

Veränderungen der Expression von Neurofilamenten und des DISC1-Proteins im Gehirn nach  
neonataler Infektion von Lewis-Ratten mit dem Borna Disease Virus

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Kira Gehrke





Aus dem Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Institut für Immunologie  
des Friedrich-Loeffler-Institutes Tübingen  
Betreuer: Prof. Dr. Lothar Stitz

**und**

dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
Betreuer: Prof. Dr. Thomas Bilzer

**Veränderungen der Expression von Neurofilamenten und des DISC1-  
Proteins im Gehirn nach neonataler Infektion von Lewis-Ratten mit dem  
Borna Disease Virus**

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

Eingereicht von  
**Kira Gehrke**  
Tierärztin aus Bocholt  
Gießen 2011



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

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

Gutachter:

Prof. Dr. Lothar Stitz

Prof. Dr. Thomas Bilzer

Tag der Disputation: 13.12.2011



## Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen und Begriffe	VI
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Das Borna Disease Virus (BDV)</b>	<b>5</b>
2.1.1	Ätiologie	5
2.1.2	Pathogenese	6
2.1.3	Geschichte	8
2.1.4	Epizootiologie/Epidemiologie	9
<b>2.2</b>	<b>Die Bornasche Krankheit, Borna Disease (BD)</b>	<b>10</b>
2.2.1	Natürliche Infektion beim Tier	10
2.2.2	BDV-Infektion beim Menschen	11
2.2.3	Experimentelle Infektion mit dem BDV und Modell der neonatal infizierten Ratte	14
<b>2.3</b>	<b>Das neuronale Zytoskelett</b>	<b>16</b>
2.3.1	Aufbau und Entwicklung	16
2.3.2	Neurofilamente und ihre Phosphorylierung	17
<b>2.4</b>	<b>Schizophrenie und das DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia-1)-Protein</b>	<b>23</b>
2.4.1	Pathomechanismen der Schizophrenie	23
2.4.2	DISC1	27
2.4.2.1	DISC1-Expression	27
2.4.2.2	DISC1-Aufbau	28
2.4.2.3	DISC1-Zelluläre Lokalisation und Funktion	29
2.4.2.4	DISC1-Interaktionspartner	31

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>37</b>
3.1.1	Versuchstiere	37
3.1.2	Virus	37
3.1.3	Antikörper und Seren	37
3.1.4	Chemikalien, Lösungen, Puffer	38
3.1.4.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer für Standardfärbungen	38
3.1.4.2	Chemikalien, Lösungen, Puffer für immunhistochemische Färbungen	38
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>40</b>
3.2.1	Infektion	40
3.2.2	Gehirnentnahme und Präparation	40
3.2.3	Aufarbeitung der Gehirne	40
3.2.3.1	Einbetten in Paraffin	40
3.2.3.2	Paraffinschnitte	41
3.2.3.3	Entparaffinieren	42
3.2.4	Histologische Färbemethoden	42
3.2.4.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	43
3.2.4.2	Kresyl-Violett-Färbung	43
3.2.5	Immunhistochemische Färbungen	44
3.2.5.1	Nachweis von BDV-Antigen	48
3.2.5.2	Neurofilamente (NF)	48
3.2.5.3	DISC1-Protein und NUDEL (Nuclear distribution gene E homologue-like)-Protein	48
3.2.6	Eindecken	49
3.2.7	Auswertung der Standard- und immunhistochemischen Färbungen	49

## Inhaltsverzeichnis

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Klinik</b>	<b>51</b>
<b>4.2</b>	<b>Neuropathologie</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Infektionsausbreitung</b>	<b>54</b>
<b>4.4</b>	<b>Neurofilamente</b>	<b>57</b>
4.4.1	Phosphorylierte Neurofilamente (pNF)	57
4.4.2	Nicht phosphorylierte Neurofilamente (npNF)	66
<b>4.5</b>	<b>DISC1</b>	<b>81</b>
<b>4.6</b>	<b>NUDEL</b>	<b>87</b>
<b>4.7</b>	<b>Übersicht der Expression von p38, pNF, npNF, DISC1 und NUDEL</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>

## Abkürzungen und Begriffe

+	Positiv
-	Negativ
AG	Antigen
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATF4	Activation transcription factor-4
BD	Borna Disease
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BDV	Borna Disease Virus
CA	Cornu ammonis
CIC(s)	Zirkulierende(r) Immunkomplex(e)
DISC1	Disrupted-In-Schizophrenia-1
DG	Gyrus dentatus
ECLIA	Elektrochemischer Lumineszenzimmunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluorozytometrie
FEZ1	Fasciculation and elongation protein zeta-1
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
Grb2	Growth factor receptor bound protein-2
HC	Hippocampus
HE	Hämatoxylin-Eosin
IFAP	Intermediärfilament-assoziierte Proteine
IFT	Immunofluoreszenz-Mikroskopie
ITRs	Inverted terminal repeats
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	kilo Dalton
KH	Kleinhirn
KV	Kresyl-Violett
L	Virale Polymerase

## Abkürzungen und Begriffe

LIS1	Lissencephaly-1
M	Virales Matrixprotein
MAG	Myelin-assoziiertes Glycoprotein
MAGE	Melanoma-Gen-Familie
MAP	Microtubuli assoziierte Proteine
N	Virales Nukleoprotein
NBAE	Neugeboren Aerosol infiziert
NF	Neurofilamente
npNF	nicht phosphorylierte Neurofilamente
pNF	phosphorylierte Neurofilamente
NL	Lewis-Ratte
nm	Nanometer
NPI	Institut für Neuropathologie
NLS	Nukleus-Lokalisations-Signal
NUDEL	Nuclear distribution gene E homologue-like
ORF	Open reading frame, offener Leserahmen
OT	Objektträger
p.i.	post infectionem
PBMC(s)	Peripheral blood mononuclear cell (Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PZ	Purkinje-Zellen
PDE4B	Phosphodiesterase-4B
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SP	Schizophrenie
UPR	Unfolded Protein Response
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 1 Einleitung

Das Borna Disease Virus (BDV) ist ein behülltes, negativ-einzelsträngiges RNA-Virus mit ausgeprägtem Neurotropismus. Es gehört zur Familie der Bornaviridae in der Ordnung Mononegavirales. Lange Zeit galten nur Pferd und Schaf als natürliche Wirte, bei denen sich aufgrund der nicht-zytolytischen Eigenschaften des Virus und seines sehr langsamen Replikationszyklus häufig eine persistente Virusinfektion etabliert (Richt *et al.*, 1992). Kommt es zum Ausbruch der Krankheit, entwickeln diese Tiere eine progressiv verlaufende Meningopolioenzephalomyelitis, die Borna-Krankheit (BD) (Rott & Becht, 1995; Zwick, 1939). Heute wird die Krankheit überwiegend mit dem internationalen Terminus als Borna Disease bezeichnet. Inzwischen weiß man, dass das BDV experimentell sehr viele unterschiedliche Tierarten und Rassen, vom Huhn bis zum Primaten, infizieren kann (Rott & Becht, 1995; Stitz *et al.*, 1981), und auch Spontaninfektionen scheinen weiter verbreitet zu sein als ursprünglich angenommen (Bode *et al.*, 1994a; Caplazi *et al.*, 1994; Lundgren, 1992; Lundgren *et al.*, 1993; Malkinson *et al.*, 1993; Nakamura *et al.*, 1996; Weissenböck *et al.*, 1998). Unerklärlich ist dabei, warum es bei denselben Spezies zu völlig unterschiedlichen Krankheitsverläufen kommt, die von okkulten Infektionen/subklinischen Verläufen bis hin zu schweren Encephalitiden reichen, und warum es Tiere mit intracerebralen entzündlichen Infiltraten gibt, die klinisch völlig unauffällig sind (mündliche Mitteilung Bilzer & Stitz).

Die hohe Empfänglichkeit macht die experimentelle Infektion von Nagern zu einem attraktiven Modell für die Forschung. Die Ratte wird bisher am häufigsten eingesetzt und zeigt zwei unterschiedliche charakteristische Verläufe der Krankheit. Die Infektion der adulten immunkompetenten Ratte führt wie bei Schaf und Pferd zu einer lymphozytären Meningopolioenzephalomyelitis, an der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie Makrophagen beteiligt sind. Neuronen, besonders die des limbischen Systems, sind dabei die Hauptzielzellen des BDV. Klinisch entwickeln die Ratten eine biphasische Verhaltensstörung, bei der dem anfänglich aggressiven hyperaktiven Verhalten Somnolenz, Apathie und Depression folgen. Trotz dieses offensichtlichen entzündlichen Virus-Eliminationsversuchs bleiben die Tiere persistent infiziert. Bei der aerogenen/intranasalen Infektion von neonatalen immuninkompetenten (NBAE: newborn aerosol infected) Ratten erscheinen die Tiere immuntolerant und ohne Anzeichen BD-typischer Entzündungsreaktionen (Schepers, 2009; Sollmann, 2007) oder klinischer Symptome einer BD. Aber sie entwickeln Verhaltensanomalien, deren Pathogenese bis dato noch weitestgehend ungeklärt und deren weitere Ursachenforschung Ziel dieser Arbeit ist.

Vorhergegangene Arbeiten zeigten, dass beim Modell der neonatal infizierten Ratte nicht die Entzündungsreaktionen im Vordergrund standen, sondern andere vorwiegend hirnorganische Veränderungen. Dabei wurden Störungen von Myelinisierung, Synapsenformation und Neurotransmitterbildung, die Entwicklung einer Mikrogliose, die mit der Expression von Zytokinen einhergeht, sowie funktionelle Neuronenstörungen und Neuronenverluste beschrieben (Dietz & Pletnikov, 2003; Eisenman *et al.*, 1999; Gies *et al.*, 1998; Gies *et al.*, 2001; Hornig *et al.*, 1999; Ovanesov *et al.*, 2008; Pletnikov *et al.*, 2002a; Pletnikov *et al.*, 1999; Pletnikov *et al.*, 2002b; Schepers, 2009; Sollmann, 2007; Weissenböck *et al.*, 2000; Zocher *et al.*, 2000).

Auch hier bildeten Neuronen die Hauptzielzellen, daneben wurden aber auch Astrozyten und Oligodendrozyten mit dem BDV infiziert (Sollmann, 2007; Schepers, 2009). Im Vordergrund standen Mikrogliose und Astrozytenaktivierung (Astrogliose) und die deutliche Reduktion der Purkinje-Zellen im Kleinhirn. Außerdem fielen – allerdings nicht näher beschriebene – Axonschwellungen auf (Gies *et al.*, 1998). Eingehend untersucht wurden dagegen Veränderungen an Oligodendrozyten (Leukoenzephalopathie), die bisher in der Bornaforforschung eine untergeordnete Rolle spielten, weil sich keine sicheren Hinweise für eine BDV-Infektion dieser Gliazellpopulation ergeben hatten. In diesem Modell fielen sie besonders im Corpus callosum durch eine Tendenz zur Bildung von Clustern auf, begleitet von einer erhöhten Oligodendrozyten-Zellzahl. Die BDV-Infektion der Oligodendrozyten wurde durch Antikörpernachweis mithilfe von Olig2<sup>+</sup>-Zellen festgestellt (Schepers, 2009). Viele dieser Zellen zeigten lytische Veränderungen der Zellkerne. Zusätzlich fand sich eine gestörte und verminderte Myelinbildung mit fragmentierten oder perlschnurartigen Myelinscheiden (Schepers, 2009).

Die beschriebenen Funktionsstörungen und Strukturveränderungen führen zu der Frage nach den Ursachen der Zellstörungen und den Auswirkungen der BDV-Infektion der NBAE-Ratte auf die strukturellen Gehirnveränderungen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Störungen der Neuroentwicklung bei den NBAE-Ratten wiesen bemerkenswerte Parallelen mit einigen strukturellen Hauptmerkmalen menschlicher neuropsychiatrischer Störungen, wie Schizophrenie und affektive Krankheiten, auf (Altshuler *et al.*, 1987; Fish *et al.*, 1992; Soares & Mann, 1997). Post-mortem-Untersuchungen an Gehirnen von Schizophrenie erkrankten Patienten zeigten neuroanatomische Veränderungen wie Verschmälerung des Neuropils, Verminderung der Anzahl an Dendriten und deren Verzweigung, abnormale neuronale Migration, Zunahme an synaptischen Proteinen, erweiterte Ventrikel und Verminderung des Gehirnvolumens (Altshuler *et al.*, 1987;

Benes *et al.*, 1987; Eastwood *et al.*, 1995; Glantz & Lewis, 2000; Harrison & Weinberger, 2005; Krystal *et al.*, 2003; Krystal *et al.*, 1999).

Somit stellt sich die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen Borna Disease und Schizophrenie. Schon seit Mitte der 80er-Jahre (Rott *et al.*, 1985) besteht der Verdacht, dass das BDV an der Entwicklung von neuropsychiatrischen Erkrankungen des Menschen beteiligt sein könnte. Aber schon anlässlich der Influenza-Epidemie Anfang des 20. Jahrhunderts vermutete man, dass virale Infektionen Einfluss auf die Neurogenese des Gehirns nehmen könnten. 1926 erschien die Studie von Karl A. Menninger, die bei 50 Patienten den Zusammenhang zwischen ihrer neuropsychiatrischen Erkrankung (dementia praecox) und einer Influenza-Infektion ihrer Mütter während der Schwangerschaft zur Zeit der Influenza-Epidemie von 1918 bis 1919 (Menninger, 1994) herstellte. Später erschien eine weitere Studie zur pränatalen Influenza-Exposition während der Pandemien von 1954 und 1957 als Risikofaktor für die Entwicklung einer Schizophrenie der Nachkommen im Erwachsenenalter (Frutes & Limosin, 2008).

Dabei fand man heraus, dass das Risiko für die Nachkommen an Schizophrenie zu erkranken um das siebenfache steigt, wenn sich die Mutter während des ersten Schwangerschaftstrimesters mit Influenza infiziert. Während des zweiten Trimesters ist das Risiko immer noch um das dreifache erhöht.

Nicht nur die Influenza-Infektion wurde Gegenstand weiterer Untersuchungen, mittlerweile steht eine Reihe von viralen und nicht viralen Pathogenen im Verdacht an der Entwicklung von Schizophrenie beteiligt zu sein (Carter, 2008). Die Frage, die sich dabei immer wieder stellt, ist, durch welche Mechanismen diese Pathogene die Gehirnentwicklung stören. Sind es Läsionen, die das Virus direkt verursacht, oder führen die Pathogene zu einem „triggering“, das z. B. eine Autoimmunantwort während der neuronalen Entwicklung in einem genetisch vorbelasteten Gehirn auslöst.

Im Verlauf der Schizophrenie-Forschung wurden mehrere Gene identifiziert, die mit der Entstehung von Schizophrenie in Verbindung gebracht werden. Man fand heraus, dass diese Gene Bestandteil der Lebenszyklen unterschiedlichster Pathogene sind. So würde sich ein integriertes transgenomisches Netzwerk formen, an dem die Gene des Wirtes, die Pathogene und die dazugehörigen Proteine beteiligt sind. Diese Interaktionen könnten die Entwicklung von Schizophrenie unterstützen oder sogar herbeiführen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll deshalb die Frage beantwortet werden, ob die BDV-Infektion der Ratte ein geeignetes Modell darstellt, um die Beteiligung einer Virusinfektion mit einem nicht-zytopathogenen, jedoch stark neurotrophen Virus, an der Entstehung einer

Schizophrenie zu demonstrieren. Des Weiteren soll untersucht werden, ob dieses Modell auch dazu dienen kann, solche pathogenen Veränderungen im Gehirn, die bei anderen Spezies und durch Infektion mit anderen Viren zu Schizophrenie führen können, aufzudecken.

Dafür haben wir strukturelle Veränderungen neonatal BDV-infizierter Gehirne untersucht und die Auswirkungen der Infektion auf Neurofilamente und andere neuronale Proteine charakterisiert.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen BDV assoziierten Mechanismen und der Entstehung einer Schizophrenie zu klären, wurden u. a. die Wechselwirkungen mit einem Schlüsselprotein der Schizophrenie, dem DISC1-Protein, untersucht. Zur Verfügung standen uns Versuchstiere, deren aerogene BDV-Infektion im Rahmen dieser Studie im Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. L. Stitz (Institut für Immunologie) stattfand. Diese Tiere erwiesen sich in allen Voruntersuchungen als immuntolerant gegenüber dem BDV (mündliche Mitteilung Stitz).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Borna Disease Virus (BDV)

#### 2.1.1 Ätiologie

Das BDV gehört zur Ordnung der *Mononegavirales* und ist der Prototyp der Familie der *Bornaviridae*. Es handelt sich um ein behülltes, einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Virus mit negativer Polarität und einer Genomgröße von 8,9 kb (Perez *et al.*, 2003). Es existieren die Referenzstämme V und der Stamm Hessen 80 (He-80). Alle bisher untersuchten Virusstämme zeigten hohe genetische Stabilität und Homologie. Man geht davon aus, dass es sich um ein einheitliches Virus (ein Serotyp) handelt, aber an unterschiedliche Wirtssysteme adaptierte Stämme zur Infektion verschiedener Spezies führen können. Die Genomorganisation ist ähnlich wie bei Viren der Familie *Rhabdoviridae*, die Replikation findet jedoch im Kern mit komplexer Genomexpression und komplizierten splicing-Mechanismen statt. Das BDV ist labil gegenüber Hitze und Säurebehandlung. Es ist *in vitro* nicht zytolytisch.

Elektronenmikroskopisch sieht man eine sphärische Morphologie mit einem Durchmesser von 70 bis 130 nm, der elektronendichte Kern mit einer Größe von 50 bis 60 nm ist von einer äußeren Hülle umgeben, die mit ca. 7 nm langen Spikes bedeckt ist (Kohno *et al.*, 1999).

Die RNA-Genomsequenz des BDV enthält sechs sich teilweise überlappende offene Leserahmen (ORFs), die in drei Transkriptionseinheiten angeordnet sind. Das Genom codiert für sechs unterschiedliche Proteine:

1. Nucleoprotein N (p38/p40): besitzt ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und ist wichtig für den Kernimport und -export; es ist am stärksten immunogen, da schon in frühen Infektionsphasen p38/40-Antikörper (AK) nachgewiesen werden können;
2. P Protein (p24): stellt einen Co-Faktor für die Transkription und Replikation dar;
3. X Protein (p10): spielt eine Rolle bei der Viruspersistenz;
4. Matrixprotein (p16): dient der Membranstabilisierung und unterstützt den Kontakt zwischen Wirtszelle und Virus;
5. Glycoprotein (gp94): stellt den Erstkontakt zwischen Wirtszelle und Virus her und vermittelt die Endocytose;
6. Polymerase L (p190): repräsentiert die RNA-abhängige RNA-Polymerase und spielt vermutlich auch eine Rolle bei der BDV-Wirtszell-Interaktion;

### 2.1.2 Pathogenese

Vermutlich verläuft die Infektion mit dem BDV bei den meisten Individuen klinisch inapparent und führt unter natürlichen Bedingungen zur persistierenden Virusinfektion. Die Infektion des Gehirns verläuft hochwahrscheinlich olfaktorisch über Inhalation und axonale Wanderung des Virus in den freien Hirnnerven des Nasen-Rachen-Raumes (Bilzer *et al.*, 1995). Bei natürlich infizierten Pferden tritt im frühen Verlauf der Infektion eine entzündliche Reaktion im olfaktorischen Bulbus auf (Joest, 1911; Ludwig *et al.*, 1988).

Der Ribonukleoprotein-Komplex, der die kleinste Einheit der Infektiosität darstellt, wird durch den Zusammenschluss von Nukleokapsid mit den viralen Polypeptiden des Polymerase-Komplexes gebildet und enthält die genetischen Informationen. Der Ribonukleoprotein-Komplex ist aktiv an Transskription und Replikation beteiligt.

Die Übertragung des BDV erfolgt durch direkten Zell-zu-Zell-Kontakt (Carbone *et al.*, 1993) und das BDV wird durch einen bisher ungeklärten Mechanismus in die Wirtszelle eingeschleust (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998).

Eines der Hauptcharakteristika des BDV ist seine Persistenz. Diese wird gewährleistet durch die funktionellen Eigenschaften der verschiedenen Virusproteine, durch genomische Besonderheiten sowie durch die nicht zytopathogenen Eigenschaften des Virus (Ludwig *et al.*, 1988). Beispielhaft sind folgende Mechanismen zu nennen, die zur Persistenz führen: Die Replikationsrate wird nach Infestation in die Wirtszelle gedrosselt (Schwardt *et al.*, 2005); nach mehrfacher Zellpassage sind die Genom-Enden um ein bis vier Nucleotide gekürzt; diese unvollständigen "inverted terminal repeats" sind weniger infektiös und führen somit zur nicht zytolytischen Eigenschaft des Virus (Schneider *et al.*, 2005); die Herunterregulierung des Glycoproteins G auf der Wirtszellmembran dient der Vermeidung der Erkennung durch das Immunsystem des Wirts (Eickmann *et al.*, 2005); das Nucleoprotein N verlangsamt die Zellteilung der Wirtszelle (Planz *et al.*, 2003). Trotzdem ist diese Persistenz angesichts der heftigen Immunreaktionen erstaunlich, umso mehr, als sich das BDV durch Modulationen der Immunantwort völlig aus dem Gehirn BDV-infizierter Ratten eliminieren lässt (Nöske *et al.*, 1998).

