebeprobe wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet

Tabelle 21: Für die verschiedenen Methoden verwendeten Zellkultursysteme und Zellfixierungen

Methode	Zellkultursystem ab P1	nachfolgendes Zellkultursystem/ Verwendungszweck	Fixierung
IF (Reifung + Diff.)	25 cm ² Flasche	Multitest-Objektträger®*	4% PFA
IF (Reifung + Diff.)	Deckgläschen in 24 Well* Platten	/	4% PFA
IF (Kinetik M+GP)	25 cm ² Flasche	Multitest-Objektträger®*	Aceton
IF (Ausbreitung)	Deckgläschen in 24 Well*	/	4% PFA
IF (ZK-Überstand)	Deckgläschen in 24 Well* Platten	/	4% PFA
FISH	75 cm ² Flasche	FFPE-Zellpellet	10% F.
WB	6 Well Platte	Protein/RNA Isolation	/
qPCR		AllPrep RNA/Protein Kit®	

P1 = erste Zellkulturpassage nach Präparation der Kulturen; IF = Indirekte Immunfluoreszenz; Reifung + Diff. = Testung der Astrozytenreifung und -differenzierung.; IF (Kinetik M+GP) = Nachweis der BDV-Matrixprotein und -Glykoproteinexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i.; IF (Ausbreitung) = Untersuchung der Rolle des Glykoproteins bei der glia-gliale BDV-Ausbreitung; IF (ZK-Überstand) = Testung der Infektiosität des Zellkultur(ZK)-Überstandes; FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; WB = Western Blot; qPCR = quantitative PCR (real-time PCR); / = entfällt; 4% PFA = 4%iges Paraformaldehyd; 10% F. = 10%iges ungepuffertes Formalin; die mit * gekennzeichneten Zellkultursysteme wurden mit 10% Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) vorbehandelt (siehe 3.8.1.1)

Tabelle 22: Übersicht über die Protein-Proben für den Western Blot

Probe	Zeitpunkt p.i.	Protein-Konz.
Proben und Negativkontrollen zum Nachweis von BDV-N und BDV-M		
Astrozyten V6, BDV-infiziert	21. Tag	4,65 µg/µl
Astrozyten V6 n.i.		4,79 µg/µl
Astrozyten V7, BDV-infiziert		2,13 µg/µl
Astrozyten V7 n.i.		3,58 µg/µl
Astrozyten V6, BDV-infiziert	28. Tag	4,5 µg/µl
Astrozyten V6 n.i.		4,65 µg/µl
Astrozyten V7, BDV-infiziert		3,92 µg/µl
Astrozyten V7 n.i.		4,41 µg/µl
Astrozyten V6, BDV-infiziert	42. Tag	11,48 µg/µl
Astrozyten V6 n.i.		14,91 µg/µl
Astrozyten V7, BDV-infiziert		4,01 µg/µl
Astrozyten V7 n.i.		5,17 µg/µl
Proben und Negativkontrollen zum Nachweis von BDV-GP		
Astrozyten V6, BDV-infiziert	Tag 21	entfällt
Astrozyten V6 n.i.		
Astrozyten V7, BDV-infiziert		
Astrozyten V7 n.i.		
Astrozyten V6, BDV-infiziert	Tag 28	entfällt
Astrozyten V6 n.i.		
Astrozyten V7, BDV-infiziert		
Astrozyten V7 n.i.		
Astrozyten V6, BDV-infiziert	Tag 42	entfällt
Astrozyten V6 n.i.		
Astrozyten V7, BDV-infiziert		
Astrozyten V7 n.i.		
Kontrollmaterial		
MDCK-Zellen, BDV-infiziert		entfällt

ANHANG

MDCK-Zellen BDV-infiziert		
MDCK-Zellen, n.i.		
MDCK-Zellen, n.i.		
Astrozyten BDV 94%		
Astrozyten BDV 94%		

V6, V7 = Interne Bezeichnung der Astrozytenpräparation (siehe Tabelle 19); n.i. = nicht infiziert; p.i. = post infectionem; Protein-Konz. = Proteinkonzentration; BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-M = BDV-Matrixprotein; BDV-GP = BDV-Glykoprotein, der Antikörper detektiert BDV-GP-C und Gesamt-BDV-GP; Messung der Proteinkonzentration der Proben zum Nachweis von BDV-GP-C und des Kontrollmaterials entfällt, da die Proben direkt in SDS-Probenpuffer gelöst wurden; Lekt. = Lektinegefällt; Astrozyten BDV 94% = zu 94% BDV-infizierte, langzeitkultivierte Astrozyten

Tabelle 23: Übersicht über die RNA-Proben für RT und real-time PCR

Probe	Zeitpunkt p.i.	RNA-Konz.	mRNA Nachweis von
Astrozyten BDV 94% infiziert		215,8 ng/μl	BDV-N, BDV-M
Astrozyten BDV 94% infiziert		198,6 ng/μl	BDV-GP
Astrozyten V6, BDV-infiziert	21. Tag	96,6 ng/μl	BDV-N, BDV-M
Astrozyten V6, BDV-infiziert		96,6 ng/μl	BDV-GP
Astrozyten V6, BDV-infiziert	28. Tag	90,7 ng/μl	BDV-N, BDV-M
Astrozyten V6, BDV-infiziert		95,1 ng/μl	BDV-GP
Astrozyten V6, BDV-infiziert	42. Tag	117,8 ng/μl	BDV-N, BDV-M
Astrozyten V6, BDV-infiziert		120,1 ng/μl	BDV-GP
Astrozyten V6, nicht infiziert		154,5 ng/μl	Negativkontrolle

V6 = Interne Bezeichnung der Astrozytenpräparation (siehe Tabelle 19); Proben-ID = interne Bezeichnung der Probe; p.i. = post infectionem; RNA-Konz. = RNA Konzentration der Stammlösung nach RNA-Gewinnung; Nachweis von = Nachweis der mRNA, die für die jeweiligen Proteine kodieren; BDV-N = BDV-Nukleoprotein; BDV-M = BDV-Matrixprotein (entspricht dem Nachweis der BDV-Intron I Sequenz); BDV-GP = BDV-Glykoprotein; Astrozyten BDV 94% = zu 94% BDV-infizierte, langzeitkultivierte Astrozyten

Tabelle 24: Semiquantitative Auswertung der Vimentinexpression in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen

Vimentin					
Tage in vitro	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
7	BDV	1	3	3	3,0
	n.i.	1	3	3	3,0
28	BDV	2	3	3	3,0
	n.i.	2	3	3	3,0
42	BDV	2	3	3	3,0
	n.i.	2	2,5	3	2,875
52	n.i.	1	*	*	3,0
300	BDV	1	*	*	3,0

BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; * = nicht untersucht; In die statistische Datenauswertung eingegangen sind die Daten der 7, 28 und 42 Tage alten, sowohl BDV-infizierten als auch nicht infizierten Kulturen. Zusätzlich wurden 52 Tage alte, nicht infizierte Astrozyten untersucht, die vor der Testung in der indirekten Immunfluoreszenz für 3 Wochen nicht passagiert wurden. Weiterhin wurden 300 Tage alte, zwischenzeitlich kryokonservierte BDV-infizierte Astrozyten untersucht

Tabelle 25: Semiquantitative Auswertung der GFAP-Expression in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen

GFAP					
Tage in vitro	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
7	BDV	1	3	3	3,0
	n.i.	1	3	3	3,0
28	BDV	2	3	3	3,0
	n.i.	2	3	3	3,0
42	BDV	2	2,5	3	2,875
	n.i.	2	2,5	3	2,875
52	n.i.	1	*	*	3,0
300	BDV	1	*	*	3,0

BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; * = nicht

untersucht. In die statistische Datenauswertung eingegangen sind die Daten der 7, 28 und 42 Tage alten, sowohl BDV-infizierten als auch nicht infizierten Kulturen. Zusätzlich wurden 52 Tage alte, nicht infizierte Astrozyten untersucht, die vor der Testung in der indirekten Immunfluoreszenz für 3 Wochen nicht passagiert wurden. Weiterhin wurden 300 Tage alte, zwischenzeitlich kryokonservierte BDV-infizierte Astrozyten untersucht

Tabelle 26: Semiquantitative Auswertung der S100 β -Expression in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen

S100β					
Tage in vitro	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
7	BDV	1	3	3	3,0
	n.i.	1	3	3	3,0
28	BDV	2	3	3	3,0
	n.i.	2	3	3	3,0
42	BDV	2	3	3	3,0
	n.i.	2	2,5	3	2,75
52	n.i.	1	*	*	3,0
300	BDV	1	*	*	3

BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; * = nicht untersucht. In die statistische Datenauswertung eingegangen sind die Daten der 7, 28 und 42 Tage alten, sowohl BDV-infizierten als auch nicht infizierten Kulturen. Zusätzlich wurden 52 Tage alte, nicht infizierte Astrozyten untersucht, die vor der Testung in der indirekten Immunfluoreszenz für 3 Wochen nicht passagiert wurden. Weiterhin wurden 300 Tage alte, zwischenzeitlich kryokonservierte BDV-infizierte Astrozyten untersucht

Tabelle 27: Semiquantitative Auswertung der Nestinexpression in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen

Nestin					
Tage in vitro	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
7	BDV	1	3	3	3,0
	n.i.	1	3	3	3,0
28	BDV	2	2,5	3	2,875
	n.i.	2	3	3	3,0
42	BDV	2	2,5	3	2,875
	n.i.	2	3	3	3,0
52	n.i.	1	*	*	1,0
300	BDV	1	*	*	3,0

BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; * = nicht untersucht. In die statistische Datenauswertung eingegangen sind die Daten der 7, 28 und 42 Tage alten, sowohl BDV-infizierten als auch nicht infizierten Kulturen. Zusätzlich wurden 52 Tage alte, nicht infizierte Astrozyten untersucht, die vor der Testung in der indirekten Immunfluoreszenz für 3 Wochen nicht passagiert wurden. Weiterhin wurden 300 Tage alte, zwischenzeitlich kryokonservierte BDV-infizierte Astrozyten untersucht

Tabelle 28: Semiquantitative Auswertung der GLAST-Expression in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen

GLAST					
Tage in vitro	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
7	BDV	1	3	3	3,0
	n.i.	1	2,5	2,5	2,5
28	BDV	2	2,5	3	2,875
	n.i.	2	2,5	3	2,75
42	BDV	2	2,5	3	2,875
	n.i.	2	2,5	3	2,875
52	n.i.	1	*	*	*
300	BDV	1	*	*	1,5

BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; * = nicht

untersucht. In die statistische Datenauswertung eingegangen sind die Daten der 7, 28 und 42 Tage alten, sowohl BDV-infizierten als auch nicht infizierten Kulturen. Zusätzlich wurden 52 Tage alte, nicht infizierte Astrozyten untersucht, die vor der Testung in der indirekten Immunfluoreszenz für 3 Wochen nicht passagiert wurden. Weiterhin wurden 300 Tage alte, zwischenzeitlich kryokonservierte BDV-infizierte Astrozyten untersucht

Tabelle 29: Semiquantitative Auswertung der GLT-1-Expression in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen

GLT-1					
Tage in vitro	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
7	BDV	1	1	1	1,0
	n.i.	1	1	1	1,0
28	BDV	2	1	3	1,75
	n.i.	2	1	3	2,0
42	BDV	2	1	3	1,875
	n.i.	2	1	2,5	1,625
52	n.i.	1	*	*	*
300	BDV	1	*	*	2,0

BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; * = nicht untersucht. In die statistische Datenauswertung eingegangen sind die Daten der 7, 28 und 42 Tage alten, sowohl BDV-infizierten als auch nicht infizierten Kulturen. Zusätzlich wurden 52 Tage alte, nicht infizierte Astrozyten untersucht, die vor der Testung in der indirekten Immunfluoreszenz für 3 Wochen nicht passagiert wurden. Weiterhin wurden 300 Tage alte, zwischenzeitlich kryokonservierte BDV-infizierte Astrozyten untersucht

Tabelle 30: Semiquantitative Auswertung der Expression BDV-spezifischer Proteine in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen (positive Reaktion auf polyklonales Rattenserum)