Das BDV besitzt einen ausgeprägten Neurotropismus. Innerhalb des ZNS repräsentieren Neuronen die Hauptzielzellen des BDV, in späteren Infektionsstadien werden auch Gliazellen infiziert. Im weiteren Verlauf kann das BDV – allerdings ausschließlich in immun-kompromittierten Tieren – auch in nicht neuronales Gewebe einwandern (Herzog *et al.*,

1984). An der Beschränkung des Virus auf das Nervensystem scheinen Antikörper produzierende B-Lymphozyten beteiligt zu sein (Stitz *et al.*, 1989). Prädilektionsstelle des BDV sind Neuronen, vor allem im Limbischen System mit Hippocampus, Amygdala, Thalamus und Hypothalamus. Die Ausbreitung des BDV über olfaktorische Neurone ins Limbische System ist am Beispiel der Ratte ausführlich demonstriert worden (Carbone *et al.*, 1987; Morales *et al.*, 1988).

Die klassische BD ist eine immunpathologische Erkrankung, deren Zusammenhänge mit dem Modell der adult-infizierten Lewis Ratte eingehend erklärt wurden. Bei der Immunzellinfiltration des ZNS spielen vor allem Lymphozyten eine große Rolle (Morales *et al.*, 1988; Narayan *et al.*, 1983; Rott *et al.*, 1985; Stitz *et al.*, 1981; Stitz *et al.*, 1989). Dabei wird den CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten die größte pathogenetische Bedeutung zugeschrieben (Stitz *et al.*, 1991a). Sie rufen im ZNS-Gewebe destruktive Veränderungen hervor, die auf ihren zytotoxischen Eigenschaften beruhen (Bilzer *et al.*, 1995; Bilzer & Stitz, 1994; Stitz *et al.*, 2002; Stitz *et al.*, 1995). Es gibt dabei einen direkten Zusammenhang zwischen der Schwere des Krankheitsverlaufes und der Infiltration mit CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Furrer *et al.*, 2001). CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten haben hingegen eine wesentliche Bedeutung bei der Sensibilisierung und spezifischen Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Nöske *et al.*, 1998). Aktivierte T-Lymphozyten sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Hickey, 1991; Hickey, 1999; Wekerle *et al.*, 1987). Dabei helfen Adhäsionsmoleküle, die den Kontakt zwischen Immunzelle und Endothelzelle herstellen (Planz *et al.*, 1995; Raine *et al.*, 1990). Chemokine, gebildet von Mikrogliazellen, Astrozyten und infiltrierenden Makrophagen, rekrutieren die Immunzellen zum Ort der Entzündungsreaktion (Morimoto *et al.*, 1996). Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Erhaltung der BDV-Enzephalitis ist die Expression von Histokompatibilitätsantigenen (MHC-Antigenen) in den entzündlichen Infiltraten. MHC-Moleküle gewährleisten die Antigen-Erkennung und die spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen: MHC-I-Moleküle präsentieren die Antigene den CD8<sup>+</sup> T-Zellen und MHC-II-Moleküle präsentieren die Antigene den CD4<sup>+</sup> T-Zellen. MHC-I-Moleküle werden auf Zellen des ZNS-Gewebes minimal exprimiert, und MHC-II-Moleküle finden sich normalerweise gar nicht auf ZNS-residenten Zellen (Wong *et al.*, 1985). Bei BDV infizierten Ratten exprimieren Neuronen und Astrozyten MHC-I-Moleküle (Bilzer & Stitz, 1994; Planz *et al.*, 1993). Planz *et al.* (1993) zeigten, dass MHC-I-exprimierende Neuronen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen lysiert werden. Dies erklärt zum Teil den Neuronenverlust durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Bilzer & Stitz, 1994). Eine weitere regulierende Rolle spielen Zytokine und deren Rezeptor-

ren beim Zusammenspiel der Lymphozyten und akzessorischen Zellen. Es ist bekannt, dass sich das Zytokinprofil von der akuten hin zur chronischen Krankheitsphase ändert. In der chronischen Krankheitsphase bewirken die Zytokine eine Zunahme von Antikörperproduzierenden Plasmazellen (Hatalski *et al.*, 1998; Narayan *et al.*, 1983; Stitz *et al.*, 1995). Diese Plasmazellen sind vermutlich verantwortlich für die Beschränkung des Virus auf neuronales Gewebe (Stitz *et al.*, 1998). Trotz ausgeprägter Immunantwort gelingt es nicht, das Virus zu eliminieren. In der chronischen Infektionsphase besitzen die Lymphozyten eine verminderte Zytotoxizität (Sobbe *et al.*, 1997). Möglicherweise werden die Lymphozyten im Verlauf der BDV-Infektion anergisch oder werden aufgrund eines Mangels an kostimulatorischen Signalen in die Apoptose geführt (Karpus *et al.*, 1994; Khoury *et al.*, 1995).

Kommt es zur klinischen Manifestation der Krankheit, entsteht in den typischen Fällen der BD eine (Meningo) -Enzephalitis oder -Enzephalomyelitis. Zur Klärung der Pathogenese werden in neuerer Zeit funktionelle Interaktionen von Virusantigen mit Neurotransmitterrezeptoren des Limbischen Systems während der Aktivierungsphase der Infektion diskutiert. Möglicherweise ist das BDV in der Lage, die rezeptorvermittelte Neurotrophin-Antwort von "Brain-derived neurotrophic factor" (BDNF) zu hemmen. BDNF ist ein Neurotrophin und ein essenzieller Faktor für neuronales Wachstum und Synaptogenese (Hans *et al.*, 2004).

### 2.1.3 Geschichte

Berichte über die BD, auch genannt seuchenhafte Hirn-Rückenmark-Entzündung der Pferde, Meningoenzephalomyelitis simplex enzootica equorum, Polioenzephalomyelitis non purulenta infectiosa, Hitzige Kopfkrankheit oder Rasender Koller, mit exakter klinischer Beschreibung aus verschiedenen europäischen Ländern, gehen bis ins 17. Jahrhundert zurück. Um 1895 trat sie bei Pferden und Schafen in der Amtshauptmannschaft Borna in einer derart massiven Form auf, dass ihr ein Großteil der Pferde zum Opfer fiel. Nach diesem Seuchenzug in der Stadt Borna und Umgebung wurden der Erreger und die durch ihn verursachte Krankheit benannt (Übersicht in Dürrwald & Ludwig (1997)).

Joest und Degen beschrieben 1911 die Pathogenese und postmortale Diagnose der BD, inklusive der nach ihnen benannten intranukleären Einschlusskörperchen, welche lange Zeit als pathognomisch für diese Krankheit galten (Joest, 1911).

1925 wurde durch Zwick und Seifried die Krankheit durch Hirnmaterial erkrankter Pferde experimentell auf kleine Versuchstiere übertragen und damit erstmals die Infektiosität nachgewiesen (Zwick, 1939).

Intensive Forschungsarbeit wurde in den Folgejahren an verschiedenen internationalen Instituten durchgeführt, um der Natur des Erregers näherzukommen. Ein großer Schritt in diese Richtung war mit der Adaption des Erregers an Zellkulturen von Schaf und Kaninchen sowie über Kokultivierung an verschiedene permanente Zellkulturen gelungen. 1929 isolierte man den ersten Referanzstamm (strain V) aus einem kranken Pferd (Übersicht in Dürrwald & Ludwig (1997)).

Der Beweis, dass es sich bei der Bornavirus-Infektion um eine persistente Infektion handelt, wurde später in Infektionsexperimenten mit Tupaias bewiesen (Sprankel *et al.*, 1978). In Ratte und Maus konnten durch den Bornastamm V tolerierte, persistente Infektionen induziert werden. Durch die Pathogenesestudien dieser Experimente konnte auch die intraaxonale Wanderung des Erregers zum Gehirn nachgewiesen werden (Carbone *et al.*, 1987; Morales, 1988). Hierbei ergaben sich erstmals wissenschaftlich verwertbare Hinweise auf die Interaktion des infektiösen Materials mit regulatorischen Zentren des Limbischen Systems, die zu Verhaltensänderungen mit messbaren Abweichungen bei den infizierten Tieren führten. Antigennachweis sowie morphologische Abweichungen entzündlicher Natur in Gebieten des Limbischen Systems untermauerten diese Befunde. Parallel dazu liefen Screeninguntersuchungen an Menschen, wobei verschiedenen Autoren der Nachweis einer Immunreaktion gegenüber dem Erreger gelang (Bode, 1995; Chalmers *et al.*, 2005; Ludwig, 2006; Planz & Stitz, 2005; Richt & Rott, 2001; Rott *et al.*, 1985; Schwemmler *et al.*, 1999; Staeheli *et al.*, 2000). Die experimentelle Infektion der Ratte wurde zum wichtigsten Modell, um die Immunpathogenese von BDV und die Störungen der neurologischen Entwicklung bei viraler Ätiologie zu studieren (Bilzer & Stitz, 1996; Briese *et al.*, 1999; Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Stitz *et al.*, 1995).

### 2.1.4 Epizootiologie/Epidemiologie

Hauptwirte des BDV sind wahrscheinlich Pferd und Schaf. Die natürliche Infektion ist aber bei einer ganzen Reihe von Säugetierarten möglich. Epidemiologische Datenerhebungen belegen, dass das Wirtsspektrum (Ludwig & Bode, 2000; Lundgren *et al.*, 1993; Rott & Becht, 1995) sowie die geografische Verbreitung des BDV wesentlich umfangreicher sind als an-

fänglich vermutet. Die experimentelle Infektion ist für fast alle Tierarten möglich, einschließlich Primaten (Stitz *et al.*, 1981). Als Erregerreservoir werden Nager, z. B. Spitzmäuse (Hilbe *et al.*, 2006; Puorger *et al.*, 2010; Sierra-Honigmann *et al.*, 1993) und Vögel (Berg *et al.*, 2001) diskutiert.

Wahrscheinlich sind bei erkrankten Tieren alle Sekrete und Exkrete virushaltig. BDV-RNA konnte in nasalen und konjunktivalen Sekreten und Speichel nachgewiesen werden (Herzog *et al.*, 1997; Richt *et al.*, 1993). Eine Tröpfcheninfektion wird vermutet. Im frühen Verlauf der Infektion tritt eine entzündliche Reaktion mit Ödem in den olfaktorischen Bulbi von natürlich infizierten Pferden auf (Joest, 1911; Ludwig *et al.*, 1988). Außerdem findet bei Kohabitation von persistent infizierten Trägertieren mit naiven Ratten eine effektive BDV-Transmission statt, wahrscheinlich durch nasale Infektion mit dem frischen Urin der Trägerratten, in dem reichlich Virus präsent ist (Sauder & Staeheli, 2003). Die Verbreitung von BDV durch olfaktorische Neuronen zum limbischen System, die in Ratten gezeigt wurde (Carbone *et al.*, 1987; Morales, 1988), spricht ebenfalls für diese Transmissionsroute.

Inzwischen wird auch vermutet, dass das Virus Menschen infizieren kann; die pathogenetische und kausale Bedeutung des Virus im Zusammenhang mit psychiatrischen Krankheitsbildern wird jedoch kontrovers diskutiert (Chalmers *et al.*, 2005; Planz & Stitz, 2005). Aufgrund von Immunkomplexmessungen geht Ludwig (2006) davon aus, dass man beim Menschen mit einer Durchseuchung von 30 % rechnen müsse. Da die Immunkomplexmessungen zur Detektion einer humanen Infektion mit dem BDV jedoch sehr ungenau und schwierig sind, sind diese nur schwer interpretierbar. Somit bleibt das zoonotische Potential des Virus fraglich (Planz & Stitz, 2005; Richt & Rott, 2001; Schwemmler *et al.*, 1999; Staeheli *et al.*, 2000).

## **2.2 Die Bornasche Krankheit, Borna Disease (BD)**

### **2.2.1 Natürliche Infektion beim Tier**

Am besten dokumentiert ist die BDV-Infektion bei den natürlichen Wirten Pferd, Schaf und Katze sowie den Nagetieren, die experimentell infiziert als Modell für die Forschung dienen. Beim Pferd verlaufen die meisten Fälle der ansteckenden Gehirn-Rückenmark-Entzündung subklinisch mit persistenter Infektion. Kommt es zum Ausbruch der Krankheit, so beginnt diese nach einer Inkubationszeit von circa vier Wochen mit unspezifischen Symptomen wie Fieber und Inappetenz. Im weiteren Verlauf kommt es zu neurologischen Störungen wie Be-

wusstseinsstörungen, Störungen der Propriozeption, Ataxie, plötzlichem Zusammenbrechen, Kreisbewegungen, Drängen gegen Hindernisse und Visumverlust. Im Endstadium treten teilweise Konvulsion und Paralyse auf (Rott & Becht, 1995).

Histopathologisch ist die Krankheit gekennzeichnet durch eine nichteitriges Meningoenzephalomyelitis mit perivaskulären Infiltraten aus Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen (Bilzer *et al.*, 1995; Bilzer & Stitz, 1996; Caplazi & Ehrensperger, 1998; Gosztonyi & Ludwig, 1984). Diese Zellen migrieren zum Teil in das ZNS-Parenchym. Die inflammatorischen Kennzeichen beim Pferd entsprechen den histologischen Befunden in der akuten und subakuten Phase bei adult infizierten Ratten (Stitz *et al.*, 1993). Zusätzlich besteht eine reaktive Astroglie. In Neuronen, seltener in Gliazellen, finden sich azidophile intranukleäre Einschlusskörperchen, die akkumulierten Virusproteinen entsprechen (Joest-Degen-Einschlusskörperchen) (Rott & Becht, 1995).

Beim Schaf löst die BDV-Infektion klinisch und histopathologisch die gleichen Symptome aus wie beim Pferd, jedoch mit einer geringeren Mortalitätsrate (Rott & Becht, 1995). Bei der Katze steht das Virus unter Verdacht, der Verursacher der sogenannten „Staggering Disease“ zu sein. Das Krankheitsbild besteht aus einer nichteitriges Meningoenzephalomyelitis mit Ataxie und Verhaltensstörungen (Kronevi *et al.*, 1974; Lundgren, 1992; Reeves *et al.*, 1998).

### 2.2.2 BDV-Infektion beim Menschen

Neben vielen anderen Faktoren, die unter Verdacht stehen das zentrale Nervensystem infizieren und somit der Auslöser für neurologische Erkrankungen sein zu können, ist das BDV in der Lage, speziell in evolutionär sehr alten Gehirnstrukturen, Dysfunktionen hervorzurufen. Die Verhaltensstörungen, die das BDV auslöst, ähneln dabei denen mental-psychischer Störungen (Bode & Ludwig, 2001). Dazu gehören z. B. Hyperaktivität, Stereotypien, Angstzustände und abnormales Sozialverhalten (Briese *et al.*, 1999; Pletnikov *et al.*, 2002b).

Sowohl bei natürlicher als auch bei experimenteller BDV-Infektion neugeborener Ratten (Dittrich *et al.*, 1989; Hirano *et al.*, 1983; Narayan *et al.*, 1983) manifestiert sich die Krankheit mit einem breiten Spektrum von Symptomen. Diese variieren von subtilen bis hin zu schweren Verhaltensänderungen (Ludwig & Bode, 2000). Das Virus verursacht neben der Verhaltensmodulation auch Beeinträchtigungen höherer Hirnfunktionen wie Lernen und Gedächtnis (Sprankel *et al.*, 1978; Stitz *et al.*, 1981). Eine signifikante Antigen-Akkumulation kann in den bevorzugten Gehirnregionen, wie dem Limbischen System, gefunden werden.

Das Wissen, das man über die BDV-Infektion beim Tier hatte, löste Nachforschungen an humanen Infektionen aus und führte in den letzten 14 Jahren zur Detektion spezifischer Marker für die BDV-Infektion bei psychiatrischen Patienten (Bode, 1995; Bode *et al.*, 1996; Rott *et al.*, 1985). So kam man zu der Vermutung, dass das BDV mit humanen psychiatrischen Krankheiten in Verbindung stehen könnte. In der Tat weist das klinische Bild der BD bei Versuchstieren – soweit vergleichbar – interessante Parallelen zu bestimmten neuropsychiatrischen Erkrankungen des Menschen wie Schizophrenie, depressiven Erkrankungen und bipolaren affektiven Störungen auf.

Obwohl mittlerweile BDV-Antikörperreaktionen und möglicherweise auch Virusbestandteile auch beim Menschen nachgewiesen zu sein scheinen, ist deren Krankheitswert völlig unklar. Daher wird der kausale Zusammenhang zwischen möglicher Infektion und psychiatrischen Störungen sehr kontrovers diskutiert (Hornig *et al.*, 2001; Planz & Stitz, 2005; Richt & Rott, 2001; Schwemmler *et al.*, 1999; Staeheli *et al.*, 2000). Derzeit gibt es kein validiertes System, um BDV-Infektionen zu diagnostizieren. Darüber hinaus gab es in der Vergangenheit offenbar viele falsch-positive Ergebnisse, was zu weiteren Kontroversen Anlass gab.

Im Folgenden sollen kurz die diagnostischen Tests vorgestellt werden, mit denen man versucht hat, BDV-AK oder BDV-RNA bei psychiatrischen Patienten nachzuweisen. Das Hauptaugenmerk liegt dabei auf der kritischen Auseinandersetzung mit der Sensitivität und Spezifität dieser Tests.

Serumantikörper (AK) gegen BDV wurden erstmals 1985 bei Patienten mit bipolaren Störungen gefunden (Rott *et al.*, 1985). Heute stehen folgende Testverfahren für den Nachweis von BDV-AK zur Verfügung: Immunofluoreszenz-Mikroskopie (IFT), Western Blot (WB) und verschiedene Enzyme Linked Immunoabsorbant Assays (ELISAs). Beim IFT ist eine Abgrenzung zwischen den BDV-spezifischen AK und Kreuzreaktionen mit Autoimmun-AK, welche bei psychiatrischen Erkrankungen regelmäßig vorkommen, nicht möglich (Ganguli *et al.*, 1992). Um dieses Problem zu lösen, verwendet man beim WB verschiedene Antigene (AG) (Fu *et al.*, 1993; Herzog *et al.*, 1997; Sauder *et al.*, 1996; Waltrip *et al.*, 1995). Seropositivität soll dann vorliegen, wenn mehr als nur ein BDV-Protein von in humanem Serum befindlichen AK erkannt wird. Bei der natürlichen Infektion der Pferde konnten grundsätzlich zwei Proteine (N und P) nachgewiesen werden (Waltrip *et al.*, 1995).

Beim ELISA wird rekombinantes gereinigtes virales Protein verwendet, welches das Risiko einer Kreuzreaktivität vermindert. Des Weiteren versucht man die Sensitivität durch monoklonale AK und rekombinantes Virusprotein zu erhöhen (Chen *et al.*, 1999; Fu *et al.*, 1993;

Fukuda *et al.*, 2001; Kishi *et al.*, 1995; Yamaguchi *et al.*, 1999).

Trotzdem bleibt die Sensitivität und Spezifität serologischer Testsysteme weiter fraglich, da die humanen-BDV-AK ihr AG im Vergleich zu tierischen AK mit sehr geringer Affinität binden (Allmang *et al.*, 2001). Dies spricht für eine nicht spezifische Bindung bei allen serologischen Verfahren, in denen humanes Serum verwendet wird. Billich *et al.* (2002) postulieren trotzdem, dass die AK mit geringer Affinität, welche bei psychiatrischen Patienten gefunden wurden, in der Tat spezifisch für BDV oder BDV-ähnliche Agenzien sind.

Zur Detektion von BDV oder viralem Protein stehen die folgenden zwei Systeme zur Verfügung: AG-capture ELISA und Fluorozytometrie (FACS). Letzterer soll mittels monoklonaler AK gegen das BDV-N- und -P-Protein aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von psychiatrischen Patienten BDV-AG detektiert haben (Bode *et al.*, 1994b). Allerdings wird dieser Nachweis infrage gestellt, da es keine Negativ-Kontrollgruppe gab und Diskrepanzen zwischen dem positiven AG-Nachweis und dem Nachweis viraler RNA auftraten (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997). Des Weiteren konnte in einer Kontrollstudie mit neonatal infizierten Ratten gezeigt werden, dass bei einem Nachweis von viraler RNA das gleichzeitige Vorkommen von BDV-AG in PBMCs sehr gering war (Furrer *et al.*, 2001; Sauder & de la Torre, 1998; Sierra-Honigmann *et al.*, 1993; Vahlenkamp *et al.*, 2000). Somit stellt sich die Vermutung, dass die Detektion von BDV-AG mittels FACS keine Rückschlüsse auf die virale Last in humanen PBMCs zulässt.