BDV-Infektion (positive Reaktion auf polyklonales anti-BDV Rattenserum)					
Tage in vitro	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
7	BDV	1	1	1	1,0
	n.i.	1	0	0	0
28	BDV	2	1,5	2	1,75
	n.i.	2	0	0	0
42	BDV	2	1,5	3	2,25
	n.i.	2	0	0	0
52	n.i.	1	*	*	*
300	BDV	1	3	3	3,0

BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; * = nicht untersucht. In die statistische Datenauswertung eingegangen sind die Daten der 7, 28 und 42 Tage alten, sowohl BDV-infizierten als auch nicht infizierten Kulturen. Weiterhin wurden 300 Tage alte, zwischenzeitlich kryokonservierte BDV-infizierte Astrozyten untersucht

Tabelle 31: Quantitative Auswertung Expression der Astrozytenreifungs- und – differenzierungsmarker in primären BDV-infizierten und nicht infizierten Astrozytenkulturen

Quantifizierung der Astrozytenreifungs-/Astrozytendifferenzierungsmarker Expression							
Marker	Duplikate	Tag 7		Tag 28		Tag 42	
		BDV	n.i.	BDV	n.i.	BDV	n.i.
		%	%	%	%	%	%
Vimentin	1	96	97	94	96	99	97
	2	96	95	95	91	98	99
	∅	96	96	95	94	99	98
GFAP	1	91	91	87	89	78	97
	2	93	88	83	92	82	97
	∅	92	90	85	91	80	97
S100b	1	98	99	83	95	96	93
	2	98	97	81	94	93	96
	∅	98	98	82	95	95	95
Nestin	1	96	91	90	98	100	96
	2	95	93	96	99	97	99
	∅	95	92	93	99	99	97
A2B5	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	∅	0	0	0	0	0	0
GLAST	1	85	72	84	93	91	98
	2	86	79	86	85	97	99
	∅	86	75	85	89	94	98
GLT-1	1	13	14	22	3	5	10
	2	11	16	20	5	8	6
	∅	12	15	21	4	7	7
pRS	1	6	0	24	0	81	0
	2	8	0	59	0	55	0
	∅	7	0	42	0	68	0

∅ = arithmetischer Mittelwert aus Duplikat 1 und 2., BDV = BDV infiziert; n.i. = nicht infiziert

Tabelle 32: Semiquantitative Auswertung der BDV-N Expression (IF)

BDV-N					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
14	BDV	1	1	1	1,0
	n.i.	1	0	0	0
28	BDV	2	2	2,5	2,33
	n.i.	2	0	0	0
42	BDV	2	2,5	3	2,75
	n.i.	2	0	0	0

IF = indirekte Immunfluoreszenz; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte

Tabelle 33: Semiquantitative Auswertung der BDV-M-Expression (IF)

BDV-M					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
14	BDV	1	1	1	1,0
	n.i.	1	0	0	0
28	BDV	2	2	2	2,0
	n.i.	2	0	0	0
42	BDV	2	2	2	2,0
	n.i.	2	0	0	0

IF = indirekte Immunfluoreszenz; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellen; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte

Tabelle 34: Semiquantitative Auswertung der BDV-GP Expression (IF)

BDV-GP					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
14	BDV	1	0	0	0
	n.i.	1	0	0	0
28	BDV	2	0	0	0
	n.i.	2	0	0	0
42	BDV	2	0	0	0
	n.i.	2	0	0	0

IF = indirekte Immunfluoreszenz; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellen; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte

Tabelle 35: Semiquantitative Auswertung der GFAP-Expression (IF)

GFAP					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
14	BDV	1	3	3	3,0
	n.i.	1	3	3	3,0
28	BDV	2	3	3	3,0
	n.i.	2	3	3	3,0
42	BDV	2	3	3	3,0
	n.i.	2	3	3	3,0

IF = indirekte Immunfluoreszenz; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellen; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte;

Tabelle 36: Semiquantitative Auswertung der BDV-N vRNA Expression (FISH)

BDV-N –ssRNA (vRNA)					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
28	BDV	1	1	1,5	1,25
	n.i.	1	0	-	-
42	BDV	1	2	2	2,0
	n.i.	1	0	-	-

FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; -ssRNA: negativ sense RNA, entspricht viraler RNA (vRNA); p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden für BDV-infizierte Zellen die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; - = entfällt

Tabelle 37: Semiquantitative Auswertung der BDV-N mRNA (FISH)

BDV-N mRNA (BDV-N +ssRNA)					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
28	BDV	1	2	2,5	2,25
	n.i.	1	0	-	-
42	BDV	1	2	1,5	1,75
	n.i.	1	0	-	-

FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; +ssRNA = mRNA; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellen; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden für BDV-infizierte Zellen die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte

Tabelle 38: Semiquantitative Auswertung der BDV-M mRNA Expression (FISH)

BDV-M mRNA (BDV-Intron I +ssRNA)					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
28	BDV	1	0,5	0,5	0,5
	n.i.	1	0	-	-
42	BDV	1	0,5	0,5	0,5
	n.i.	1	0	-	-

FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; +ssRNA = mRNA; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellen; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden für BDV-infizierte Zellen die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; - = entfällt

Tabelle 39: Semiquantitative Auswertung der BDV-GP mRNA (FISH)

BDV-GP mRNA (BDV-Intron II +ssRNA)					
Tage p.i.	Infektion	n	Minimum	Maximum	Mittelwert
28	BDV	1	1	1	1,0
	n.i.	1	0	-	-
42	BDV	1	1,5	2	1,75
	n.i.	1	0	-	-

FISH = Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung; +ssRNA = mRNA; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; n = Anzahl der getesteten Zellkulturpräparationen; Minimum und Maximumwerte = pro Zellkulturpräparation wurden für BDV-infizierte Zellen die Marker für jeden Untersuchungszeitpunkt im Doppelansatz getestet, daraus errechnen sich die Mittelwerte; - = entfällt

Tabelle 40: Primär quantifizierte Kopienzahlen der Referenzgene GAPDH, SDHS und HPRT

Probe	Kopien GAPDH	Kopien SDHS	Kopien HPRT
Astrozyten 21 dpi	1.394.823	43.827	15.378
Astrozyten 28 dpi	1.381.615	50.380	27.890
Astrozyten 42 dpi	1.330.067	50.353	31.180
Astrozyten n.i.	1.341.249	67.190	27.200

dpi= days post infection, Tage nach BDV-Infektion; n.i.= nicht infiziert; Kopien = primär quantifizierte Kopienzahl; GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; SDHS = Succinat-dehydrogenase Komplex, subunit A; HPRT = Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase I. Für BDV-infizierte Astrozyten (21-42 dpi) wurde jeweils der Mittelwert aus drei real-time PCR Läufen ermittelt. In nicht infizierten Astrozyten wurde die Kopienzahl der Referenzgene nur bei einem real-time PCR Lauf bestimmt.