Der AG-capture ELISA benutzt monoklonale AK und polyklonales Anti-Serum, um AG nachzuweisen (Bode & Ludwig, 2001). Bode *et al.* (2001) behaupten, BDV-spezifische zirkulierende Immunkomplexe (CICs) und ihre Interaktion mit BDV-spezifischen AK und viralem AG nachgewiesen zu haben. Nach Meinung von Bode *et al.* besitzt dieser Test eine besonders hohe Sensitivität, jedoch ist der Test stark umstritten, da die Spezifität in Zweifel gezogen wird.

Eine weitere Methode, eine BDV-Infektion nachzuweisen, ist die Detektion von BDV-spezifischer RNA. Bode *et al.* (1995) detektierten als Erste BDV-RNA mittels reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) in verschiedenen psychiatrischen Patienten. Heute stehen zwei verschiedene RT-PCRs zur Verfügung, die real time RT-PCR und die nested RT-PCR. Je nach verwendeter RT-PCR ist jedoch die Gefahr der Laborkontamination sehr hoch (Schindler *et al.*, 2007; Sorg & Metzler, 1995; Wensman *et al.*, 2007). Des Weiteren bekam man aus verschiedenen Studien stets sehr unterschiedliche Ergebnisse, da immer mit unterschiedlichen Methoden gearbeitet wurde.

Na *et al.* (2009) verwendeten IFT und real time RT-PCR, um BDV-AK und BDV-RNA aus PBMCs von psychiatrischen Patienten aus Korea nachzuweisen. In dieser Studie konnten in Proben weder p24 und p40 RNA noch BDV-AK nachgewiesen werden.

Bis dato konnten nur wenige Forscher erfolgreich BDV aus Blut oder Gehirngewebe durch komplizierte *In-vitro*- oder *In-vivo*-Prozeduren isolieren. Diese Tatsache und die Vermutung, dass eine Kontamination der Proben mit Laborstämmen des Virus sehr wahrscheinlich ist, lassen keinen dieser Tests für ein validiertes System zu. Es ist dringend notwendig, mehrere Studien in unabhängigen Laboren durch standardisierte Methoden durchzuführen, um zukünftig eine gesicherte Aussage über den Zusammenhang von BDV und psychiatrischen Erkrankungen beim Menschen treffen zu können.

### 2.2.3 Experimentelle Infektion mit dem BDV und Modell der neonatal infizierten Ratte

Das Rattenmodell ist das am besten geeignete experimentelle Modell zur Erforschung der BDV-Infektion (Gosztonyi & Ludwig, 1995; Stitz *et al.*, 1995). Des Weiteren stellt es ein wichtiges Modell zur Erforschung immunvermittelter pathologischer Vorgänge in virusinduzierten neurologischen Krankheiten dar. Im Falle der experimentellen Infektion von neonatalen und somit immuninkompetenten Ratten besteht die Möglichkeit, Mechanismen und Auswirkungen von Viruspersistenz im ZNS zu beobachten und Strategien, mit denen Viren Verhaltens- und Neuronenentwicklung ohne offensichtliche Entzündungsreaktionen und Zytolyse im ZNS auslösen, zu studieren.

Darüber hinaus hat das Spektrum der Veränderungen in Verhalten und Neuroentwicklung bei neugeborenen-infizierten Lewis-Ratten außerordentliche Parallelen mit einigen Hauptmerkmalen von menschlichen neuropsychiatrischen Störungen wie Schizophrenie (Dittrich *et al.*, 1989; Hornig *et al.*, 2001) und affektiven Krankheiten (Altshuler *et al.*, 1987; Fish *et al.*, 1992; Soares & Mann, 1997) aufgezeigt. Insbesondere ähneln die Verhaltensdefizite der neonatal infizierten Lewis-Ratten einigen Kernmerkmalen von „autism spectrum disorders“ (Gillberg, 1999; Hornig *et al.*, 1999; Lord *et al.*, 2000; Rapin & Katzman, 1998). Auch stellen sie ein einzigartiges Modell für Autismus dar (Kemper & Bauman, 1993). Das gibt gerade diesem Tiermodell einen besonderen Stellenwert, um die Pathogenese solcher nicht immunvermittelter, neurodegenerativer Krankheiten besser verstehen zu lernen. Die klinisch dominierenden Verhaltensauffälligkeiten sind Hyperaktivität auf exogene Reize (Pletnikov *et al.*, 1999), Lerndefizite und Gedächtnisstörungen (Dittrich *et al.*, 1989; Rubin *et al.*, 1999).

Die Infektion neonataler Ratten verursacht eine lebenslang persistierende Infektion ohne offensichtliche Entzündungsreaktion und klinische Anzeichen einer BD und wird auch als persistierende tolerante Infektion bezeichnet (Bautista *et al.*, 1994; Pletnikov *et al.*, 2002a). Als Hirngewebsreaktionen findet man, sowohl bei den intracerebral- als auch bei den intranasal-infizierten Tieren, Kleinhirnhypoplasie mit Verschmälerung der Molekular- und Körnerzellschicht (Bautista *et al.*, 1995; Hornig *et al.*, 2001; Pletnikov *et al.*, 2002a) und Verlust von Purkinje-Zellen (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000). Weiter findet man fortschreitende Degeneration des Gyrus Dentatus und cortikale Schrumpfung (Bautista *et al.*, 1995; Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000; Hornig *et al.*, 1999). Im Hippocampus der neonatal infizierten Lewis-Ratten konnten deutliche Neuronenverluste und morphologische Veränderungen der Neuronen mittels HE-Färbung, KV-Färbung und Sudan-schwarz-Färbung nachgewiesen werden (Sollmann, 2007; Schepers, 2009).

In den neuesten Untersuchungen, durchgeführt von Daniela Sollmann (2007) und Michaela Schepers (2009), wurden die Ratten mit der Aerosol-Methode infiziert, bei der davon ausgegangen werden kann, dass alle beobachteten pathologischen Veränderungen auf die Infektion selbst zurückzuführen sind und nicht etwa durch mechanische Verletzungen – wie bei der intracerebralen Infektion – verursacht werden. Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass das BDV, obwohl es ein nicht zytopathogenes Virus ist, auch in immuntoleranten Tieren starke Veränderungen an den verschiedenen Zellarten des Gehirns hervorruft. Die Mehrzahl der am ersten Lebenstag infizierten Tiere wies eine starke Expression des p38-Proteins in allen Hirnarealen und eine deutliche Mikro- und Astroglie sowie Neuronenschädigung und Neuronenverlust auf. In Abwesenheit einer spezifischen Immunreaktion und bei Ausschluss eines mechanischen Insults konnten Mikroglie und Astrozytose als ein direkter Viruseffekt und damit als Marker für eine Infektion gewertet werden. Da diese Reaktionen auch bei sehr alten NBAE-infizierten Ratten nicht nachließen, lässt sich vermuten, dass Mikroglie und Astrozytose bei persistent infizierten Tieren lebenslang bestehen bleiben. Bei intracerebral infizierten Tieren zeigt sich trotz bekannter Immuntoleranz im Alter von vier Wochen eine transiente mononukleäre Inflammation (Hornig *et al.*, 1999; Sauder & de la Torre, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000). Dies war auch bei den vier Wochen alten NBAE-Tieren der Fall (Sollmann, 2007). Des Weiteren sah man eine gleichmäßige pathologische Veränderung aller myelinisierten Bereiche des ZNS. Die auftretenden Strukturveränderungen an den myelinisierten Axonen waren verdünnte Markscheiden, perlschnurartige Auftreibungen und Kontinuitätsverlust. Die Mehrzahl der Oligodendrozyten war infiziert, sie hatten eine

veränderte Verteilung innerhalb des Gehirngewebes und waren gekennzeichnet durch Clusterbildung mit Ansammlungen von Oligodendrozyten und einer erhöhten Anzahl im Corpus callosum. Des Weiteren wiesen sie veränderte Zellmorphologie auf (Schepers, 2009).

## **2.3 Das neuronale Zytoskelett**

### 2.3.1 Aufbau und Entwicklung

Das Zytoskelett von Neuronen sorgt als „Grundgerüst“ für Stabilität und Formerhaltung in den drei unterschiedlichen Abschnitten des Neurons: Perikaryon, Axon und Dendriten. Seine Hauptbestandteile sind Mikrofilamente (auch Aktinfilamente genannt), Mikrotubuli und Neurofilamente, wobei die Neurofilamente erst im Laufe der Differenzierung exprimiert werden. Die Einteilung dieser filamentösen Strukturen erfolgt auf der Grundlage ihrer Durchmesser, wobei die Mikrofilamente mit einem Durchmesser von 5 bis 7 nm die kleinsten Strukturen darstellen, gefolgt von den Neurofilamenten mit 10 nm und den Mikrotubuli mit einem Durchmesser von 25 nm (Naves *et al.*, 1996).

Bei der Morphogenese von Neuronen interagiert das Aktinfilamentsystem, welches unter der Plasmamembran angereichert ist, mit dem zytoplasmatischen Mikrotubulisystem, um Fortsätze zu bilden. Ergebnisse der Untersuchungen an embryonalen Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte zeigten, dass Neuronen ihre charakteristische Morphologie durch eine festgelegte Abfolge von Zwischenschritten entwickeln (Goslin & Banker, 1989). Im ersten Schritt bilden frisch ausplattierte Neuronen zahlreiche morphologisch nicht unterscheidbare kurze Fortsätze aus. In einem zweiten Schritt wächst einer der Fortsätze schneller als die anderen und entwickelt sich zum Axon. Danach reifen alle anderen Fortsätze zu Dendriten, die sich verzweigen und distal verzüngen.

Der gesamte Prozess wird entscheidend durch die Mikrotubuli und Mikrofilamente beeinflusst. Durch den gezielten Mikrotubuli-Aufbau und deren Stabilisierung durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) werden neue Zellausläufer initiiert und vorhandene verlängert (Drubin *et al.*, 1985). Des Weiteren muss lokal das kortikale Aktinnetzwerk umorganisiert werden, damit eine Ausstülpung der Fortsätze ermöglicht wird. Bei diesem Prozess handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel der beiden Zytoskelettsysteme und vieler assoziierter Proteine. Zusammen mit Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten bilden und erhalten Mikrotubuli die Architektur des Zytoplasmas.

Nach der initialen Bildung der Fortsätze werden auch sukzessiv Neurofilamente in die Fortsätze transportiert. Diese sind zusammen mit den Mikrotubuli für die Stabilität des dynamischen Neuronenskelettes, vor allem im Bereich des Axons, verantwortlich (Lasek *et al.*, 1985). Die Familie der neuronalen Intermediärfilamente umfasst bei den Säugetieren sechs Proteine. Neben den drei Neurofilament-Proteinen NF-L (light-chain), NF-M (middle-chain) und NF-H (heavy-chain) werden auch  $\alpha$ -Internexin, Peripherin und Nestin neuronal exprimiert. Mit Ausnahme von Peripherin (Klasse III) gehören alle neuronalen Intermediärfilamente der Klasse IV an (Fuchs & Weber, 1994).

### 2.3.2 Neurofilamente und ihre Phosphorylierung

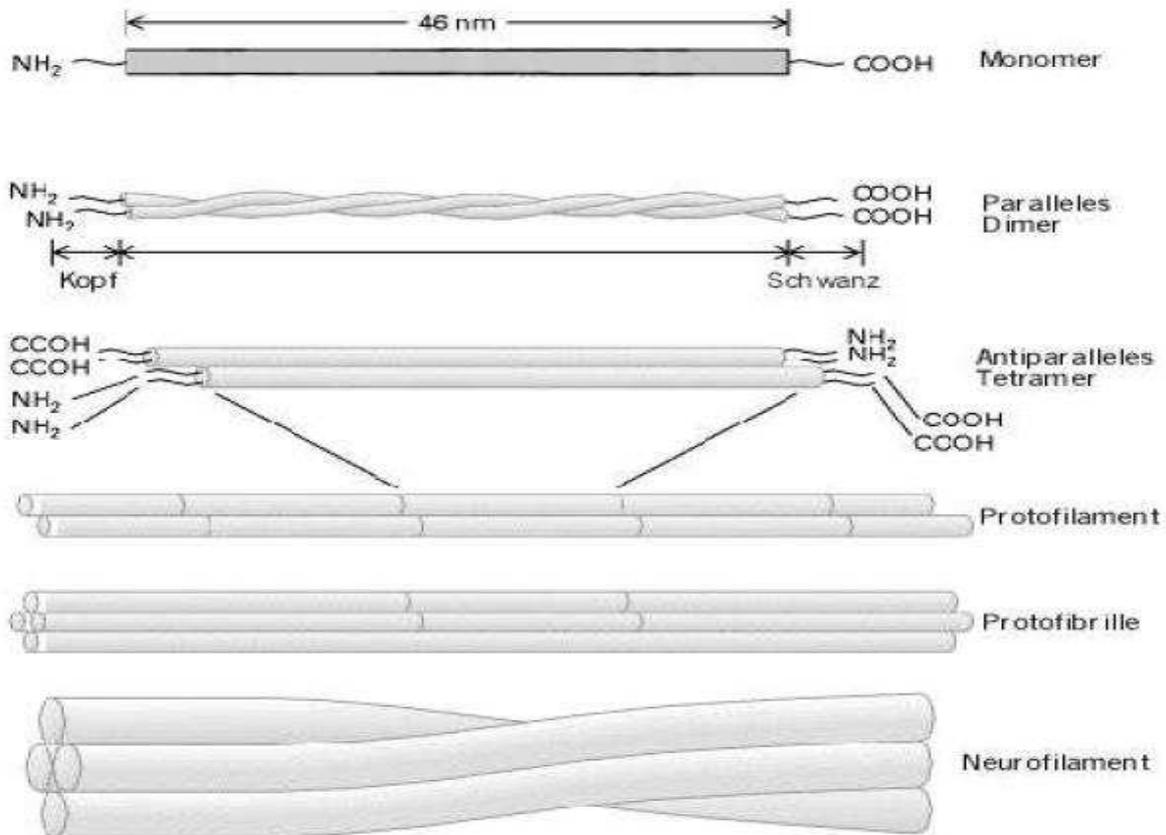
Aufgrund ihrer Häufigkeit wurden die Neurofilamente in Säuger-Neuronen als erste Neuronen-spezifische Intermediärfilamente identifiziert (Hoffman & Lasek, 1975). Sie reichern sich vor allem in großen myelinisierten Neuronen an, wobei sie etwa 10-fach häufiger als Mikrotubuli vorkommen (Lodish, 2000).

Die Neurofilamente selbst setzen sich aus drei verschiedenen Neurofilament-Polypeptiden zusammen. Diese Neurofilament-Untereinheiten sind ihrem Molekulargewicht nach wie folgt unterteilt: NF-H (ca. 200 kd), NF-M (ca. 150 kd) und NF-L (ca. 70 kd) (Geisler *et al.*, 1985; Julien *et al.*, 1988; Lees *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1987).

Der Zusammenbau der einzelnen Neurofilament-Proteine besteht aus einer zentralen  $\alpha$ -helikalen Stabdomäne, die flankiert wird von einer kurzen Amino (*N*)-terminalen Kopfdomäne und von einer großen Carboxyl (*C*)-terminalen Schwanzdomäne (Sihag *et al.*, 2007). Der molekulare Aufbau des Neurofilament-Triplett-Proteins aus den einzelnen Proteinen ähnelt dem anderer Intermediärfilamente. Durch Verwicklung von zwei NF-L-Monomeren miteinander plus zwei verschiedener NF-Monomeren kommt es zur Bildung von Heterodimeren. Diese Dimere lagern sich in antiparalleler Richtung paarweise seitlich aneinander und bilden so Tetramere. Durch End-zu-End-Aneinanderreihung dieser Tetramere entstehen nun Protofilamente, von denen jeweils zwei durch laterale Anlagerung eine Protofibrille bilden, von welchen wiederum vier durch seilartige Verschlingungen miteinander das eigentliche Neurofilament darstellen (Cooper, 2000; Lodish, 2000).

## Literaturübersicht

Abbildung 1: Schematische Darstellung der einzelnen Stadien der Entstehung eines Neurofilaments



(modifiziert nach Lodish, 2000)

Neurofilamente sind in longitudinal ausgerichteten Reihen angeordnet, die durch Seitenarme mit einem Durchmesser von 4 bis 6 nm verbunden werden. Die Länge der Seitenarme beträgt 20 bis 50 nm.

Neurofilamente sind obligate Heteropolymere, da NF-M und NF-H ohne NF-L nicht in der Lage sind, sich zu Filamenten zusammenzufügen (Balin *et al.*, 1991; Balin & Lee, 1991; Gardner *et al.*, 1984; Geisler & Weber, 1981; Zhu *et al.*, 1997). NF-L bildet zellfrei hingegen glatte, 10 nm dicke Filamente (Heins *et al.*, 1993; Hisanaga & Hirokawa, 1988; Hisanaga & Hirokawa, 1990; Hisanaga *et al.*, 1990), die nicht die charakteristischen „Seitenarme“ der zellulären Neurofilamente besitzen. Diese „Seitenarme“ werden somit von NF-M bzw. NF-H gebildet, indem sie ihre langen Schwanzdomänen rechtwinklig vom Filament-Rückgrat ausstrecken (Miki *et al.*, 2001). Dies ermöglicht zum einen die Quervernetzung von Filamenten und anderen Zellbestandteilen, zum anderen wird dadurch der Abstand zwischen den Neurofilamenten vergrößert, was sich positiv auf die Dicke des Axons auswirkt (Miki *et al.*, 2001).

Den beiden Domänen kommen unterschiedliche Aufgaben zu. Während die Kopfdomäne für den Zusammenbau der Filamente verantwortlich ist, hat die C-terminale Schwanzdomäne große Bedeutung für die allgemeine Organisation des Neurofilament-Netzwerkes (Fuchs & Weber, 1994). Bei der Regulation der dynamischen Eigenschaften des axonalen Zytoskeletts, z. B. Axonwachstum, Transport und Kontrolle des Axonkalibers, spielt die Phosphorylierung der Neurofilament-Untereinheiten eine entscheidende Rolle.

Nach der Synthese der Neurofilament-Proteine im Perikaryon werden diese, nachdem sie ins Axon eingetreten sind, phosphoryliert und durch das Axon transportiert, wobei die Neurofilamente sowohl den anterograden Kinesin- als auch den retrograden Dynein-Motor benutzen (Roy *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Yabe *et al.*, 1999). Daher betrachtet man das axonale Zytoskelett als ein stationäres Netzwerk im dynamischen Gleichgewicht (Rao *et al.*, 2002). Durch die Phosphorylierung erhöht sich die Ausdehnung der Seitenarme und somit der Abstand der Neurofilamente untereinander, woraus sich ein größeres Axonkaliber ergibt (Rao *et al.*, 2002).

Neurofilamente haben keine festgelegte prozentuale Zusammensetzung aus den drei Untereinheiten. So werden verschiedene Verhältnisse der Polypeptide zueinander in unterschiedlichen neuronalen Geweben und während der neuronalen Entwicklung gefunden (Pernas-Alonso, 1997). Allerdings konnte man beweisen, dass die unterschiedliche Zusammensetzung der Neurofilamente das Axon maßgeblich beeinflusst. Während NF-L zwingend notwendig für den Aufbau ist, reicht die Anwesenheit einer der beiden Untereinheiten aus. Dabei haben die beiden Untereinheiten verschiedene Bedeutungen. An einer NF-M-Null/Null-Mutante konnte gezeigt werden, dass bei völligem Fehlen von NF-M sich auch der Gehalt an NF-L um bis zu 90 % reduziert. Somit zeigt sich, dass die Menge an NF-L durch den Gehalt an NF-M reguliert wird. Eine reduzierte Menge an NF-L resultiert wiederum in einem verminderten Axonkaliber (Elder *et al.*, 1998). NF-H ist weitaus unbedeutender. Bei einem kompletten Fehlen von NF-H vermindert sich die Menge an NF-L um maximal 25 %, der Gehalt an NF-M bleibt unverändert. NF-H scheint für den Zusammenbau und die Reifung der Neurofilamente eher unerheblich zu sein (Elder *et al.*, 1998).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass NF-M und NF-H unterschiedliche Aufgaben während der Axodynamik erfüllen. NF-M bestimmt zum einen maßgeblich das radiale Axonwachstum durch die Abstände der Neurofilamente untereinander (Rao *et al.*, 2003). Zum anderen helfen die Seitenarme dieser Untereinheit beim longitudinalen Wachstum und somit bei der Stabilisierung der Neurofilamente (Nakagawa *et al.*, 1995). NF-H hat mehr Bedeutung

bei der Regulation des Transports der Neurofilamente durch das Axon (Ackerley *et al.*, 2003). Man unterscheidet auch zwischen unreifen und reifen Neurofilamenten, da bei der Entwicklung des ZNS erst NF-L und NF-M und, zeitlich deutlich verzögert, NF-H exprimiert werden. Obwohl die Kopfdomänen der drei Neurofilamente keine auffälligen Aminosäuresequenz-Homologien aufweisen, sind sie reich an Serinen und Threoninen. Diese sind stark phosphoryliert (Sihag & Nixon, 1991) und *O*-glycosyliert (Dong *et al.*, 1993), was vermutlich für die Regulation des Auf- und Abbaus der Filamente in der Zelle wichtig ist. Die zentrale Stabdomäne von NF-L mit einer Unterbrechung im Coil 1 ähnelt der von Klasse-III-Intermediärfilamenten (Geisler *et al.*, 1985), während diese Domäne bei NF-M (Levy *et al.*, 1987; Myers *et al.*, 1987) und NF-H (Julien & Mushynski, 1998; Lees *et al.*, 1988) eine durchgängige Helix bildet.