Tabelle 41: Nachweis der BDV-spezifischen mRNAs (qPCR)

normalisierte BDV-spezifische Kopienzahlen			
Transkript	Tage p.i.	n	geom. Mittelwert
BDV-N mRNA	21	1	21.964.078
	28	1	12.765.238
	42	1	7.291.256
	PK	1	17.431.299
BDV-M mRNA	21	1	483.798
	28	1	325.325
	42	1	265.630
	PK	1	462.371
BDV-GP mRNA	21	1	211.204
	28	1	194.632
	42	1	160.898
	PK	1	212.797

qPCR = quantitative PCR, real-time PCR; mRNA = +ssRNA; p.i. = post infectionem; BDV = Borna disease virus infiziert; n.i. = nicht infiziert; PK = Positivkontrolle, verwendet wurden zu 94% BDV-infizierte Astrozyten; n = Anzahl der getesteten Proben; geom. Mittelwert = geometrischer Mittelwert (Mittelwert aus den Doppelansätzen eines real-time PCR Laufs); BDV M mRNA: BDV-Intron I haltige +ssRNA; BDV-GP mRNA: BDV-Intron II haltige +ssRNA

Tabelle 42: Auswertung der BDV-Ausbreitung in primären Astrozytenkulturen mit und ohne Furin-Inhibitor

Auswertung der Inhibition der glia-glialen BDV-Ausbreitung					
Tage p.i.	Inhibitor	n	Minimum (%)	Maximum (%)	Mittelwert (%)
2	mit	2	2,6	3	2,8
	ohne	1	*	2,5	2,5
5	mit	2	4	3,4	3,7
	ohne	2	12,6	13,5	13
9	mit	1	4,2	*	4,2
	ohne	1	18,2	*	18,2
23	mit	2	1,9	7,3	4,6
	ohne	2	37	39,3	38,2

p.i. = post infectionem, bzw. Tage nach Mischen der Kulturen im Verhältnis 1:100 (BDV-infiziert:nicht infiziert); Inhibitor = Furin Inhibitor MI-0701, Verhindert die Spaltung des BDV-Glykoproteins in seine beiden funktionellen Untereinheiten BDV-GP-C und BDV-GP-N; % = Prozentsatz BDV-positiver Zellen; n = Anzahl getesteter Kulturen; Mittelwert = arithmetischer Mittelwert; * nicht getestet