Am meisten aber unterscheiden sich die Untereinheiten in ihrer C-terminalen Schwanzdomäne. Diese Region ist bei NF-L sehr sauer, da sie viele Glutaminsäurereste (E-Segmente) enthält (Shaw, 1991). Der Schwanz von NF-M ist länger und enthält auch einige E-Segmente und Segmente, die reich an Glutaminsäure- und Lysinresten sind. Die Schwanzdomäne von NF-H unterscheidet sich am stärksten von der anderer Intermediärfilamente. Sie enthält 42 bis 51 Wiederholungen von Lysin-Serin-Prolin (KSP), wobei die Serinreste im Axon stark phosphoryliert sind (Carden *et al.*, 1985; Elhanany *et al.*, 1994; Julien & Mushynski, 1983). NF-M enthält auch einige KSP-Motive, die im Axon phosphoryliert sind (Hsieh *et al.*, 1994). Phosphorylierungen im Schwanz von NF-M und NF-H beeinflussen die Interaktion zwischen den drei Untereinheiten und anderen Zellkomponenten und wirken so auf das axonale Wachstum und den axoplasmatischen Fluss (Rao *et al.*, 2002). Die Akkumulation von Neurofilamenten beginnt während des Auswachsens von Neuriten und verstärkt sich während der Synapsenbildung und der Myelinisierung (Carden *et al.*, 1987; Schlaepfer & Bruce, 1990). Diese zweite Wachstumsphase des Axons wird radiales Wachstum genannt, da der axonale Umfang um das zehnfache zunehmen kann. Es wurde gezeigt, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen der Neurofilament-Anzahl und der Querschnittsfläche gibt (Hoffman *et al.*, 1984). Dies deutet darauf hin, dass Neurofilamente die intrinsische Determinante des radialen Wachstums sind. Für die Funktion der Neuronen ist die Vergrößerung des axonalen Durchmessers wichtig, da dieser zusammen mit der Myelinisierung die Geschwindigkeit der Reizleitung bestimmt.

Die Neurofilament-Untereinheiten unterliegen alle einer Veränderung durch Phosphorylierung. Bei der Regulation des Zusammenbaus vieler zytoplasmatischer und nukleärer Neurofi-

lamente spielt die Phosphorylierung eine entscheidende Rolle. Die Struktur der Neurofilamente ist sehr dynamisch, sie unterliegt einem ständigen phosphorylierungs-/dephosphorylierungsgekoppelten Auf- und Abbau. Es konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierungsgekoppelte Neurofilament-Dynamik zeitlich und örtlich kontrolliert abläuft (Sekimata *et al.*, 1996; Tsujimura *et al.*, 1994). Darüber hinaus gibt es einen konstanten Austausch von Untereinheiten zwischen einem löslichen Pool und den polymerisierten Filamenten, der über deren gesamte Länge ablaufen kann (Vikstrom *et al.*, 1992).

Das Intermediärfilament-System ist jedoch keine isolierte Struktur in der Nervenzelle. Es bildet einen Teil des gesamten neuronalen Zytoskeletts. Die Interaktion zwischen den Intermediärfilamenten und anderen Strukturen wird zum Beispiel bei den Neurofilamenten NF-H und NF-M über die seitlich abstehenden langen Schwanzdomänen vermittelt oder durch eine Familie homologer multifunktionaler Intermediärfilament-assoziiierter Proteine (IFAP). Auch die Anordnung der Neurofilamente ist abhängig vom Grad ihrer Phosphorylierung. Der Phosphorylierungsgrad der Neurofilamente bestimmt die Abstände untereinander. Je höher der Phosphorylierungsgrad ist, desto größer ist der interfilamentäre Abstand. Dieser Zusammenhang beruht auf elektrostatischen Abstoßungsreaktionen.

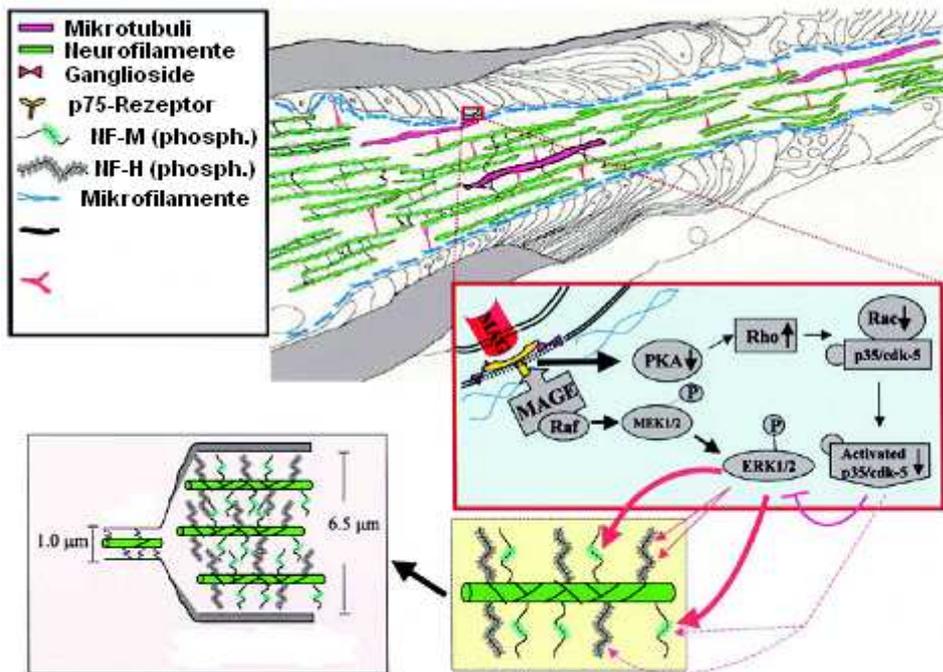
Die Akkumulation von Neurofilamenten beginnt mit dem Auswachsen von Neuriten und verstärkt sich während der Synapsenbildung und der Myelinisierung (Carden *et al.*, 1987; Schlaepfer & Bruce, 1990). Sehr wahrscheinlich ist, dass Neurofilamente im Soma zusammengebaut werden und dann mittels langsamen Transports durch das Axon bewegt werden (Hoffman & Lasek, 1975). Die Phosphorylierung findet mit dem Eintritt in den myelinhaltigen Bereich des Axons statt und wird vermutlich durch ein Kinase-Phosphatase-System und den Kontakt zwischen myelinbildender Zelle und Neuron vermittelt.

Die Signalkaskade sieht wie folgt aus: Das Myelin-assoziierte Glycoprotein (MAG) als Effektormolekül, welches an der äußeren Oligodendrozytenmembran lokalisiert ist, induziert über eine Ankopplung an den Rezeptor p75 eine Assoziation zwischen Vertretern der Melanoma-Gen-Familie (MAGE) und der zytoplasmatischen Domäne des p75-Rezeptors. Dadurch wird die ERK1/2-Signalkaskade ausgelöst, durch deren Aktivierung es letztendlich zur stöchiometrischen Phosphorylierung von Neurofilamenten kommt.

Die Phosphorylierung der Neurofilamente ist stark myelinabhängig. Schon im normalen Axon wird deutlich, dass der Grad der Phosphorylierung der Neurofilamente in den myelinisierten Bereichen gegenüber den nicht myelinisierten Abschnitten erhöht ist (de Waegh *et al.*, 1992; Hsieh *et al.*, 1994). Bei der Untersuchung der demyelinisierten Axone von Trembler-Mäusen

wird dieser Effekt noch deutlicher. In den demyelinisierten Axonen sind die Neurofilamente dichter gepackt und der Grad ihrer Phosphorylierung nimmt ab. Infolgedessen ist das Axonkaliber vermindert (Kirkpatrick & Brady, 1994). So wird vermutet, dass in erster Linie durch phosphorylierungsabhängige Abstoßungskräfte und Ausdehnung der Neurofilament-Seitenarme und somit durch Veränderung der Mindestdistanzen zwischen den einzelnen Filamenten einerseits sowie zu benachbarten Strukturen andererseits, der axonale Durchmesser ausgebildet wird. Dass diese Verhältnisse abhängig von der Myelinbildung am entsprechenden Axon sind, wird dadurch begründet, dass selbst innerhalb ein und desselben Axons Unterschiede im Phosphorylierungsgrad und der Anordnung der Neurofilamente und somit auch im Durchmesser zu erkennen sind, abhängig davon, ob man die myelinisierten Internodien oder aber nicht myelinisierte Abschnitte, z. B. das Initialsegment oder die Ranvier'schen Knoten, betrachtet (de Waegh *et al.*, 1992; Hsieh *et al.*, 1994). Besonders weil aufgrund des axonalen Transports ein ständiger Fluss der Zytoskelett-Bestandteile herrscht, bleiben diese Strukturen in ihrem Erscheinungsbild nicht konstant, sondern werden je nach ihrer momentanen Lokalisation im Axon myelinabhängig verändert. Dieses Phänomen beruht wahrscheinlich auf dem oben beschriebenen Kinase-Phosphatase-System, welches abhängig vom Kontakt der myelinbildenden Zelle mit dem Neuron regional selbst auf kleinste Distanzen dynamisch gesteuert wird (de Waegh *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 2002; Starr *et al.*, 1996).

Abbildung 2: Phosphorylierung von Neurofilamenten



(modifiziert aus GARCIA *et al.*, 2003)

Die Signalkaskade (blaues Kästchen), ausgehend von MAG, welches in der Membran der myelinproduzierenden Zelle lokalisiert ist; MAG bindet an den „low affinity“ Neurotrophin/NGF-Rezeptor p75 in Kombination mit neuronalen Gangliosiden, um das myelinabhängige Signal in das Axoplasma zu übersetzen; Die Bindung von MAG an den p75-Rezeptor induziert die Assoziation von Vertretern/Molekülen der Melanom-Antigen-Genfamilie „members of melanoma antigen gene family (MAGE)“ mit der intrazellulären Domäne des Rezeptors mit anschließender Aktivierung der ERK1/2-Kaskade. Durch diese Kopplung wird eine Aktivierung der ERK1/2-Kaskade ausgelöst, die zur stöchiometrischen Phosphorylierung von NF-H und NF-M beiträgt (gelbes Kästchen) (Garcia *et al.*, 2003).

## 2.4 Schizophrenie und das DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia-1)-Protein

### 2.4.1 Pathomechanismen der Schizophrenie

Der Definition nach ist die Schizophrenie eine endogene Psychose mit charakteristischen, aber vielgestaltigen Störungen der Persönlichkeit (des Ich- oder Selbsterlebens), des Denkens, der Wahrnehmung, der Realitätsauffassung und der Affektivität ohne Beeinträchtigung der Klarheit des Bewusstseins und ohne erkennbare hirnorganische Erkrankung (Pschyrembel, 1993). Die genauen Ursachen sind noch weitgehend unbekannt. Zur Diskussion steht eine

individuelle für den Betroffenen ungünstige Kombination biografisch-psychischer, hirnrorganischer, sozialer und genetischer Bedingungen, die zu der Disposition führen, an Schizophrenie zu erkranken.

Die Prävalenz ist für Männer und Frauen gleich und liegt zurzeit weltweit bei 1 %. Die Schizophrenie ist eine sehr komplexe Krankheit, viele Studien an Zwillingen haben eine hohe Heritabilität ergeben (bis zu 80 %) (Sullivan *et al.*, 2003). Hierbei sind nicht einzelne Gene die Auslöser für die Entstehung der Schizophrenie, sondern vielmehr die Potenzierung spezifischer Cluster von Genen zusammen mit vielen zusätzlichen Faktoren („Stressoren“) und Umweltfaktoren, die zu einer erhöhten Vulnerabilität führen (Harrison & Weinberger, 2005). Zu den sogenannten „Stressoren“ gehören u. a. Infektionen, Geburtskomplikationen, Drogenmissbrauch und soziales Umfeld. Die Krankheit befindet sich in einem ständigen dynamischen Prozess mit einer Dysregulation multipler Signalwege.

Diese pathophysiologische Kaskade ist bei Weitem noch nicht verstanden, aber folgende Theorien sollen einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung geben. Viele Theorien stützen sich auf die Wirkungsweise der therapeutisch verabreichten Medikamente.

## 1. Die Gehirnentwicklungs-Hypothese

Diese Hypothese postuliert, dass Störungen während der embryonalen und fetalen Gehirnentwicklung zu Defekten in der neuronalen Verknüpfung, veränderten biochemischen Funktionen und zu kognitiven und emotionalen Dysfunktionen führen (Harrison, 1999; Raedler *et al.*, 1998). Als Störungen sind z. B. Sauerstoffmangel während der Geburt, Infektionen der Mutter während des zweiten Schwangerschaftstrimesters oder Infektionen in frühester Kindheit zu nennen (Dean & Murray, 2005). Die neuronalen Veränderungen beinhalten hauptsächlich vergrößerte Ventrikel, reduziertes Gesamtvolumen des Gehirns, Änderungen in der Dicke von Cortex, Gyrus und Hippocampus und cerebrale Asymmetrie (Steen *et al.*, 2006). Des Weiteren kommt es zur Gehirnatrophie, hervorgerufen durch Verlust an Neuropil, vor allem in synaptischen Elementen (Roberts, 2007; Roberts *et al.*, 2005). Die Veränderungen in Gehirnstruktur und Volumen werden auf eine Reduktion von neuronalen Elementen zurückgeführt, wie z. B. Axonen, Dendriten und Synapsen (Harrison, 1999; Lewis & Levitt, 2002; Shenton *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser Hypothese werden immer mehr Gene bzw. deren Mutationen und deren Produkte, die eine entscheidende Rolle in der Gehirnentwicklung spielen, mit der Entstehung von Schizophrenie in Verbindung gebracht. Eines der am häufigsten diskutierten

Gene ist das DISC1 (= Disrupted-In-Schizophrenia-1), welches erstmals aus dem Genpool einer großen schottischen Familie isoliert wurde. In dieser Familie geht die symmetrische Translokation zwischen Chromosom 1 und 11 häufig mit Schizophrenie oder einer anderen schweren psychiatrischen Erkrankung einher. Diese Translokation spaltet das DISC1-Gen. Vieles deutet darauf hin, dass die veränderte DISC1-Expression wahrscheinlich mit der Entwicklung von psychiatrischen Symptomen bei Trägern dieser Translokation in Zusammenhang steht (Millar *et al.*, 2000). Das von DISC1 codierte Protein hat viele Bindungspartner, die an der Entwicklung und Reifung von neuronalen Elementen beteiligt sind. Es wird vermutet, dass der Funktionsverlust dieses Gens ein Auslöser für Schizophrenie sein könnte (Ishizuka *et al.*, 2006).

Alle Gene, die in Verdacht stehen, an der Pathogenese von Schizophrenie beteiligt zu sein sowie die Risikofaktoren aus der Umwelt sind u. a. aufgelistet im Internet unter <http://www.polygenicpathways.co.uk> (Carter, 2008).

## 2. Die Dopamin-Hypothese

Dies ist die am häufigsten vertretene Theorie, da alle gängigen Medikationen der Schizophrenie mithilfe von Dopamin-D2-Rezeptor (DRD2)-Antagonisten oder Teilantagonisten durchgeführt werden (Miyamoto *et al.*, 2003). Die Hypothese beinhaltet, dass eine exzessive Dopamin-Ausschüttung in mesolimbischen und striatalen Gehirnregionen zu den positiven und dopaminerge Defizite in den prefrontalen Gehirnregionen zu den negativen Symptomen der Schizophrenie führen. Die DRD2-Hochregulation wird für ein höheres Schizophrenie-Risiko verantwortlich gemacht. Eine höhere DRD2-Dichte in caudalen Bereichen des Gehirns wird mit einer Verminderung von kognitiven Fähigkeiten, besonders solchen, die den corticostriatalen Signalweg einbeziehen, in Verbindung gebracht (Hirvonen *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass Schizophrenie-Patienten eine höhere DRD2-Dichte aufweisen (Seeman & Kapur, 2000).

Daneben bestehen Zusammenhänge zwischen dem Polymorphismus verschiedener Allele auf dem DRD2-Gen und Schizophrenie (Glatt *et al.*, 2003).

## 3. Die Glutamat-Hypothese

Bei dieser Hypothese wird eine glutamaterge Dysfunktion als grundlegend angesehen und die dopaminergen Dysfunktionen als sekundäre Folgen. Eine verminderte Funktion von Glutamat führt zu einer überspitzten Sinneswahrnehmung. Dadurch kommt es zu den be-

kannten psychischen Symptomen und den Änderungen in der Dopamin-Konzentration. Neuregulin 1 (NRG1) und sein Rezeptor ErbB4 sollen eine weitere Rolle bei der Schizophrenie spielen, da die Aktivierung von NRG1 zur Internalisierung von Glutamat-Rezeptoren führt (Hahn *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Norton *et al.*, 2006).

Die D-Amino-Säure-Oxidase (DAAO), welche durch das G72-Protein aktiviert wird, oxidiert D-Aminosäuren. DAAO spielt eine relevante Rolle bei der Signalgebung am Glutamat-Rezeptor (Boks *et al.*, 2007). Bei Schizophrenie-Patienten konnte eine erhöhte Aktivität von G72 in den für Schizophrenie relevanten Gehirnbereichen festgestellt werden (Boks *et al.*, 2007; Korostishevsky *et al.*, 2004).

#### 4. Die GABA-Hypothese

Sowohl Glutamat- als auch Gamma-Aminobuttersäure-(GABA)-Konzentrationen sollen bei Schizophrenie anomal verändert sein (Reynolds & Harte, 2007). Auch das Enzym, welches für die Biosynthese von GABA verantwortlich ist, wurde bei Schizophrenie-Patienten in veränderten Konzentrationen gefunden.

#### 5. Das 22q11.2-Deletions-Syndrom

Die Deletion von 22q11.2 ist die Ursache für das häufigste Mikrodeletionssyndrom. Es erhöht bei betroffenen Individuen das Risiko an Schizophrenie zu erkranken auf bis zu 30 % (Arinami *et al.*, 2005; Gothelf *et al.*, 2007).

#### 6. Phosphodiesterase3-Kinase (PI3K)-Signalweg

PI3K ist beteiligt an vielen zellulären Prozessen, die eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Schizophrenie spielen, z. B. Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Axonwachstum und das Überleben von Zellen (Brazil & Hemmings, 2001; Kalkman, 2006). Viele Proteine, die bei der Erkrankung vor einer weiteren Verschlechterung schützen, sowie Substanzen, die bei der Behandlung von Schizophrenie zum Einsatz kommen, agieren über den PI3K Pathway (Lang *et al.*, 2007).

#### 7. Immunhypothese

Epidemiologische Daten weisen auf einen Zusammenhang zwischen Influenza und Schizophrenie hin (Bechter, 2004; Müller & Schwarz, 2006). Infektionen während der Schwangerschaft werden für ursächlich gehalten, wenn die Kinder eine Schizophrenie

entwickeln (Babulas *et al.*, 2006; Brown, 2006). Des Weiteren fand man eine Erhöhung von Antikörpern gegen *Toxoplasma gondii* bei an Schizophrenie-Erkrankten (Torrey *et al.*, 2007). Das BDV wird schon seit Jahren mit Schizophrenie in Verbindung gebracht, näheres siehe Kap. 2.2.2.

## 2.4.2 DISC1

Der DISC-Lokus befindet sich am Stoppunkt einer balancierten Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 11 (Chubb *et al.*, 2008). Die Translokation zerreißt die Gensequenz des DISC1, was zu einer reduzierten Expression führt (Millar *et al.*, 2005a) oder zu einem Verlust von 257 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins (Ozeki *et al.*, 2003). Das DISC1-Gen steht in Verdacht, bei der Anfälligkeit für verschiedene psychiatrische Krankheiten eine große Rolle zu spielen. Erstmals wurde DISC1 bei einer großen schottischen Familie entdeckt. Die Familienmitglieder, die Träger der Translokation t(1;11)(q42.1;q14.3) waren, erkrankten gehäuft an psychiatrischen Krankheiten, dabei auch an Schizophrenie (Blackwood *et al.*, 2001; St Clair *et al.*, 1990).