9.5 ABBILDUNGEN

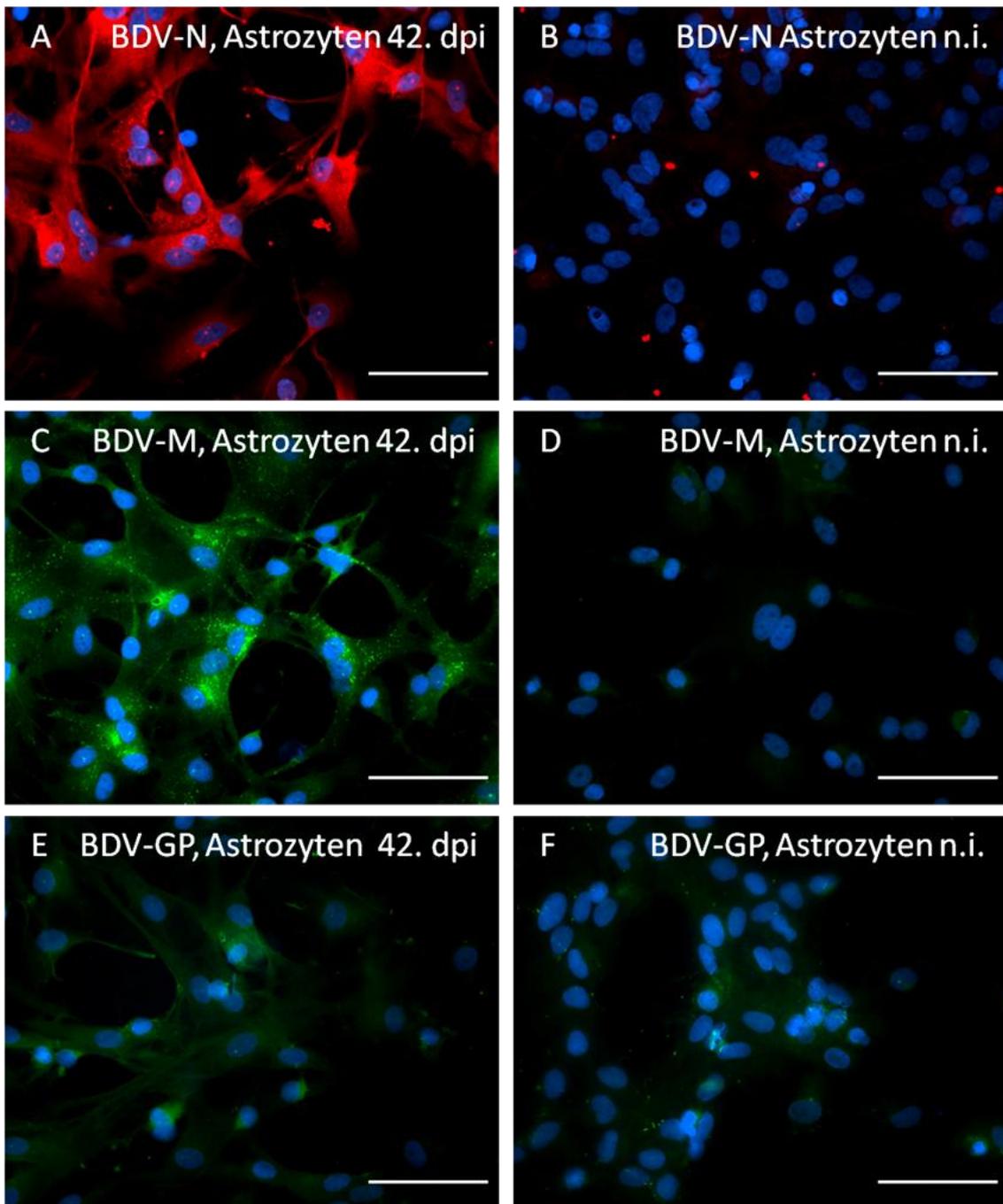


Abbildung 37: Gegenüberstellung des BDV-Proteinnachweises in BDV-infizierten und nicht infizierten (n.i.) primären corticalen Astrozyten (Negativkontrollen)

A-F: Nachweis von BDV-N (Nukleoprotein), BDV-M (Matrixprotein) und BDV-GP (Glykoprotein). Indirekte Immunfluoreszenz-Methode; dpi = *days in vitro*, Tage *in vitro*. Balken = 50 μ m

A: BDV-N Nachweis in BDV-infizierten Astrozyten am 42. dpi. Deutlich zu erkennende positive Reaktion

B: BDV-N Nachweis in nicht infizierten Astrozyten (Negativkontrolle)

C: BDV-M Nachweis in BDV-infizierten Astrozyten am 42 dpi. Deutlich zu erkennende positive Reaktion

D: BDV-M Nachweis in nicht infizierten Astrozyten (Negativkontrolle)

E: BDV-GP-Nachweis in BDV-infizierten Astrozyten am 42. dpi. Keine eindeutige positive Reaktion im Vergleich zur Negativkontrolle

F: BDV-GP Nachweis in nicht infizierten Astrozyten (Negativkontrolle)

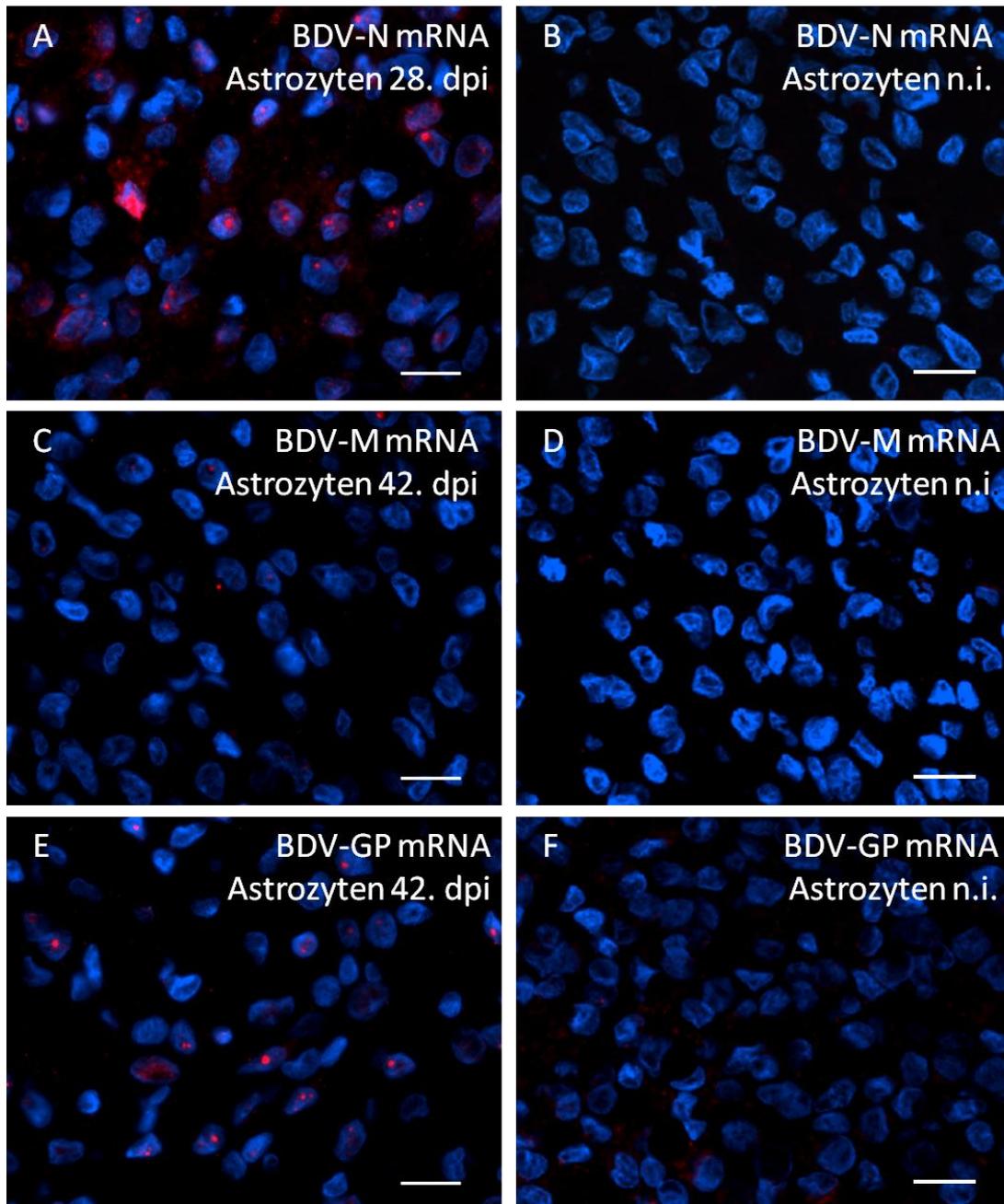


Abbildung 38: Gegenüberstellung BDV mRNA Nachweis in BDV-infizierten und nicht infizierten (n.i.) primären Astrozytenkulturen (Negativkontrollen)

A-F: Formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Schnitte von Zellpellets primärer corticale Astrozyten. Nachweis von BDV-N mRNA, BDV-M mRNA und BDV-GP mRNA; n.i. = nicht infiziert. dpi = days post infection (Tage nach Infektion); Methode: Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung (FISH) Balken 10 μ m

A: BDV-N mRNA Nachweis in BDV-infizierten Astrozyten am Tag 28 p.i.. Positive granuläre, selten diffuse Reaktionen im Zytoplasma und Zellkernen

B: BDV-N mRNA Nachweis in nicht infizierten Astrozyten (Negativkontrolle)

C: BDV-M mRNA Nachweis in BDV-infizierten Astrozyten am Tag 42 p.i.. Vereinzelt positive Reaktionen teils in den Kernen, teils im Zytoplasma

D: BDV-M mRNA Nachweis in nicht infizierten Astrozyten (Negativkontrolle)

E: BDV-GP mRNA Nachweis in BDV-infizierten Astrozyten am Tag 42 p.i.. Positive Reaktionen fast ausschließlich in den Zellkernen

F: BDV-GP mRNA Nachweis in nicht infizierten Astrozyten (Negativkontrolle)

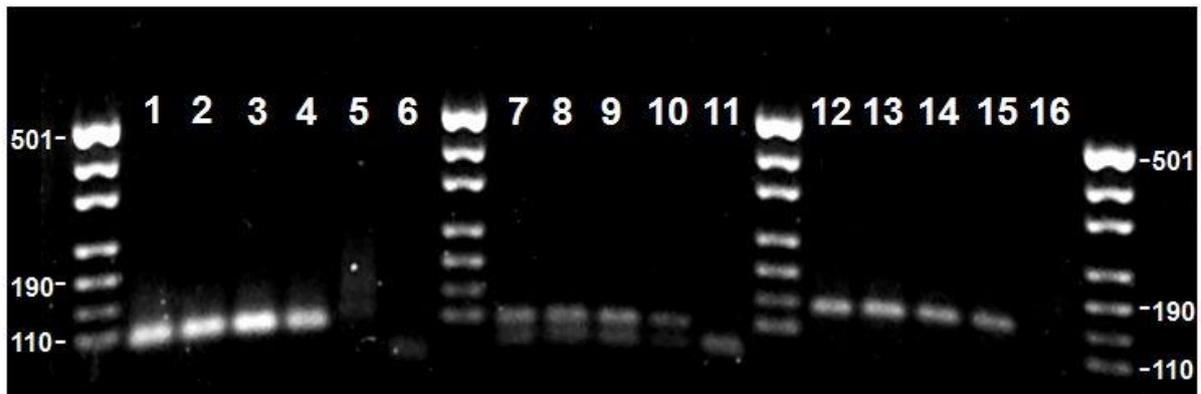


Abbildung 39: Nachweis BDV spezifischer real-time PCR Produkte

Die real-time PCR Produkte wurden auf ein 2%iges Agarosegel zusammen mit einem DNA-Größenmarker aufgetragen. **1** = Positivkontrolle BDV-N (96 bp Amplifikatgröße): zu 94% BDV-infizierte Astrozyten; **2** = BDV-N, Astrozyten 21 days post infection (dpi); **3** = BDV-N, Astrozyten 28 dpi; **4** = BDV-N, Astrozyten 42 dpi; **5** = Negativkontrolle, nicht infizierte Astrozyten; **6** = no template control (NTC); **7** = Positivkontrolle BDV-M (100 bp Amplifikatgröße), zu 94% BDV-infizierte Astrozyten; **8** = BDV-M, Astrozyten 21 dpi; **9** = BDV-M, Astrozyten 28. dpi; **10** = BDV-M, Astrozyten 42. dpi; **11** = NTC; **12** = Positivkontrolle BDV-GP (134 bp Amplifikatgröße), zu 94% BDV-infizierte Astrozyten; **13** = BDV-GP, Astrozyten 21. dpi; **14** = BDV-GP, Astrozyten 28. dpi; **15** = BDV-GP, Astrozyten 42. dpi; **16** = NTC

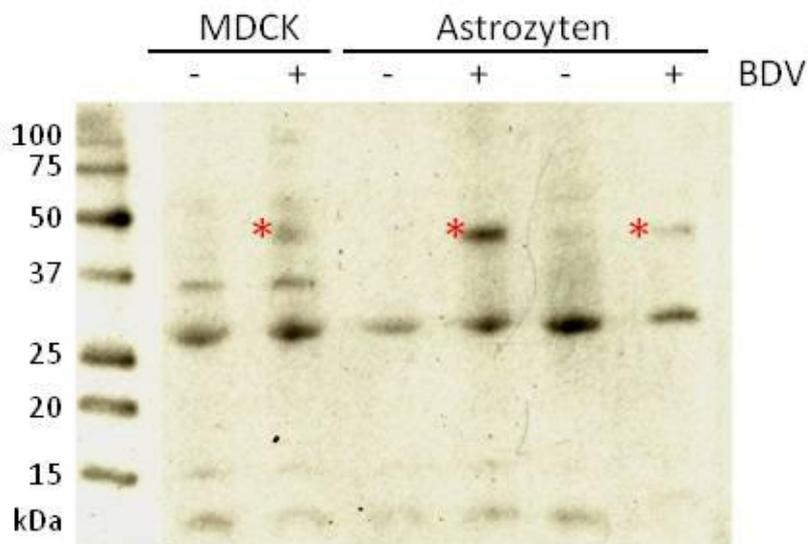


Abbildung 40: Western Blot Nachweis von BDV-GP in zu 94% BDV-infizierten primären Astrozyten und MDCK-Zellen (LABITZKE, 2011)

Proteinlysate wurden aus BDV-infizierten (+) und nicht infizierten (-) primären Astrozyten und MDCK-Zellen gewonnen. Zunächst wurde eine Lektinpräzipitation vorgenommen, um Glykoproteine anzureichern. Die Präzipitate wurden anschließend im Western Blot mittels α gp2 Antikörper auf das Vorhandensein von BDV-GP-C untersucht. dpi = *days post infection*, Tage nach Infektion; kDa = Kilodalton; rote Sterne = positiver Proteinnachweis bei 43 kDa in BDV-infizierten MDCK-Zellen und in zu 94% BDV-infizierten Astrozyten