### 2.4.2.1 DISC1-Expression

Das DISC1-Protein wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert. Vor allem aber in Herz, Gehirn und Plazenta. Im menschlichen Gehirn fand man eine Verteilung des Proteins über das gesamte Organ (Millar *et al.*, 2000). Besonders hoch war die Expression im Gyrus Dentatus des Hippocampus, etwas weniger fand man im temporalen und hippocampalen Cortex (James *et al.*, 2004; Lipska *et al.*, 2006). Gleiche Ergebnisse für die Expression ergaben Studien an Musegehirnen. Besonders deutlich war die Expression während der Gehirnentwicklung. Die wichtigste Lokalisation war der Hippocampus, vorübergehend auch der Thalamus (Austin *et al.*, 2004). Das DISC1-Protein wurde dabei in Neuronen und Interneuronen exprimiert. Bei der Maus wurde das 100 kDa große full length (vollständige) Protein am stärksten während der embryonalen Entwicklung am Tag 13,5 gesehen und postnatal am Tag 35 (Schurov *et al.*, 2004). Gleiches gilt auch für die Ratte. Dies spricht dafür, dass das DISC1-Protein maßgeblich an der Gehirnentwicklung und Reifung beteiligt ist.

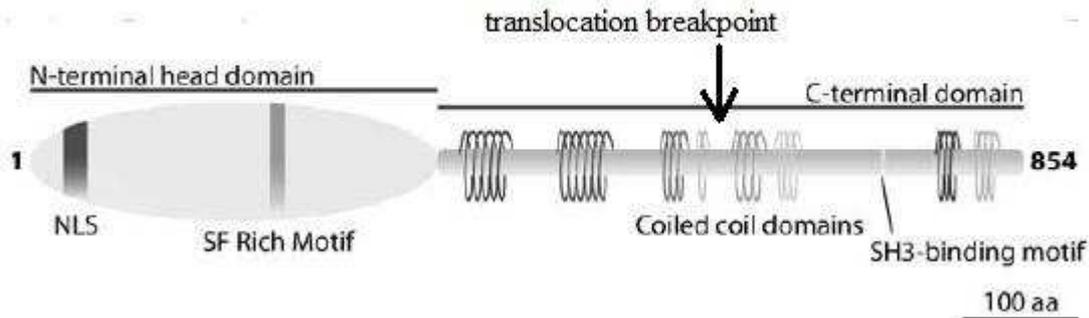
#### 2.4.2.2 DISC1-Aufbau

DISC1 codiert für ein multifunktionelles Protein, dessen Proteinsequenz direkt durch die Translokation getrennt wird, was zu einer verminderten DISC1-Expression oder -Deletion am C-terminalen Ende führt (Millar *et al.*, 2005a).

Es gibt vier verschiedene Isoformen des Proteins beim Menschen:

das L (= long)-Transkript, eine full-length (vollständige) Proteinform mit 854 Aminosäuren (~ 100 kDa), die Lv (= long variant)-Isoform mit 832 Aminosäuren (~ 98 kDa), die S (= short)-Isoform mit 678 Aminosäuren (~ 75 kDa) und die Es (= extremely short)-Isoform mit 369 Aminosäuren (~ 39 kDa) (James *et al.*, 2004). Die L-Isoform besteht als vollständige Version aus zwei Hauptbereichen, einer N-terminalen Kopfdomäne (~ Aminosäure 1-350), die nur schwach konserviert ist, und einer stark konservierten C-terminalen Schwanzdomäne (~ Aminosäure 351-854) (Millar *et al.*, 2001; Millar *et al.*, 2000). Trotz schwacher Konservierung enthält die N-terminale Region zwei konservierte Strukturen, ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und ein kurzes Serin/Phenylalanin-reiches Sequenzmotiv (Bord *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003). Die C-terminale Schwanzdomäne enthält viele alpha-helikale Doppelwindungen, die es dem Protein ermöglichen, Interaktionen mit anderen Proteinen einzugehen (Taylor *et al.*, 2003). *In vivo* kann das Protein auch als Dimer vorliegen oder durch posttranslationale Prozesse, wie zum Beispiel Phosphorylierung, verändert werden (Ishizuka *et al.*, 2006; James *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2003; Murdoch *et al.*, 2007).

Abbildung 3: DISC1-Aufbau



Die Abbildung zeigt die Proteinstruktur des DISC1-Proteins, wie sie nach derzeitigem Kenntnisstand vermutet wird. Die abgebildete Proteinstruktur basiert auf Daten aus Veröffentlichungen von Millar *et al.* 2000 und 2001 und Taylor *et al.* 2003. Die beiden konservierten Regionen des N-terminalen Endes sind markiert, es handelt sich um das Nukleäre Lokalisations-Signal (NLS) und ein kurzes konserviertes Serine/Phenylalanine-reiches Motiv (SF-rich motif). Die zahlreichen Windungen am C-terminalen Ende werden mittels Spulen dargestellt, diese sind vermutlich wichtig für die Vermittlung zwischen DISC1-Protein und seinen Interaktionspartnern. Die SH3-Domäne ist ebenfalls markiert. Der Pfeil markiert die Stelle der vermutlichen Translokation. DISC, Disrupted-In-Schizophrenia.

Modifiziert aus: Chubb (2008)

#### 2.4.2.3 DISC1-Zelluläre Lokalisation und Funktion

Lokalisation:

DISC1 ist in vielen verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert, vermutlich übt es verschiedene Rollen innerhalb der unterschiedlichen Lokalisationen aus. Verschiedene DISC1-Protein-Isoformen gehen daher unterschiedliche Proteininteraktionen ein, wobei bestimmte Lokalisationen innerhalb der Zelle bevorzugt werden.

So wurde z. B. ein 71 kDa großes DISC1-Protein beim Menschen ausschließlich in mitochondrialen Fraktionen gefunden und ein 100 kDa Protein fand man in Assoziation mit dem Zentrosom, während längere Isoformen mehr nukleäre, zytoplasmatische und zytoskelettale Lokalisationen aufwiesen (James *et al.*, 2004). Die N-terminale Kopfdomäne (Aminosäure 1-358) ist wichtig für die Lokalisation des DISC1 innerhalb des Kerns (Millar *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass allein der N-terminale Kopf ausreicht, um DISC1 in Mitochondrien und Kern zu exprimieren. Der C-terminale Schwanz hingegen ist wichtig für die Lokalisation im Zytoskelett und Zentrosom. Der Verlust von C-terminalen Sequenzen setzt die Expression in Zentrosom und Zytoskelett herab. Durch die Verkürzung des DISC1

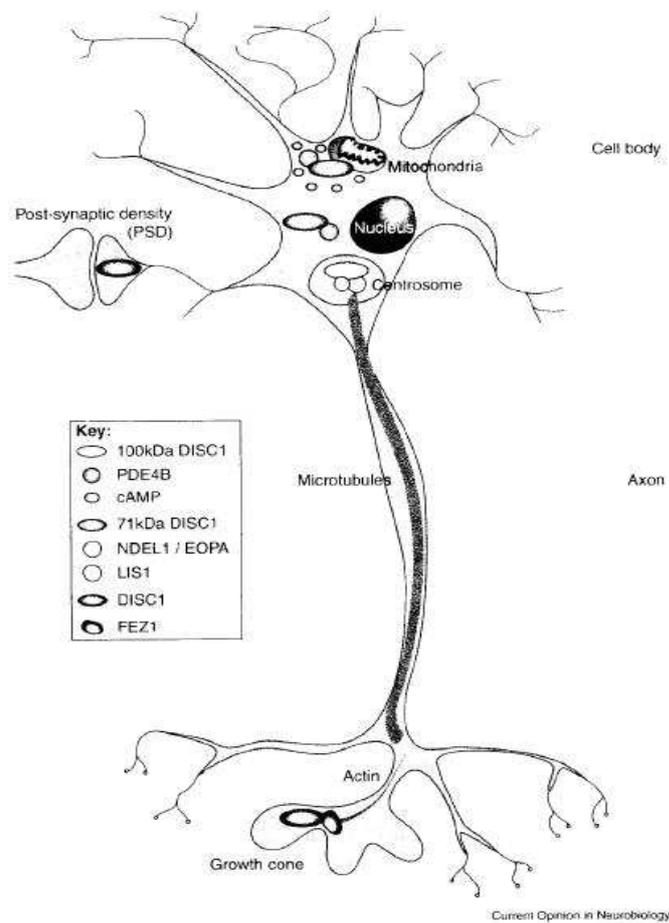
ändert sich die gesamte Verteilung des Proteins innerhalb der Zelle, und es kommt zu einer signifikant erhöhten Lokalisation innerhalb des Kerns (Millar *et al.*, 2005a). Überexpression von DISC1 resultiert in einer auffallenden Reorganisation in den Mitochondrien, und es kommt zu ringähnlichen Formationen der Mitochondrien (Millar *et al.*, 2005a). Besonders auffällig war ein markantes Auftreten des DISC1 im Wachstumskegel aussprossender Axone, vermehrt in sich differenzierenden Neuronen (Taya *et al.*, 2007).

#### Funktion:

Bisher ist noch nicht viel über die biologische Funktion des DISC1 und seinen Einfluss auf die Pathogenese der Schizophrenie bekannt. Um diese zu erforschen, beschäftigte man sich mit den Bindungspartnern von DISC1 und ihren Funktionen (Millar *et al.*, 2005b; Miyoshi *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2003; Ozeki *et al.*, 2003). Einer der Hauptaufgaben des DISC1 beinhaltet Rollen bei Neurogenese, zytosklettale Funktionen (Mikrotubuli) und AMP-Signalgebung. Dabei stehen viele der Bindungspartner in Verdacht, auch eine Rolle bei der Schizophrenie zu spielen. DISC1 sollte als Mittelpunkt bzw. Schlüsselprotein (hub-protein) eines multifaktoriellen Geschehens voller Risikofaktoren für psychiatrische Krankheiten gesehen werden (Camargo *et al.*, 2007; Chubb *et al.*, 2008).

Bei der Suche nach potenziellen Bindungspartnern für DISC1 fand man mehrere Proteine, welche verantwortlich für die Entwicklung neuronaler Elemente sind. Dem DISC1-Protein wird dabei die Rolle als „Transporter“ der zytoskelettalen Elemente zugesprochen. Die wichtigste Strukturkomponente, um eine Interaktion mit anderen Proteinen zu ermöglichen, sind die Doppelwendungen am C-terminalen Ende. Die Funktion der N-terminalen Kopfdomäne ist noch weitestgehend unklar.

Abbildung 4: DISC1 zelluläre Lokalisation und Interaktionspartner



DISC1 ist in vielen subzellulären Regionen lokalisiert. Gezeigt wird repräsentativ ein neuronaler Zellkörper mit Dendriten und einem Axon, welches Mikrotubuli enthält. DISC1-assoziierte Proteinkomplexe findet man im Zentrosom, wo dieses einen Komplex mit NDEL1 und LIS1 bildet. DISC1-Isoformen mit unbekanntem Gewicht gibt es im postsynaptischen Raum und, kolokalisiert mit FEZ1, in den Wachstumskegeln. Die Interaktion zwischen DISC1 und FEZ1 findet vermutlich durch direkte Assoziation statt.

aus: Mackie (2007)

#### 2.4.2.4 DISC1-Interaktionspartner

DISC1 hat insgesamt 127 Proteine als Interaktionspartner, die mit 158 wechselseitigen Aktionen aufeinander einwirken (Camargo *et al.*, 2007). Im Folgenden werden die wichtigsten Protein-Bindungspartner von DISC1 in Bezug auf die Genese des Zytoskeletts vorgestellt:

##### 1. NUDEL/LIS1/14-3-3ε

NUDEL (= nuclear distribution gene E homologue-like) ist das Säugetier-Homolog zum Distributions-Protein von *Aspergillus nidulans*.

DISC1 interagiert mit NUDEL, welches einen Komplex mit LIS1 (lissencephaly-1) und 14-3-3ε bildet. NUDEL bindet mit seinen Aminosäuren (AS) 201-280 an DISC1, dessen Bindungsstelle aus AS 795-854 besteht. Die Bindungsstelle von DISC1 befindet sich in

den Doppelwindungen, die am C-terminalen Ende liegen. Diese Aminosäuren fehlen bei Individuen, die Träger der Translokation sind. Somit verliert die mutierte Form von DISC1 ihre Fähigkeit, NUDEL zu binden (Ozeki *et al.*, 2003).

NUDEL bindet LIS1. Dieser Komplex ist zunächst im Zentrosom oder Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) lokalisiert und wird dann in die axonalen Wachstumskegel transportiert (Niethammer *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000). 14-3-3 $\epsilon$  bindet dabei an NUDEL und ist verantwortlich für die Phosphorylierung von NUDEL (Toyo-oka *et al.*, 2003) und die korrekte Platzierung von NUDEL und LIS1 distal im Axon (Taya *et al.*, 2007).

Der NUDEL/LIS1/14-3-3 $\epsilon$ -Komplex reguliert den zytoplasmatischen Dynein-Motor, indem NUDEL an die schwere Kette von Dynein bindet. Dynein wiederum bindet an Mikrotubuli und ist essenziell für den Transport von Protein-Komplexen innerhalb einer Zelle. Somit ist der Komplex beteiligt an entscheidenden Prozessen bei der neuronalen Wanderung und neuronalen Morphologie (Niethammer *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000; Sweeney *et al.*, 2001), wodurch die Axonelongation am distalen Wachstumskegel ermöglicht wird. Da DISC1 essenziell für die Aufrechterhaltung und korrekte Lokalisation des NUDEL-Komplexes erscheint, kann gesagt werden, dass DISC1 maßgeblich an der neuronalen Migration und Axonelongation beteiligt ist (Ishizuka *et al.*, 2006; Kamiya *et al.*, 2005). DISC1 bezeichnet man auch als „Cargo-Transporter“ für solche Komplexe, die für das neuronale Wachstum notwendig sind (Taya *et al.*, 2007).

NUDEL spielt auch eine wichtige Rolle bei der Anordnung von Neurofilamenten (Nguyen *et al.*, 2004). Es hat wichtige Aufgaben bei der Neurofilament-Anordnung, dem Neurofilament-Transport und der neuronalen Integrität.

NUDEL ermöglicht die Polymerisation von Neurofilamenten im Neuron durch direkte Interaktion mit der leichten Kette der drei Neurofilament-Untereinheiten (NF-L).

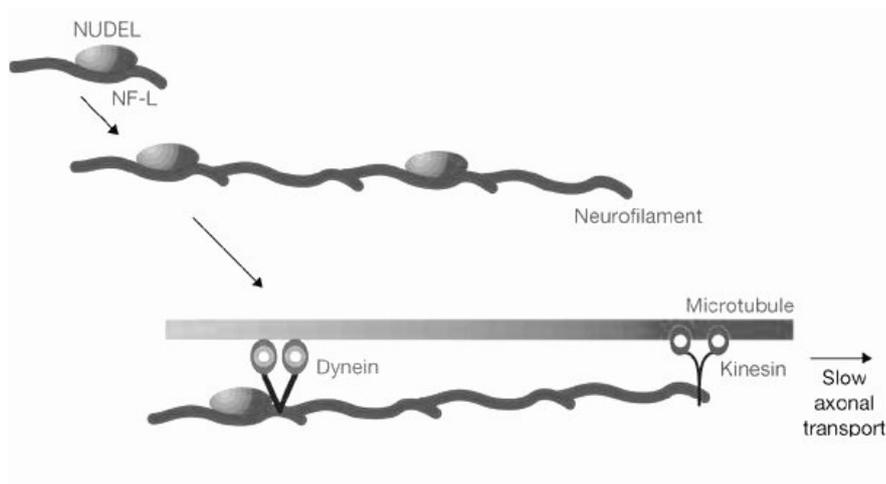
In der löslichen Fraktion binden sowohl das vollständige (AS 1-345) Protein als auch das C-terminale Ende (AS 191-345) von NUDEL direkt an der Stabdomäne von NF-L (AS 77-364). Mit NF-H geht NUDEL nur eine indirekte Verbindung ein. NUDEL und NF-L konnten im Zellkörper nachgewiesen werden; hier findet ein erster Zusammenbau von Neurofilament-Untereinheiten statt.

Assoziationen bestehen auch zwischen NUDEL und polymerisierten Neurofilament-Strukturen (Nguyen *et al.*, 2004). NUDEL erleichtert so die Anordnung und Polymerisation von Neurofilamenten in Neuronen, fügt sich aber nicht mit diesen zusammen.

Wie oben beschrieben, besteht eine effiziente Kooperation zwischen NUDEL und Dynein, um den Transport der Neurofilament-Untereinheiten zu gewährleisten und das Netzwerk aus Auf- und Abbau zu unterstützen. Nachdem NUDEL NF-L gebunden hat, verbinden Dynein und Kinesin das NF-L mit den axonalen Mikrotubuli. So kann das NF-L via „stop and go“ entlang des Axons transportiert werden (Holzbaur, 2004).

Schaltet man NUDEL mittels Interferenz-RNA aus, zeigt postnatales Mäusegehirn destabilisierte NF-L und Änderungen in der Homöostase von Neurofilamenten. Es kommt zu Neurofilament-Akkumulationen und Änderungen in der neuronalen Morphologie. Diese Ergebnisse erinnern sehr stark an Neurodegeneration (Nguyen *et al.*, 2004).

Abbildung 5:



Modell für die Rolle, die NUDEL und der Mikrotubulimotor beim axonalen Transport von Neurofilamenten spielen. Es wird vermutet, dass NUDEL an NF-L bindet, um die Aggregation der Neurofilamente zu ermöglichen. Dynein und Kinesin werden dann zu den neu angeordneten Neurofilamenten ergänzt. Der Dynein-Kinesin-Motor ermöglicht wahrscheinlich die Interaktion zwischen den Neurofilamenten und den axonalen Mikrotubulis und transportiert diese dann im Stop-and-go-Verfahren entlang des Axons.

aus: Holzbaur, (2004)

## 2. Kinesin1

DISC1 interagiert direkt mit der schweren Kette von Kinesin1 (KIF5A) und bildet somit die Verbindung zwischen Kinesin1 und NUDEL/LIS1 (Taya *et al.*, 2007). Durch die geschaffene Verbindung zwischen Kinesin1 und dem NUDEL/LIS1/14-3-3ε-Komplex fungiert DISC1 auch hier als „Cargo-Transporter“, der die Komplexe an die passende Stelle im Axon transportiert (Taya *et al.*, 2007).

Kinesin1 ist ein Tetramer, bestehend aus zwei schweren Ketten (KIF5A, KIF5B oder KIF5C) und zwei leichten Ketten (KLC1 oder KLC2) (Brady, 1985; Vale *et al.*, 1985). Es fungiert als molekularer Motor an den Mikrotubuli, welche essenziell sind für den anterograden axonalen Transport (Kamal & Goldstein, 2002; Miki *et al.*, 2001).

Während DISC1 für die Aufrechterhaltung von Dynein am Zentrosom sorgt (Ishizuka *et al.*, 2006; Kamiya *et al.*, 2005), ist Kinesin1 verantwortlich für die polarisierte Bindung von Dynein an die Mikrotubuli (Zhang *et al.*, 2003).

Die korrekte Dynein-Funktion ist wichtig für die neuronale Migration (Shu *et al.*, 2004; Tsai & Gleason, 2005), sie spielt keine Rolle bei der Axonelongation.

### 3. Grb2

DISC1 bildet einen dreifachen Komplex aus Grb2 (= growth factor receptor bound protein 2) und der schweren Kette von Kinesin1, wodurch DISC1 zusammen mit Kinesin1 Grb2 ans Axonende transportiert (Shinoda *et al.*, 2007). Grb2 besteht aus zwei SH3-Domänen und einer SH2-Domäne, wovon die N-terminale SH3-Domäne die Bindung mit DISC1 eingeht (Shinoda *et al.*, 2007).

Grb2 hat vielfältige zelluläre Funktionen. In Neuronen koppelt Grb2 Oberflächenrezeptoren an verschiedene intrazelluläre Signalwege, z. B. interagiert es mit der aktivierten Rezeptor-Tyrosin-Kinase, einer Rezeptorfamilie aus dem Bereich der Neurotrophine (Borrello *et al.*, 1994; MacDonald *et al.*, 2000; Nimnual *et al.*, 1998) und aktiviert so den Ras-ERK-Signalweg (Buday, 1999; Lowenstein *et al.*, 1992; Takenawa *et al.*, 1998). Neurotrophine sind Regulatoren für die Aufrechterhaltung, Entwicklung, Funktion und Plastizität von Neuronen (Chao, 2003; Huang & Reichardt, 2001; Huang & Reichardt, 2003). Ein wichtiges Neurotrophin, das durch Grb2 aktiviert wird, ist NT-3, welches u. a. die Axonelongation induziert. Somit kann gesagt werden, dass DISC1 durch die Interaktion mit Grb2 auch eine entscheidende Rolle beim Axonwachstum zukommt (Shinoda *et al.*, 2007).

### 4. PDE4B

PDE4B (= phosphodiesterase 4B) gehört zur PBE4-Familie, bestehend aus vier Genen (PDE4A-D), die zusammen für mindestens 20 verschiedene Protein-Isoformen codieren. PDE4 besitzt cAMP-Hydrolyse-Aktivität und ist somit in der Lage, die cAMP-Menge zu regulieren (Camargo *et al.*, 2007). Die molekulare Struktur besteht aus einer N-terminalen

Domäne, zwei regulatorischen Regionen, genannt UCR1 und UCR2 (UCR= upstream conserved regions), und einer katalytischen Domäne (Houslay & Adams, 2003).

Genetische, funktionelle und biochemische Daten fördern die Annahme, dass auch PDE4 in psychiatrische Erkrankungen involviert ist (Chubb *et al.*, 2008; Millar *et al.*, 2005b). So ist es von besonderer Bedeutung, dass PDE4 mit seiner UCR2-Domäne direkt an die N-terminale Kopf-Domäne von DISC1 bindet (Millar *et al.*, 2005b). Obwohl alle vier PDE4-Gene die UCR2-Domäne besitzen, wurde bisher nur von einer Interaktion zwischen der 71kDa DISC1-Isoform und PDE4B berichtet (Millar *et al.*, 2005b). Die Bindung der beiden Proteine ist dynamisch und abhängig vom zellulären cAMP. PDE4B dissoziiert von DISC1 und beginnt seine katalytische Aktivität, wenn sich das cAMP erhöht. Dies lässt vermuten, dass DISC1 PDE4B in eine Form mit geringer Aktivität überführt, solange der cAMP-Spiegel gering ist. Sobald das cAMP-Level steigt, löst sich PDE4 von DISC1 und beginnt cAMP zu hydrolysieren, um die cAMP-Signalkaskade wieder zu unterbrechen (Millar *et al.*, 2005b). Vermutlich wird die Funktion des DISC1/PDE4B-Komplexes auf verschiedenen Ebenen reguliert. Da beide Gene als Risikofaktoren erkannt wurden, ist es denkbar, dass eine Störung an irgendeiner Stelle in diesem Komplex zu einem wichtigen Faktor bei der Ätiologie der Schizophrenie wird.

## 5. FEZ1

FEZ1 (= fasciculation and elongation protein zeta 1) und sein Homolog, das Protein UNC-76 aus dem Nematoden *C. elegans*, repräsentieren eine neue Proteinfamilie, die am axonalen Wachstum und der Faszikulation beteiligt ist (Miyoshi *et al.*, 2003). Neuere Beobachtungen zeigen, dass FEZ1 auch eine Rolle beim Kinesin-abhängigen Transport innerhalb der Zelle spielt (Blasius *et al.*, 2007). In hippocampalen Neuronen der Ratte hat man die Expression von FEZ1 vermindert und konnte sehen, dass dies zu verschiedenen neuronalen Defekten führte, eingeschlossen Axonwachstum und intrazellulärer Transport (Ikuta *et al.*, 2007). Bei einer Überexpression von FEZ1 bindet DISC1 robust an FEZ1, und die beiden Proteine sind im axonalen Wachstumskegel von Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte kolokalisiert (Miyoshi *et al.*, 2003).

6. ATF4

ATF 4 (= activation transcription factor 4) moduliert zusammen mit DISC1 die Antwort auf zellulären Stress. So wird ATF 4 unter dem Einfluss von Stressoren aktiviert und geht eine Bindung mit DISC1 ein, um die initialen Effekte der Stressoren unter Kontrolle zu bringen (Carter, 2008).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Versuchstiere

Sämtliche Untersuchungen dieser Studie wurden an Lewis-Ratten aus der Versuchstierzucht des Friedrich-Loeffler-Instituts des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit in Tübingen (FLI) durchgeführt.

##### 3.1.2 Virus

Zur Infektion der Ratten wurde die 5. Rattengehirn-Passage des BDV-Strangs He/80 verwendet (Planz *et al.*, 2003). Die Infektionsdosis betrug 1000 µl und wurde als 10%ige Hirnsuspension auf 1,5 ml aufgefüllt und aerosolisiert.

##### 3.1.3 Antikörper und Seren

<u>Primärantikörper gegen:</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>
BDV p38/40 NP	Mouse-anti-BDV p38/40 protein 38/17C1, Prof. Dr. L.Stitz, FLI	1:1000
p NF: 7B2.E11	Zellkulturlinie mouse	1:50
Neurofilament H Non-Phosphorylated SMI-32	Covance	1:1000
3D4 anti-Disc-Antikörper	Prof. Dr. Korth, NPI	1:50
anti-NUDEL-Antikörper	Prof. Dr. Korth, NPI	unverdünnt

## Material und Methoden

<u>Normalserum</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Verdünnung</u>
Normal Horse Serum	Normal Horse Serum, Vector, S 1966	1:100

### 3.1.4 Chemikalien, Lösungen, Puffer

#### 3.1.4.1 Chemikalien, Lösungen, Puffer für Standardfärbungen

1. Hämalan: Mayers Hämalanlösung, MERCK 9249
2. Eosin: Eosin G 1%, Cerstistain<sup>®</sup>, MERCK 15935
3. KV-Lösung: 1 g Kresylviolett (MERCK 5235) und 2 ml 20%iger Essigsäure in 100 ml Aqua dest. (B. Braun) gelöst; die Lösung wird kurz vor Gebrauch filtriert

#### 3.1.4.2 Chemikalien, Lösungen, Puffer für immunhistochemische Färbungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde die gleiche Zusammensetzung der Lösungen bei allen immunhistochemischen Färbungen verwendet.

1. Primary Antibody Dilution Buffer:  
Dako REAL<sup>™</sup> Antibody Diluent, S 2022
2. PBS-Puffer (modifiziert nach Wood und Warnke, 1981):  
70,13 g NaCl (MERCK 6404)  
13,80 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MERCK 6346)  
54,40 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MERCK 5104)  
48 ml NaOH 1 N (MERCK 9956)  
auf 10 l Aqua dest. (B. Braun) aufgefüllt und ggf. mit 1-normaler NaOH auf einen pH von 7,6 eingestellt
3. Tween-Puffer:  
1,5 ml Tween<sup>®</sup> (Dako Tween<sup>®</sup> 20, S 1966) in 1 l PBS-Puffer

4. Hämalaun:
  - 1 g Hämatoxylin (MERCK 4302)
  - 0,2 g Na-Jodat (MERCK 6525)
  - 50 g Al-K-Sulfat (MERCK 1047)
  - 50 g Chloralhydrat (MERCK 2811)
  - 1 g Citronensäure (MERCK 244)auf 1 l Aqua dest. (B. Braun) aufgefüllt, vor Gebrauch mindestens 1 Woche stehen lassen
5. Citratpuffer:

Dako Cytomation Target Retrieval Solution 10x Concentrate S 1699, 1:10 in Aqua dest. gelöst und auf pH 6 eingestellt
6. Auf-/absteigende Alkoholreihe:
  - 70%iger Alkohol (Ethanol 70 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)
  - 96%iger Alkohol (Ethanol 96 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)
  - 100%iger Alkohol (Ethanol 99,5 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)
  - Xylol (MERC 8685)
7. DAB (3,3'-Diaminobenzidin):

Kurz vor der Verwendung Ansetzen der Gebrauchslösung. Mischen der Lösungen Substrat Buffer: DAB + Chromogen (X50) im Verhältnis 50:1 (Dako K 5007); bis zur Verwendung gekühlt und lichtgeschützt aufbewahren.
8. Peroxidase-Blocking Solution:

Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S 2023) zum Blocken der endogenen Peroxidase
9. UltraTek Kit:
  - Lösung 1: Sky Tek Laboratories ABN 999, UltraTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody
  - Lösung 2: Sky Tek Laboratories ABN 999, Ultra Tek HRP

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Infektion

Die Infektion der untersuchten Tiere erfolgte über die aerogene Route. Die Ratte wurde in den ersten 18 Stunden post partum dem Aerosol einer virushaltigen Gehirnsuspension in einer Begasungskammer ausgesetzt. Die Virusdosis von 1000  $\mu\text{l}$  wurde als 10%ige Hirnsuspension auf 1,5 ml aufgefüllt und aerosolisiert. Um die optimale Partikelgröße zur aerogenen Infektion zu erreichen, wurde das Aerosol mit dem Nebulizer der Firma Pari (PARI Respiratory Equipment, Inc.) generiert. Für die Deposition in die oberen und unteren Atemwege benötigt man Partikelgrößen mit folgenden Durchmessern:

100 % kleiner als 10  $\mu\text{m}$

60 % kleiner als 2,5  $\mu\text{m}$

52 % kleiner als 1,2  $\mu\text{m}$ .

Die neugeborenen infizierten Ratten blieben nach erfolgter Infektion bis zur Geschlechtsreife mit ihren Wurfgeschwistern bei der Mutter, danach wurden sie nach Geschlechtern getrennt.

### 3.2.2 Gehirnentnahme und Präparation

Die Ratten wurden in tiefe Narkose versetzt und durch Exartikulation des Atlantookzipitalgelenks getötet. Danach wurde der Kopf abgesetzt, das Gehirn dem Schädel entnommen und in 4%iges Paraformaldehyd eingelegt.

### 3.2.3 Aufarbeitung der Gehirne

#### 3.2.3.1 Einbetten in Paraffin

Die fixierten Gehirne wurden mit einer Skalpellklinge in der Medianen geteilt und die linke Gehirnhälfte parasagittal in Höhe der Hippocampus-Region geschnitten. Folgende Stücke wurden in eine Kunststoff-Einbettungskapsel mit Schwämmchen verbracht:

- eine circa 3 mm dicke Scheibe von median nach lateral der rechten Gehirnhälfte
- eine circa 3 mm dicke Scheibe transversal in Höhe der Hippocampus-Region von rostral nach caudal.

Die Entwässerung und Durchtränkung des Gewebes mit flüssigem Paraffin (Merc, Paraffin-pastillen, Erstarrungspunkt circa 56° - 58 °C für Histologie) erfolgte maschinell mit dem Autotechnicon Shandon Citadel 1000.

Das Ausgießen der Präparate wurde manuell am Shandon Histocentre 2 vorgenommen, sodass die Mediane und die Hippocampus-Region der Gehirnscheiben auf den entstandenen ausgehärteten Paraffin-Blöcken oben, also auf der Schnittfläche, zu liegen kamen. So entstanden zum einen Längsschnitte der rechten Gehirnhälfte von median nach lateral und Transversalschnitte der Hippocampus-Region der linken Gehirnhälfte von rostral nach caudal. Die erstellten Paraffin-Blöcke wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert und einige Stunden vor dem Schneiden bei 4 °C gekühlt.

#### 3.2.3.2 *Paraffinschnitte*

Von den bei 4 °C gekühlten Paraffin-Blöcken wurden mit dem Reichert-Jung Histoslides 2000 je Block circa 15 3 µm starke Schnitte gefertigt. Anschließend wurden diese zum Strecken der Schnitte einige Sekunden auf ein 47 °C warmes Wasserbad (Aqua dest.) gelegt und von diesem auf spezielle Objektträger (OT) (Menzel-Gläser, SuperFrost® Plus, J 1800 AMNZ) aufgezogen. Die OT wurden dann über Nacht in einem Wärmeschrank bei circa 51 °C getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei RT in staubgeschützten Kästen gelagert.

### 3.2.3.3 Entparaffinieren

Das Entparaffinieren der Schnitte wurde bei allen Standardfärbungen und immunhistochemischen Methoden vor der weiteren Bearbeitung in gleicher Weise vorgenommen.

Absteigende Alkoholreihe, Durchführung bei RT:

1. Xylol	12 - 15 min
2. 100%iger Alkohol (99,5 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)	ca. 10 sec
3. OTs trocknen lassen	ca. 5 min
4. 96%iger Alkohol (96 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)	ca. 10 sec
5. 70%iger Alkohol (70 % (V/V) mit 1 % Petroläther vergällt)	ca. 10 sec
6. Aqua dest.	bis zur weiteren Behandlung

### 3.2.4 Histologische Färbemethoden

Um eine Übersicht über den Zustand des zu untersuchenden Gewebes zu erhalten, bedient man sich der Hämatoxylin-Eosin-Färbung und der Kresyl-Violett-Färbung. Im Vordergrund steht hier die erste Beurteilung möglicher pathologischer Veränderungen wie u. a. entzündliche Infiltrate, Blutungen, Abweichungen in der Zelldichte und morphologische Veränderungen bestimmter Zellen.

Des Weiteren kann eine ungefähre Einschätzung der Schnittebene anhand bestimmter anatomischer Strukturen erfolgen.

Bei den Gewebeproben aller infizierten Tiere sowie der gesunden Kontrolltiere wurden die Hämatoxylin-Eosin (HE)- und Kresyl-Violett (Nissel, KV)-Färbung durchgeführt.

### 3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Diese Färbung ermöglicht eine einfache Übersicht über das Hirngewebe. Je nach Affinität werden die Zellstrukturen unterschiedlich angefärbt: Zellkerne erscheinen blauviolett durch Affinität ihres negativ geladenen Nukleinsäurematerials zum basischen Farbstoff Hämatoxylin. Zytoplasma und Neuropil werden durch den Farbstoff Eosin rosa angefärbt.

Durchführung der Färbung nach dem Entparaffinieren bei RT:

1. Hämalaun	5 min
2. Bläuen in Leitungswasser	4 min
3. 1%iges Eosin	1 min
4. Mehrfach spülen in Leitungswasser	
5. Aufsteigende Alkoholreihe (siehe Entparaffinieren)	je ca. 10 sec
6. Xylol	2 min
7. Eindecken mit Eucitt®	

### 3.2.4.2 Kresyl-Violett-Färbung

Diese Färbung dient zur Beurteilung der Nervenzelle und zur Schätzung der Zelldichte. Die Zellkerne färben sich dunkelblau und die im Zytoplasma vorkommenden Nissl-Schollen blau oder blauviolett. Zellfortsätze bleiben ungefärbt und Zytoplasma sowie Gliazellen stellen sich blassblau dar.

Durchführung der Färbung nach dem Entparaffinieren bei RT:

1. KV-Lösung (frisch filtriert)	5 min
2. Spülen in Aqua dest.	

3. 96%iges Ethanol mit 1 – 2 Tropfen Eisessig versetzt	1 min
4. Aufsteigende Alkoholreihe (siehe Entparaffinieren)	je ca. 10 sec
5. Xylol	2 min
6. Eindecken mit Eucitt®	

### 3.2.5 Immunhistochemische Färbungen

Diese Färbungen lassen eine nähere Beurteilung des Gewebes bezüglich bestimmter Proteine (Qualität und Quantität) und ihrer Verteilung und Lokalisation im Gewebe zu.

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgen nach institutsinternem Färbeschema. Bei der Verdünnung wurde diejenige gewählt, welche größtmögliche spezifische Färbeintensität bei kleinstmöglicher Hintergrundfärbung lieferte.

Zum Vergleich wurde bei allen immunhistochemischen Färbungen jeweils ein gesundes Kontrolltier im entsprechenden Alter mitgefärbt.

Zum Bedecken der OT zum Schutz vor Austrocknung wurde bei einigen Schnitten Parafilm (Parafilm „M“<sup>®</sup>, Pechiney Plastic Packing, PM-996) verwendet.

Immunhistochemisches Protokoll (UltraTek-Methode) mit DAB:

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

Die folgenden drei Protokolle werden zum Nachweis von BDV-AG, Neurofilamenten, dem DISC1-Protein und dem NUDEL-Protein angewendet. Bei jedem immunhistochemischen Durchlauf wird eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle werden statt des Primärantikörpers 100 µl Dako REAL™ Antibody Diluent aufgetragen. Alle sonstigen Schritte werden entsprechend dem vorliegenden Protokoll durchgeführt.

Immunhistochemisches Protokoll für BDV-AG, Durchführung bei RT:

1. Entparaffinieren	
2. OT abtropfen lassen und in feuchte Kammer legen, mit ca. 300 µl Blocking Solution beschichten (Inaktivierung endogener Peroxydasen)	10 min
3. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen, OT abtropfen lassen und in feuchte Kammer legen	kurz
4. OT mit ca. 300 µl Pferde-Normal-Serum/Schnitt (1:100 mit Dako REAL™ Antibody Diluent verdünnt) beschichten, mit Parafilm bedecken	30 min
5. Serum abkippen, OT mit ca. 100 µl Primär-AK-Lösung/Schnitt (Mouse-anti-BDV p38/40 protein 38/17C1 1:1000 mit Dako REAL™ Antibody Diluent verdünnt) beschichten und mit Parafilm bedecken	30 – 60 min
6. Mehrmals in Tween-Puffer spülen	kurz
7. OT mit ca. 300 µl UltraTek-Lösung 1/Schnitt beschichten und mit Parafilm bedecken	15 min
8. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
9. OT mit ca. 300 µl UltraTek-Lösung 2/Schnitt beschichten und mit Parafilm bedecken	15 min
10. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
11. OT mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung/Schnitt beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung	kurz
12. In Aqua dest. spülen	kurz
13. Gegenfärben mit Hämalaun	1 – 2 min
14. Bläuen in Leitungswasser	4 min
15. Aufsteigende Alkoholreihe	
16. Eindecken mit Eucitt®	

Immunhistochemisches Protokoll für Neurofilamente, Durchführung bei RT:

1. Entparaffinieren	
2. Vorbehandlung: Vom Aqua dest. in Citratpuffer im vorgeheizten Dampfgerät (Braun Multi Gourmet) (zur Demaskierung) kochen und in Tween-Puffer abkühlen	20 min
3. OT abtropfen lassen und in feuchte Kammer legen, mit ca. 300 µl Blocking Solution beschichten (Inaktivierung endogener Peroxydasen)	10 min
4. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen, OT abtropfen lassen und in feuchte Kammer legen	kurz
5. Serum abkippen, OT mit ca. 100 µl der entsprechenden Primär-AK-Lösung/Schnitt (p NF: 7B2.E11 1:50 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent oder Neurofilament H Non-Phosphorylated SMI-32 1:1000 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent) beschichten und mit Parafilm bedecken	30 – 60 min
6. Mehrmals in Tween-Puffer spülen	kurz
7. OT mit ca. 300 µl UltraTek-Lösung 1/Schnitt beschichten und mit Parafilm bedecken	15 min
8. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
9. OT mit ca. 300 µl UltraTek-Lösung 2/Schnitt beschichten und mit Parafilm bedecken	15 min
10. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
11. OT mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung/Schnitt beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung	kurz
12. In Aqua dest. spülen	kurz
13. Gegenfärben mit Hämalun	1 – 2 min
14. Bläuen in Leitungswasser	4 min
15. Aufsteigende Alkoholreihe	
16. Eindecken mit Eucitt®	

Material und Methoden

Immunhistochemisches Protokoll für DISC1- und NUDEL-Protein, Durchführung bei RT:

1. Entparaffinieren	
2. Vorbehandlung: vom Aqua dest. in Citratpuffer im vorgeheizten Dampfgarer (Braun Multi Gourmet) (zur Demaskierung) kochen und in Tween-Puffer abkühlen	20 min
3. In Tween-Puffer, mehrmals spülen, OT abtropfen lassen und in feuchte Kammer legen	kurz
4. OT mit ca. 300 µl Pferde-Normal-Serum/Schnitt (1:100 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent) beschichten, mit Parafilm bedecken	30 min
5. Serum abkippen, OT mit ca. 100 µl Primär-AK-Lösung/Schnitt (3D4 anti Disc 1:50 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent oder NUDEL unverdünnt) beschichten und mit Parafilm bedecken	60 min
6. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
7. OT abtropfen lassen und in feuchte Kammer legen, mit ca. 300 µl Blocking Solution beschichten (Inaktivierung endogener Peroxydasen)	10 min
8. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
9. OT mit ca. 300 µl UltraTek-Lösung 1/Schnitt beschichten und mit Parafilm bedecken	15 min
10. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
11. OT mit ca. 300 µl UltraTek-Lösung 2/Schnitt beschichten und mit Parafilm bedecken	15 min
12. Mehrmals mit Tween-Puffer spülen	kurz
13. OT mit ca. 300 µl frisch angesetzter DAB-Lösung/Schnitt beschichten, Dauer je nach Intensität der sichtbaren Braunfärbung	kurz
14. In Aqua dest. spülen	kurz
15. Gegenfärben mit Häkalaun	1 – 2 min

16. Bläuen in Leitungswasser	4 min
17. Aufsteigende Alkoholreihe	
18. Eindecken mit Eucitt®	

### 3.2.5.1 *Nachweis von BDV-Antigen*

Der verwendete Primär-AK richtet sich gegen das BDV-Nukleoprotein p38. Dieses wird vom BDV-offenen Leserahmen ORF I codiert und kommt außer als p38 noch in der Isoform p40 vor. AK gegen das p38 Protein können schon in sehr frühen Infektionsphasen nachgewiesen werden.

Bei den Gewebeproben aller Tiere wurde der Nachweis des BDV-Antigens durchgeführt.

### 3.2.5.2 *Neurofilamente (NF)*

NF sind das spezifische Intermediärfilament für Neuronen. Einer der verwendeten AK stellt die unreifen, nicht phosphorylierten NF dar. Der andere AK dient zur Markierung der reifen, phosphorylierten NF.