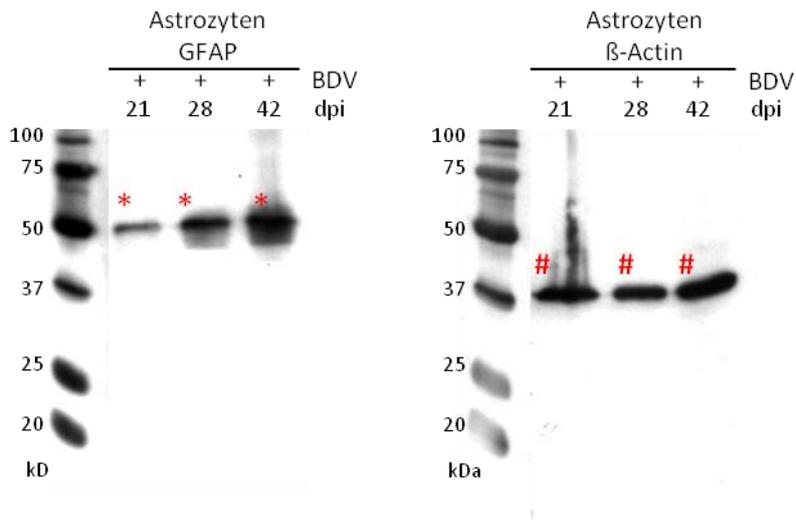


Abbildung 41: Western Blot Nachweis von GFAP und β -Actin in primären Astrozyten

Am Tag 21, 28 und 42 dpi. wurden Proteinlysate aus BDV-infizierten (+) primären Astrozyten gewonnen. Diese wurden im Western Blot auf das Vorhandensein von GFAP und β -Actin untersucht. dpi = *days post infection*, Tage nach Infektion; kDa = Kilodalton; rote Sterne = positiver GFAP-Nachweis bei 50 kDa; rote Rauten = positiver β -Actin Nachweis bei 42 kDa

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2'-FdC	2'-fluor-2'-Deoxycytidin
A2B5	<i>neuron cell surface antigen</i>
Abb	Abbildung
ABV	Aviäres Bornavirus
Aldh1L1	<i>aldehyde dehydrogenase 1family member L1</i>
AP	Alkalische Phosphatase
ARA-C	<i>1-β-D-arabinofuranosylcytosine</i>
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUG-Codon	Startsignal/Startkodon der Translation
B	<i>intercept</i> , Achsenabschnitt der Standardkurve der <i>real-time</i> PCR
BD	<i>Borna disease</i> , Bornasche Krankheit
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BDV	<i>Borna disease virus</i> , Virus der Bornaschen Krankheit
BDV-GP	BDV-Glykoprotein
BDV-GP-C	carboxy-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins
BDV-GP-N	amino-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins
BDV-L	<i>large protein</i> des BDV (virale Polymerase)
BDV-M	BDV-Matrixprotein
BDV-N	BDV-Nukleoprotein
BDV-P	BDV-Phosphoprotein
BDV-X	BDV-X Protein
BiP	<i>immunoglobulin heavy chain-binding protein</i>
BLBP	<i>brain lipid-binding protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD4-Rezeptor	<i>cluster of differentiation 4 receptor</i> , Immunzellrezeptor
CHO Zellen	<i>chinese hamster ovary</i> Zellen
cm ²	Quadratzentimeter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

CNPase	2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (or -phosphohydrolase)
CO ₂	Kohlendioxid
Con A	Concavalin A
Cos-7 Zellen	<i>Cercopithecus aethiops</i> , Grüne Meerkatzen Fibroblastenzelllinie
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
C _T	<i>threshold cycle</i> , Schwellenwert-Zyklus
C-terminal	carboxy-terminal
Cx	Connexin
CxCr4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Cy	<i>cyanine</i> , Zyanin
D	Dalton
Da	Dalton
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
dbcAMP	<i>dibutyryl cyclic AMP</i>
decRVKRcmk	<i>decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-Chloromethylketone</i>
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DIG	Digoxigenin
DIV	<i>day in vitro</i> , Tag <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco-Modifizierung von Eagle's Medium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>day post infection</i> , Tag nach Infektion
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDNRB	Endothelinrezeptor B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>Env</i> Protein	<i>envelope protein</i>
FAM	6-carboxyfluorescein
FAST Red TR	4-Chloro-2-Methylbenzen-diazonium-Hemizink-Chloridsalz
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Rinderserum
FCS	<i>fetal calv serum</i> , fetales Kälberserum
FFPE	formalin fixiert, in Paraffin eingebettet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FGF Rezeptor 3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FISH	Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
g/l	Gramm pro Liter
GABRA3	Untereinheit alpha-3 des GABAA Rezeptors
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gen. RNA	genomische RNA
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , Saures Gliafaserprotein
ggr.	geringgradig
GLAST	Glutamat Aspartat Transporter
GLT-1	Glutamat Transporter 1
GLU-R	Glutamat-Rezeptor
GLU-T	Glutamat-Transporter
GOI	<i>gene of interest</i>
GP	Glykoprotein
GS	Glutamin Synthetase
HB-Mix	Hybridisierungs-Mix
HCL	Chlorwasserstoff, Salzsäure
HELA Zellen	Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks
hgr.	hochgradig
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HNPP	2-hydroxy-3Naphthoesäure-2`-Phenylanilidphosphat
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase I
HTR1F	Serotoninrezeptor 1F
i.c.	intra cranial, in die Schädelhöhle
Icam-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IF	Indirekte Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgG (H+L)	Immunglobulin G (H = schwere (heavy) , L= leichte (light) Polypeptidkette)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

iNOS	induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase
IRC	<i>inter-run calibrator</i>
IRT	<i>inverted terminal repeats</i>
ISH	<i>In-situ-Hybridisierung</i>
IZ	intrazellulär
KA-1	Kainatrezeptor1
kB	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
L	<i>large protein</i> (virale Polymerase)
M	Matrixprotein
M	Steigung der Standardkurve
M	Molarität
mA	Milliampere
MAP-2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
MDCK-Zellen	<i>Madin Darby canine kidney</i> Zellen, Hundenieren Epithelzelllinie
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mgr.	mittelgradig
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
m-Msi-1	gliaspezifische RNA-bindende Protein
moi	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	messenger RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
MW	Molekulargewicht
N	Nukleoprotein
n	Anzahl

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

n.i.	nicht infiziert
NES	<i>nuclear export signal</i> , Kern-Export-Signal
NFIA	<i>Nuclear factor 1 A-type</i>
NFIB	<i>Nuclear factor 1 B-type</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NK	Nullkontrolle
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , Kern-Lokalisierungs-Signal
nm	Nanometer
NNS RNA Virus	<i>non-segmented, negativ single-stranded RNA virus</i> behülltes, einzelsträngiges, lineares RNA-Virus mit negativer Polarität des Genoms
NPC	<i>neural precursor cell</i>
NSS	<i>non-segmented, negativ single-stranded</i>
nt	Nukleotide
NTC	<i>no template control</i>
N-terminal	amino-terminal
NZ	Nitrozellulose
OF	Oberfläche
OL	humane Oligodendroglionlinie
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
P	Phosphoprotein
p	Primer
p	<i>p (probability)-value</i> , Signifikanzwert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
p.i.	<i>post infection</i> , nach Infektion
p.n.	<i>post natum</i> , nach der Geburt
P1	Passage 1, erste Zellkulturpassage
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-BSA	<i>phosphate buffered saline-bovine serum albumin</i>
PC	Pyruvat Carboxylase
PC	Protrotein Convertase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PHB-Mix	Prähybridisierungs-Mix
PKCε	Protein Kinase Cε
PNS	Peripheres Nervensystem
pRS	polyklonales (anti-BDV) Rattenserum
PTB	<i>polypyrimidin tract-binding protein</i>
PTG	<i>Protein targeting to Glycogen</i>
PTI-NB	<i>persistent, tolerant infection of the new-born</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
R ²	Korrelationskoeffizient
RAGE	<i>receptor of advanced glycation end products</i>
RM	Rückenmark
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNP	<i>ribonucleoprotein</i> , Ribonukleoprotein
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
s	<i>sense</i>
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDHS	Succinat- dehydrogenase Komplex, subunit A
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
si-RNA	<i>silencing RNA</i>
SPC	<i>subtilisin-like (or related) pro-protein convertase</i>
+ss RNA	positiv orientierte virale RNA (Antigenom und mRNA)
-ss RNA	negativ orientierte genomische virale RNA
SS	Schweineserum

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SSC	<i>standard saline citrat</i>
ssRNA	<i>singel strand RNA</i> , Einzelstrang RNA
SVR	Standard Verdünnungsreihe
TAMRA	dihydrocyclopyrroloindole tripeptide
TBS	<i>tris buffered saline</i> , trisgepufferte Kochsalzlösung
TBST	<i>tris buffered saline with Tween® 20</i> , trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20
TGF- β 1	<i>transforming growth factor β 1</i>
tgl.	täglich
TID50	<i>tissue culture infective dose 50</i>
TNT	<i>tunneling nanotubule</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
WB	Western Blot
X	X-Protein
x g	Gravitation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZS	Ziegenserum

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Doktormutter Prof. Dr. Christiane Herden danke ich für die Überlassung des Themas, für die vielen interessanten und freundlichen Diskussionen, für ihr stets offenes Ohr und für ihre Hilfsbereitschaft in Krisensituationen. Vielen Dank!

Dr. Sibylle Herzog, Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die Überlassung der BDV-infizierten MDCK-Zellen, für die Bestimmung des Virustiters, für ihre stete Hilfsbereitschaft und für viele praktische Tipps und interessanten Diskussionen rund um die Bornawelt.

Frau PD Dr. Barbara Ahlemeyer und Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt, Institut für Human-Anatomie, Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für ihre Hilfe bei der Astrozytenpräparation, für die Einführung in den Western-Blot und für das Gelingen des gemeinsamen Papers.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Garten möchte ich für die Überlassung des Furin-Inhibitors und für viele interessante Besprechungen danken.

Dr. Werner Hecht gilt mein Dank für 1001 praktischen Tipp und Weisheiten (nicht nur) zum molekularbiologischen Arbeiten, ohne die diese Arbeit sicher niemals entstanden wäre.

Silke Engel möchte ich für Ihre fröhliche, hilfsbereite Art und ihre Unterstützung bei molekularbiologischen Arbeiten und in sonstigen Lebenslagen danken. Danke für Deine Freundschaft, für viele Kaffchen und für entspannte Stunden in Holzheim, Davidsgrill, Domburg, ...

Tanja Labitzke gilt mein Dank für die Etablierung der Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierung bei Astrozyten und für die Durchführung von Zellkulturarbeiten im Rahmen ihrer Masterarbeit in Molecular and Cellular Biology.

Eveline Wentz danke ich für die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten, unter anderem für den Kurs „Pipettieren für Anfänger“.

Meiner Cousine Isabel Moritz (Issy) für den englischen Feinschliff der Summary: thanks a lot!

Weiterhin möchte ich allen Kollegen und Weggefährten vom Institut für Pathologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und für 5 tolle Jahre danken.

Nicole, Ellen, Claudia, Alexa, Nadine, Sandra und Brigitte, ich danke euch für eine wunderbare Studienzeit und für eure beständige Freundschaft!

Ganz herzlich möchte ich auch meinen Freunden danken, die zusammen mit mir durchgehalten und die Doktorandenzeit zu etwas ganz besonderem gemacht haben. Laurinchen, 1000 Dank für Deine Freundschaft, Deinen Humor und Deinen Optimismus mit dem Du jeder Krise den Anschein einer Katastrophe nimmst. Borschi, danke Dir für Deine liebevolle, geduldige, fröhliche und hilfsbereite Art und für überragende

DANKSAGUNG

Französischkenntnisse mit denen Du uns vorm Untergang bewahrt hast. Corinni, Deine kluge und warmherzige Art, Dein Pragmatismus und Dein Humor sind unbezahlbar. Danke dafür!

Meinen Eltern danke ich für Ihre uneingeschränkte Unterstützung und Liebe.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6443-3



9 783835 1964433