Bei den Gewebeproben aller Tiere wurde die immunhistochemische Färbung der Neurofilamente durchgeführt.

### 3.2.5.3 *DISC1-Protein und NUDEL (Nuclear distribution gene E homologue-like)-Protein*

Das DISC1-Protein liegt in verschiedenen Isoformen vor. Man vermutet, dass bestimmte Isoformen bestimmten Zellkompartimenten zugeordnet werden können. Der verwendete AK erkennt rekombinantes DISC1-Protein, und zwar die Isoformen: full-length-r DISC1, DISC1 C-terminal, DISC1 589-C-terminal. Dabei muss die Bindungsstelle des AKs N-terminal von AS 589 liegen. Das NUDEL-Protein ist ein Interaktionspartner des DISC1-Proteins, es bindet mit AS 201-280 an DISC1. Die immunhistochemischen Färbungen des DISC1- und NUDEL-Proteins wurden an ausgewählten Ratten bestimmten Alters durchgeführt. Dabei handelt es

sich um die eine Woche alte Ratte 1.NBAE.1, die sechs Wochen alte Ratte 6.NBAE T8 und die 22 Wochen alte Ratte 22.NBAE ♀1.

### 3.2.6 Eindecken

Das Eindecken der OT wurde nach allen Färbungen in gleicher Weise von Hand mit Eucitt<sup>®</sup> (Eucitt<sup>®</sup> O. Kindler GmbH & Co Lot-N<sup>o</sup> C17) und Deckgläsern (Menzel, OT Menzel-Gläser, SuperFrost<sup>®</sup>Plus, J 1800 AMNZ) durchgeführt.

### 3.2.7 Auswertung der Standard- und immunhistochemischen Färbungen

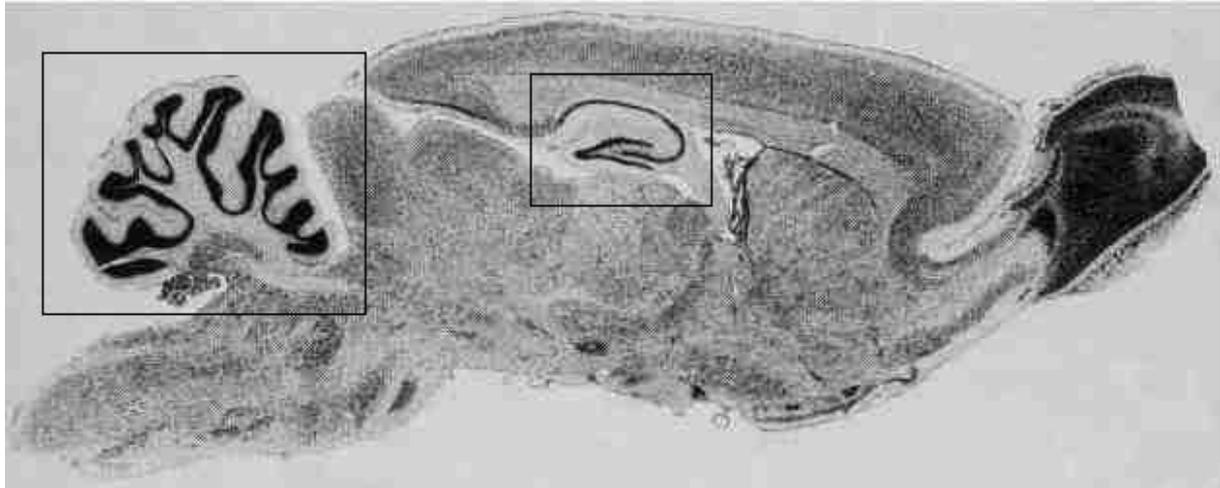
Bei der HE- und KV-Färbung wurde das ganze Gehirn befundet.

Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbung des Nukleoproteins N (p38) wurden fünf Regionen des Gehirns befundet: Hippocampus (HC) mit Pyramidenzellschicht, Kleinhirn (KH) mit Körnerzellschicht (KZ-Schicht), Purkinje-Zellschicht (PZ-Schicht), Molekularschicht (Mol.-Schicht) und Mark. Zum besseren Vergleich wurden die Ergebnisse in einer Tabelle (*Tabelle 2*) zusammengefasst.

Bei der Darstellung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der NF und des DISC1- und NUDEL-Proteins wurden exemplarisch hauptsächlich HC und KH beschrieben, und zwar aus drei Gründen: 1. konnten in diesen beiden Regionen die morphologischen und immunhistochemischen Veränderungen des Gehirns bei NBAE-Ratten am deutlichsten gezeigt werden, z. B. an den NF der Purkinje-Zellen, 2. weil der HC das Hauptzielgebiet des BDV darstellt und 3. weil für den HC in der Literatur eine extrem hohe Dichte/Expression des DISC1-Proteins beschrieben wird (Lipska et al., 2006; James et al., 2004) und er eine maßgebliche Rolle bei der Schizophrenie spielt.

In *Abbildung 6* ist ein lichtmikroskopischer Sagittalschnitt eines Rattengehirns zu sehen, das KH und die Hippocampusformation, bestehend aus CA (Cornu ammonis) und Gyrus dentatus (Dentate Gyrus), sind markiert. In *Abbildung 7* ist die Hippocampusformation isoliert dargestellt. Sie dient der Dokumentation der einzelnen Abschnitte CA1-CA4 des HC.

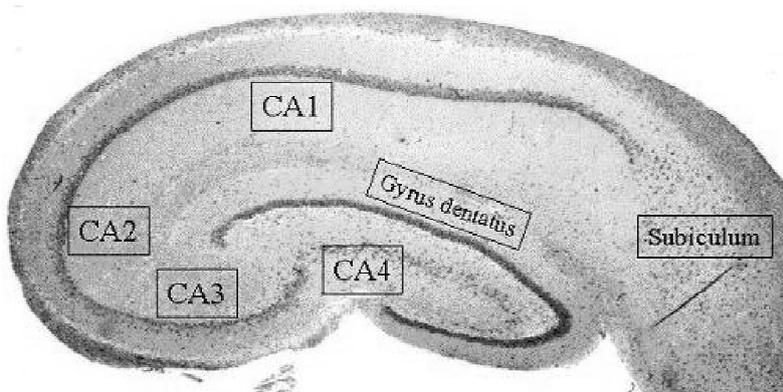
Abbildung 6: Sagittalschnitt des Gehirns einer Ratte



Eingerahmte Strukturen = Kleinhirn und Hippocampusformation (bestehend aus HC und Gyrus dentatus)

aus: Nauta, W. J. H., Feirtag, M. (1984) Die Architektur des Gehirns

Abbildung 7: Hippocampusformation



Hippocampusformation mit seinen einzelnen morphologisch und funktionell unterschiedlichen Regionen: Cornu ammonis (CA) 1 bis 4 und Gyrus dentatus

aus: Dissertation von Stephan Nicolas Schubert (2003)

## 4 Ergebnisse

Um die Veränderungen der Gehirne von infizierten Tieren bei den immunhistochemischen Färbungen deutlich zu machen, ist bei den Abbildungen jedem Versuchstier jeweils ein nicht infiziertes Kontrolltier im entsprechenden Alter gegenübergestellt (ausgenommen *Abbildung 10* und *11*). Das Präparat des nicht infizierten Tieres trägt jeweils die Bezeichnung NL (Lewis-Ratte), das des infizierten Tieres die Bezeichnung NBAE. Die vorangehende Zahl gibt das Alter des Tieres in Wochen an.

### 4.1 Klinik

Die Daten zu Infektionsdosis, Alter und Geschlecht der Tiere sowie klinische Befunde wurden vom Friedrich-Loeffler-Institut zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in *Tabelle 1* aufgelistet.

Tabelle 1: Allgemeine Informationen zu den Versuchstieren

Tier	Geschlecht	Alter bei Tötung in Wochen	Virusdosis in $\mu$ l (Infektion am 07.08.'07)	Symptome
1.NBAE 1	k. A.	1	1000	o. b. B.
1.NBAE 2	k. A.	1	1000	o. b. B.
2.NBAE 1	k. A.	2	1000	o. b. B.
2.NBAE 2	k. A.	2	1000	o. b. B.
4.NBAE T5	k. A.	4	1000	o. b. B.
4.NBAE T6	k. A.	4	1000	o. b. B.
6.NBAE T7	k. A.	6	1000	o. b. B.
6.NBAE T8	k. A.	6	1000	o. b. B.
9.NBAE #9	k. A.	9	1000	o. b. B.
9.NBAE #10	k. A.	9	1000	o. b. B.

## Ergebnisse

22.NBAE ♀1	♀	22	1000	o. b. B.
22.NBAE ♀2	♀	22	1000	o. b. B.
22.NBAE ♀3	♀	22	1000	o. b. B.
22. Mutter	♀	22	n. i.	o. b. B.

Abkürzungen: k. A.= keine Angaben, o. b. B.= ohne besondere Befunde, n. i.= nicht infiziert

### 4.2 Neuropathologie

Bei der Auswertung der Schnitte wurde vornehmlich auf Entzündungsreaktionen in Form von perivaskulären mononukleären Infiltraten, Zelldichte, v. a. Purkinje-Zellen (PZ) im Kleinhirn und Substanzverlust geachtet.

Da sich die Ergebnisse mit den Untersuchungen aus den vorhergegangenen Dissertationen decken, folgt eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur HE- und KV-Färbung:

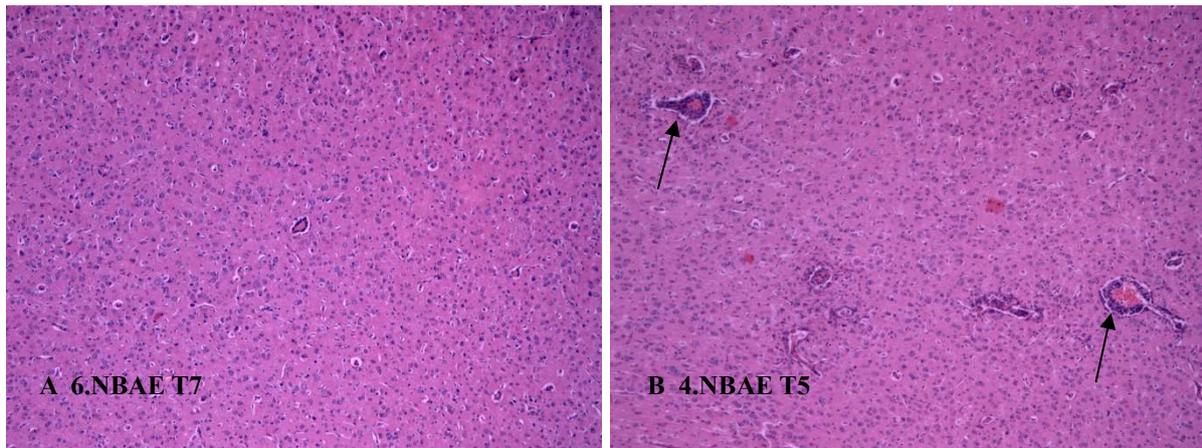
Generell sind alle Kontrolltiere frei von Auffälligkeiten.

Der größte Teil der neonatal infizierten Tiere zeigt keine offensichtlichen für die BD typischen Entzündungsreaktionen und/oder Degenerationen. Bei den untersuchten Schnitten findet man bei zwei Tieren (6.NBAE T7, 6.NBAE T8) kleine perivaskuläre Infiltrate. Bei einem der vier Wochen alten Tiere (4.NBAE T5), siehe *Abbildung 8 B*, ist eine deutliche Entzündungsreaktion in Form von perivaskulären Infiltraten (*Pfeile*) zu erkennen.

Die Mutter ist frei von Entzündungsreaktionen, bei ihr treten keine auffälligen Veränderungen an den Neuronen auf.

## Ergebnisse

Abbildung 8: HE, Vergrößerung ca. x 75

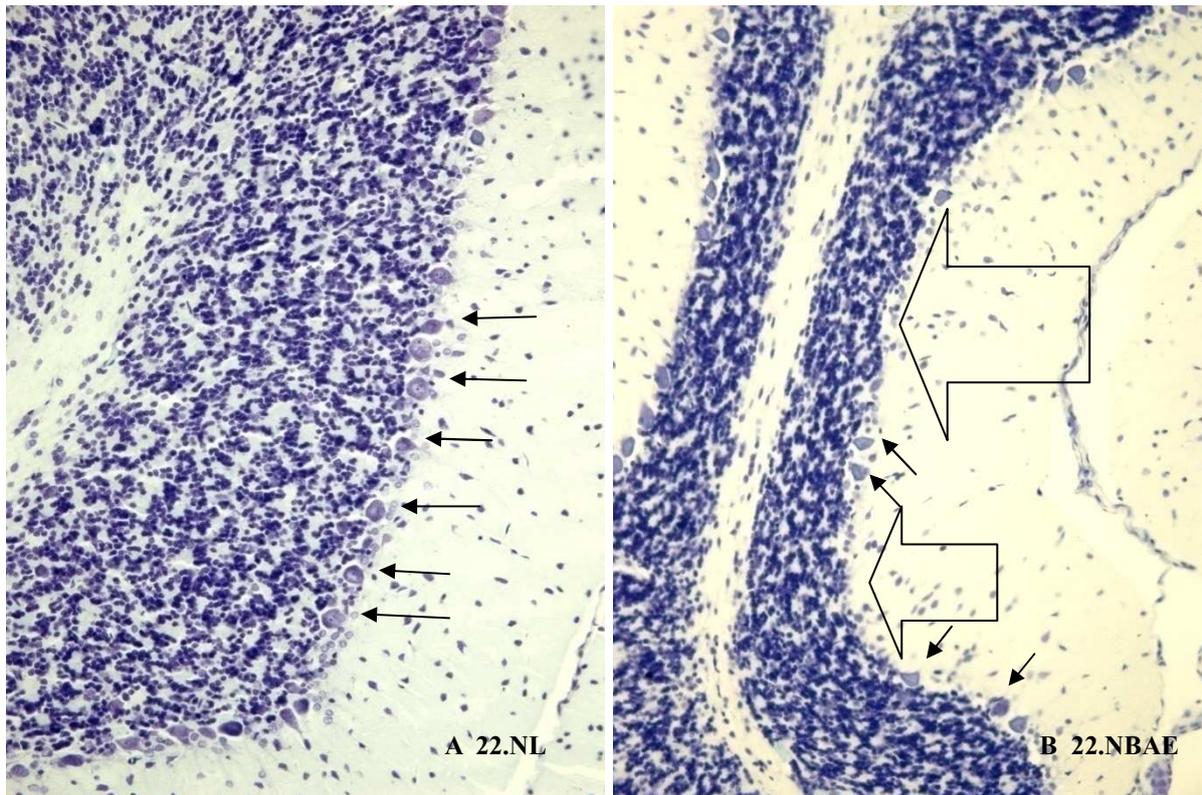


A: sechs Wochen alte infizierte Ratte (6.NBAE T7):  
perivaskuläre Mini-Infiltrate im Cortex

B: vier Wochen alte infizierte Ratte (4.NBAE T5):  
mononukleäre gefäßassoziierte Infiltrate im Cortex

Die Purkinje-Zellzahl kann erst ab einem Alter von zwei Wochen beurteilt werden, da vorher die Kleinhirntogenese noch nicht abgeschlossen ist. Die beiden vier Wochen alten Tiere (4.NBAE T5 und 4.NBAET6) zeigen eine dem Alter entsprechende Zelldichte. Bei den sechs Wochen alten Ratten (6.NBAE T7 und 6.NBAET8) kann bereits eine geringgradige Verminderung der Purkinje-Zellzahl beobachtet werden, die sich bei den älteren Tieren weiter fortsetzt, bis zu einer deutlichen Verminderung im Alter von 22 Wochen (22.NBAE♀1, 22.NBAE♀2, 22.NBAE♀3). In *Abbildung 9 A* ist ein gesundes 22 Wochen altes Kontrolltier mit unveränderter Purkinje-Zelldichte (*Pfeile*) abgebildet, bei der *Abbildung 9 B* des infizierten 22 Wochen alten NBAE-Tieres ist der Verlust der Purkinje-Zellen durch *Blockpfeile* gekennzeichnet, die *kurzen Pfeile* zeigen auf deformierte Purkinje-Zellen.

Abbildung 9: KV, Vergrößerung ca. x 125



A: 22 Wochen altes Kontrolltier: unveränderte PZ-Dichte (*Pfeile*)

B: 22 Wochen alte NBAE-Ratte: deutlich verminderte PZ-Dichte (*Blockpfeile*) mit wenigen deformierten PZ (*Pfeile*)

Gehirnmorphologische Auffälligkeiten bestehen in kortikaler Schrumpfung bei drei Tieren (9.NBAE #10, 22.NBAE ♀2, 22.NBAE ♀3), wobei bei Tier 22.NBAE ♀2 die kortikale Atrophie mit einer Kleinhirnatrophie einhergeht. Des Weiteren fällt bei drei Tieren ein erweiterter Ventrikel auf (6.NBAE T8, 9.NBAE #9, 9.NBAE #10), zwei Tiere haben einen Hydrozephalus (22.NBAE ♀2 und 22.NBAE ♀3).

### 4.3 Infektionsausbreitung

Bei dieser immunhistochemischen Färbung wurde das p38-Protein des BDV nachgewiesen. Zuerst wurde das ganze Gehirn auf positive Zellen untersucht. Dabei stellte man fest, dass alle NBAE-Tiere erfolgreich infiziert wurden und p38-positive Zellen aufwiesen, auch die Mutter war p38 positiv. Zur Auswertung wurden in der Hippocampusregion und im Kleinhirn bei

## Ergebnisse

400-facher Vergrößerung in zwei bis drei repräsentativen Gesichtsfeldern die gesamten p38-positiven Zellen ausgezählt und aus dem Mittelwert der prozentuale Anteil infizierter Zellen an der Gesamtzellzahl ermittelt. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 2* aufgeführt.

Bei den Kontrollratten wurde die Immunhistochemie mit dem Anti-p38-Antikörper nicht durchgeführt, da diese Tiere keinen Kontakt mit dem Virus oder infizierten Tieren hatten.

Tabelle 2: Infektionsausbreitung anhand BDV-p38

Tier	p38				
	Hippocampus	Kleinhirn			
	Pyramidenzell-Schicht	KZ-Schicht	PZ-Schicht	Mol.-Schicht	Mark
4.NBAE T5	21,8	19,3	78,6	2,6	20,7
4.NBAE T6	28,3	11,0	10,0	0,8	11,9
6.NBAE T7	65,8	18,2	0	10,1	40,0
6.NBAE T8	43,2	33,6	10,0	23,7	33,8
9.NBAE #9	46,8	23,1	25,0	9,5	3,5
9.NBAE #10	53,3	33,4	41,7	9,4	20,8
22.NBAE ♀1	52,2	30,4	29,2	14,8	22,5
22.NBAE ♀2	61,4	29,4	33,3	19,1	15,5
22.NBAE ♀3	54,2	42,4	16,7	15,2	21,1
22.Mutter	55,0	29,0	0	5,0	9,2

Abkürzungen: KZ-Schicht = Körnerzell-Schicht, PZ-Schicht = Purkinjezell-Schicht, Mol.-Schicht = Molekularschicht, Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzellzahl in (%)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das p38-Protein im Gehirn neonatal BDV-infizierter Ratten weitverbreitet ist. Alle experimentell infizierten Tiere weisen angefärbte Zellen auf. Bei den eine Woche alten Tieren sind nur vereinzelt infizierte Zellen im Cortex zu finden. Die zwei Wochen alten Ratten weisen neben angefärbten Zellen im Cortex schon vereinzelt infizierte Zellen in Hippocampus und Kleinhirn auf, jedoch sind diese aufgrund der noch nicht abgeschlossenen Gehirntogenese nicht quantifizierbar. In *Tabelle 2* werden somit diese ganz jungen Tiere (1.NBAE 1, 1.NBAE 2, 2.NBAE 1, 2.NBAE 2) bei der prozentualen Auswertung nicht berücksichtigt.

## Ergebnisse

Das Muttertier ist in der Immunhistochemie positiv, das Verteilungsmuster ähnelt dem der neonatal infizierten Ratten, jedoch sind insgesamt weniger Zellen infiziert und die Purkinje-Zellen des Kleinhirns, deren Anzahl nicht vermindert ist, sind frei von p38-Protein.

Bei der prozentualen Auswertung kann Folgendes festgestellt werden:

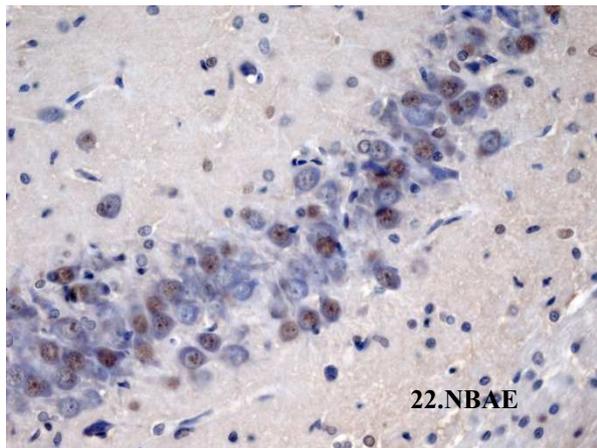
In der Pyramidenzellschicht des Hippocampus ist eine deutliche Zunahme von infizierten Zellen mit steigendem Alter festzustellen. Im Alter von vier Wochen sind durchschnittlich 25 % der Pyramidenzellen infiziert, im Alter von 22 Wochen werden bereits ca. 56 % in der Immunhistologie als positiv beurteilt. Die höchste Prozentzahl in dieser Schicht beträgt 61,4 % bei Tier 22.NBAE ♀2. Im Kleinhirn zeigen sich insgesamt schwankende Zahlen. In der Purkinje-Zellschicht sind bei manchen Tieren keine Zellen infiziert, bei anderen werden sehr hohe Prozentzahlen erreicht, z. B. sind bei Tier 4NBAE T5 78,6 % der Zellen infiziert. Auch in der Molekularschicht und im Kleinhirnmark ist die Anzahl der infizierten Zellen sehr unterschiedlich, sodass festgestellt werden kann, dass die Anzahl infizierter Zellen in diesen Schichten geringer ist als in der Pyramiden- und Körnerzellschicht. In der Körnerzellschicht wird ein rascher Anstieg an infizierten Zellen festgestellt, und ab einem Alter von sechs Wochen weist diese Schicht, verglichen mit den anderen Schichten, eine gleichmäßige Infektion von durchschnittlich ca. 30 % auf.

In *Abbildung 10* und *11* sind deutlich zahlreiche BDV-p38-positive Zellen (braun) zu erkennen. Bei der p38-Färbung gibt es Zellen, bei denen nur der Zellkern oder das Zytoplasma angefärbt sind, und Zellen, bei denen beide Zellkompartimente angefärbt sind. Des Weiteren fällt auf, dass die Anzahl infizierter Zellen in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus in den verschiedenen Regionen unterschiedlich hoch ist. Die CA1-Region weist bei vielen Tieren eine größere Menge infizierter Zellen als die CA2- und CA3-Region auf.

Viele Purkinje-Zellen zeigen weder im Zellkern noch im Zytoplasma Anzeichen einer BDV-Infektion, sind aber regelmäßig von BDV-positiven Gliazellen umgeben, was sich als mehr oder weniger dicker brauner perizellulärer Saum darstellt.

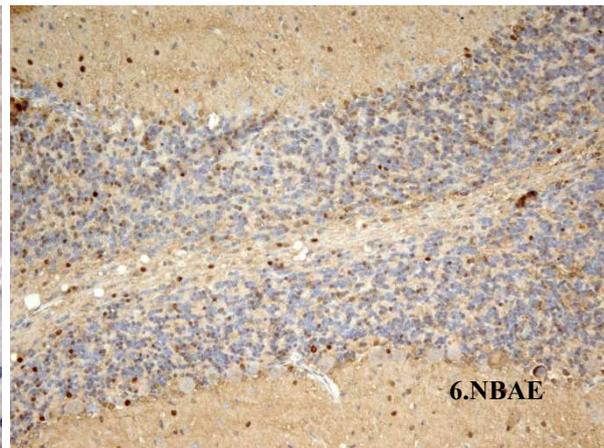
## Ergebnisse

Abbildung 10: BDV p38, Vergrößerung ca. x 125



Einzelne p38-positive Zellen in der CA3-Region des Hippocampus von Tier 22.NBAE ♀3

Abbildung 11: BDV p38, Vergrößerung ca. x 100



Zahlreiche p38-positive Zellen im Kleinhirn von Tier 6.NBAE T8

### 4.4 Neurofilamente

Zur Darstellung der neurofilamentären Strukturen wurden zwei unterschiedliche Antikörper verwendet. Ein Antikörper richtete sich gegen die phosphorylierten reifen Neurofilamente, der andere gegen die noch nicht phosphorylierten, sich in Reifung befindlichen Neurofilamente. Um die Veränderungen der Neurofilamentstruktur während der Entwicklung darzustellen, wurden die Gehirne von Ratten im Alter von einer, sechs und 22 Wochen abgebildet. Die Beurteilung beschränkte sich auf Strukturen aus dem Kleinhirn, der Hippocampusformation und Pyramidenzellen aus Stammhirnganglien.

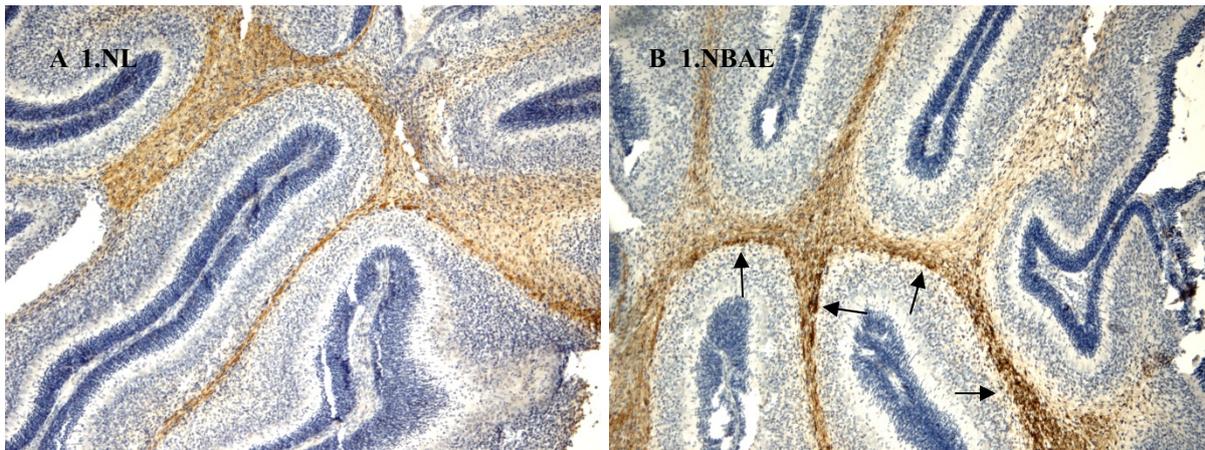
#### 4.4.1 Phosphorylierte Neurofilamente (pNF)

##### Erste Lebenswoche

PNF sind im Alter von einer Woche bei den meisten Neuronen relativ schwach dargestellt. Im Mark des sich entwickelnden Kleinhirns sind diese jedoch gut zu erkennen. Bei einer Woche alten BDV-infizierten Ratten wird das pNF im Kleinhirnmak stärker exprimiert (*Pfeile*) als bei nicht infizierten Kontrollratten (*Abbildung 12 A und B*). Eine stärkere Expression der pNF sieht man auch bei wenigen Neuronen im Stammhirn.

## Ergebnisse

Abbildung 12: pNF, Vergrößerung ca. x 40



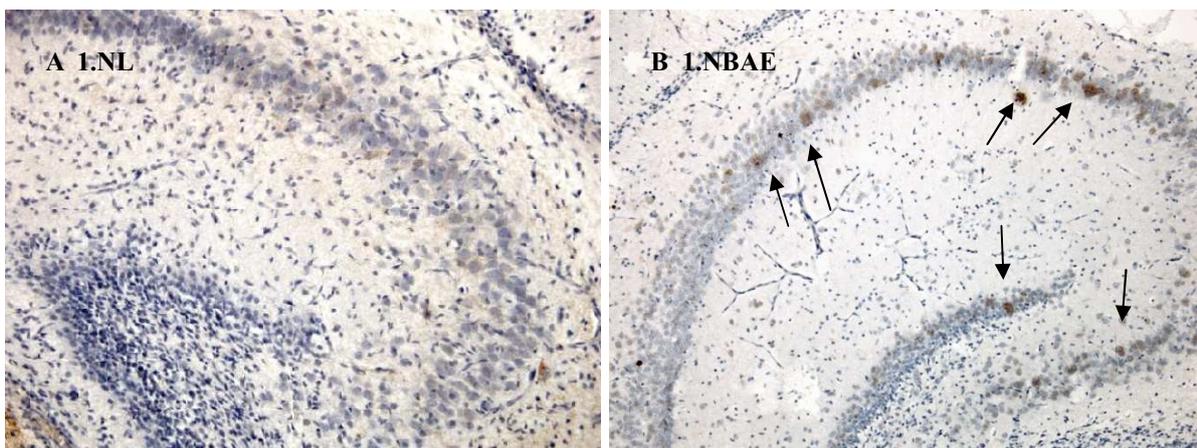
A: eine Woche altes Kontrolltier: pNF im Kleinhirnmark

B: eine Woche altes NBAE-Tier: stellenweise stärker angefärbte pNF (*Pfeile*) im Kleinhirnmark

Im Hippocampus nicht infizierter Tiere ist das pNF im Stratum pyramidale des Cornu ammonis in der Regel fein und regelmäßig verteilt (*Abbildung 13 A*). Dagegen bilden pNF bei infizierten Tieren gerade in diesem Bereich eigentümliche „kondensierte“ Strukturen (*Pfeile*) (*Abbildung 13 B*).

Abbildung 13: pNF, Vergrößerung NL ca. x 70

Vergrößerung NBAE ca. x 60



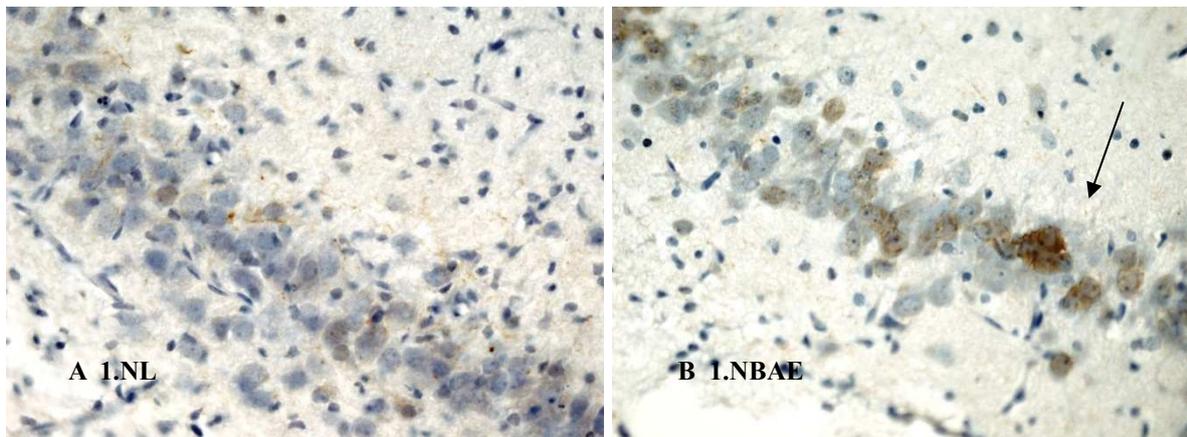
A: eine Woche altes Kontrolltier: gleichmäßige fein verteilte Färbung der pNF im Hippocampus

B: eine Woche altes NBAE-Tier: runde konzentrierte Anfärbungen (*Pfeile*) der pNF im Hippocampus

## Ergebnisse

Bei stärkerer Vergrößerung (x 125) lassen sich bei beiden Tieren Reaktionen im Zytoplasma und im Kern der Pyramidenzellen erkennen (*Abbildung 14 A und B*). In *Abbildung 14 B* sind die Aggregationen der pNF bei NBAE-Ratten deutlich zu erkennen.

Abbildung 14: pNF, Vergrößerung ca. x 125



A: eine Woche altes Kontrolltier: feine Darstellung der pNF im CA-Band des Hippocampus

B: eine Woche altes NBAE-Tier: körnige Kondensationen der pNF (*Pfeil*) im CA-Band des Hippocampus

### Sechste Lebenswoche:

Ab einem Alter von sechs Wochen färben sich die pNF deutlicher an.

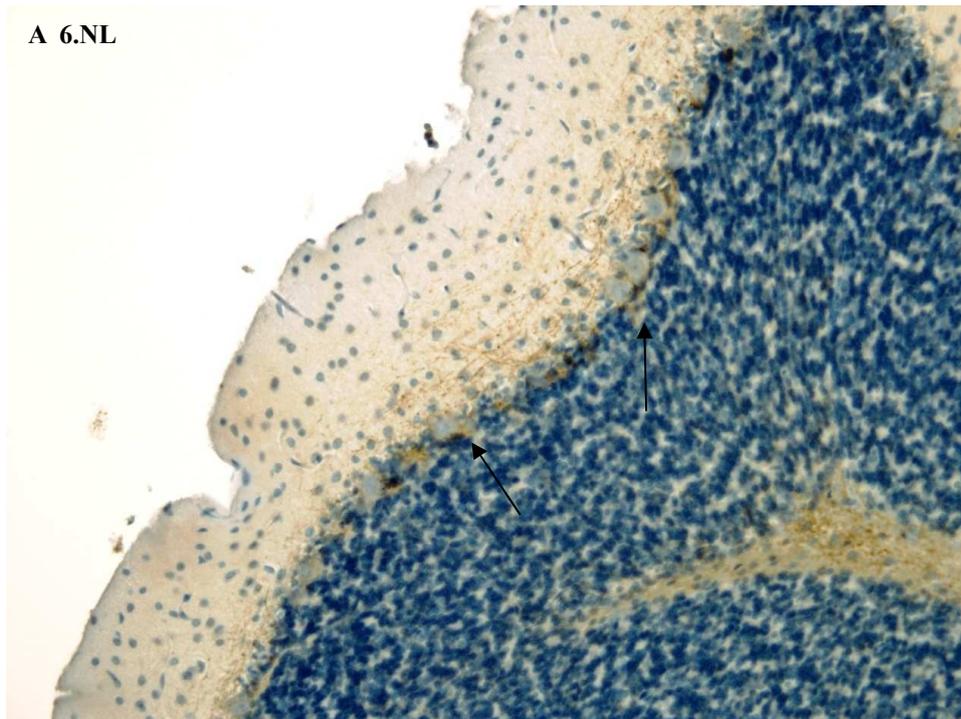
Bei sechs Wochen alten nicht infizierten Ratten sind die Pyramidenzellen im Hippocampus alle von einem feinen Geflecht aus Neurofilament umgeben, bei einigen Zellen zeigt sich dieses Geflecht auch im Zytoplasma. Bei infizierten Ratten zeigt sich, dass Strukturveränderungen an den Neurofilamenten im Hippocampus mit dem Alter zunehmen. Bei den BDV-NBAE-Ratten sind an einigen Stellen körnige Kondensationen und Aggregationen der Filamentstrukturen zu sehen. An anderen Stellen scheinen pNF völlig zu fehlen. Insgesamt exprimieren NBAE-Ratten gegenüber nicht infizierten Ratten weniger pNF. Die Kerne sind sowohl bei nicht infizierten als auch bei infizierten Tieren negativ.

### Veränderungen der pNF-Expression an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns

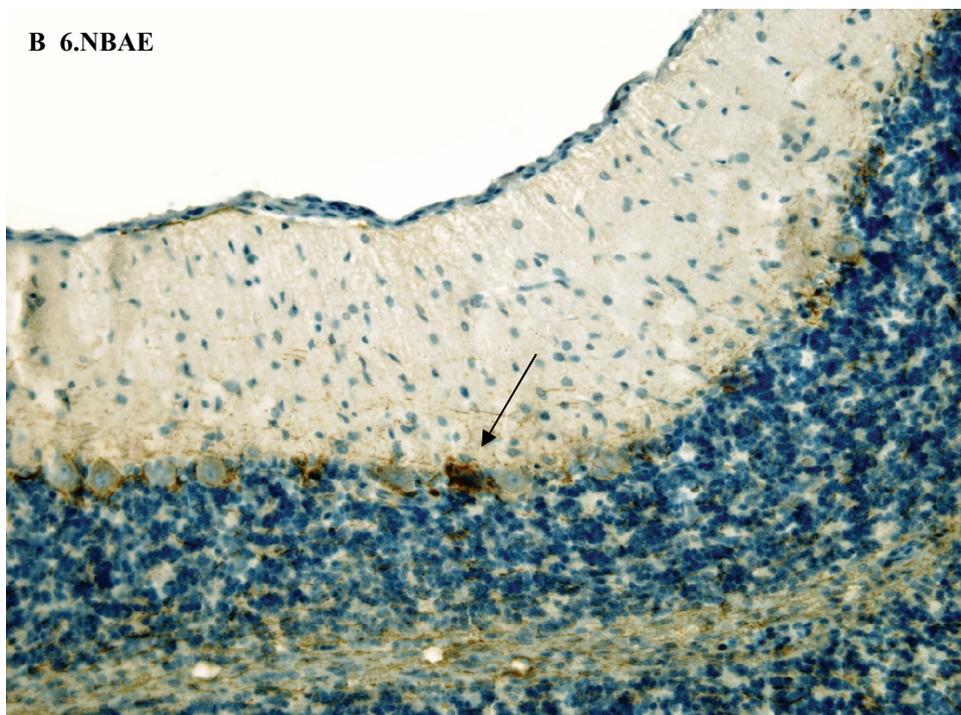
Besonders deutlich lassen sich Veränderungen in der Neurofilamentstruktur an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns bei starker Vergrößerung darstellen. Bei nicht infizierten sechs Wochen alten Ratten reihen sich die Purkinje-Zellen in regelmäßigen Abständen aneinander, und jede einzelne Zelle ist von einem feinen Saum aus pNF umgeben. Die Dendriten verästelten sich weit in die Molekularschicht der Kleinhirnrinde hinein. In der Körnerzellschicht erkennt man angeschnittene Axone der Purkinje-Zellen (*Abbildung 15 A, Pfeile*). Im Vergleich dazu sieht man bei infizierten Ratten, deren Purkinje-Zellzahl vermindert ist, wie die Neurofilamente an manchen Stellen Aggregationen bilden (*Abbildung 15 B, Pfeil*). Die Dendriten der Purkinje-Zellen reichen bei infizierten Tieren nicht so weit in die Molekularschicht hinein, die Verästelung ist nur über kurze Strecken zu verfolgen und wirkt stellenweise wie abgebrochen (*Abbildung 15 B und 16 B*). *Abbildung 16* zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von *Abbildung 15*, hier lassen sich die Befunde noch deutlicher erkennen. Im Perikaryon der Purkinje-Zellen sind nur wenige Reaktionsprodukte identifizierbar. In *Abbildung 16 B* befinden sich in der Molekularschicht des Kleinhirns leichte Geweberisse als Artefakt.

## Ergebnisse

Abbildung 15: pNF, Vergrößerung ca. x 125



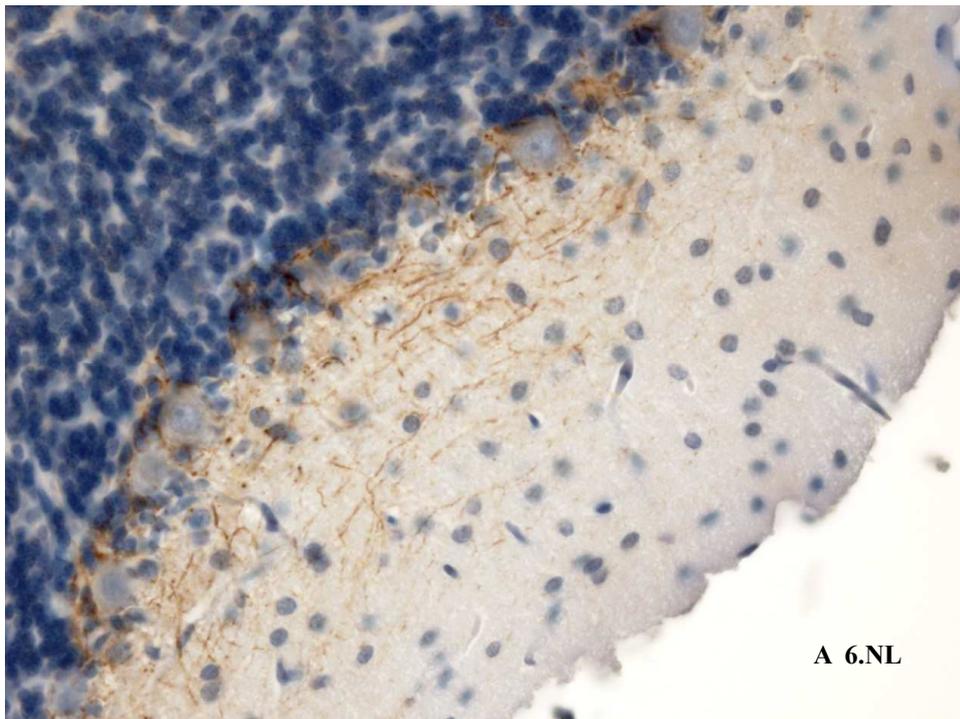
A: sechs Wochen altes Kontrolltier: feine Verästelung der Fortsätze bis weit in die Molekularschicht hinein mit angeschnittenen Axonen in der Körnerzellschicht (*Pfeile*)



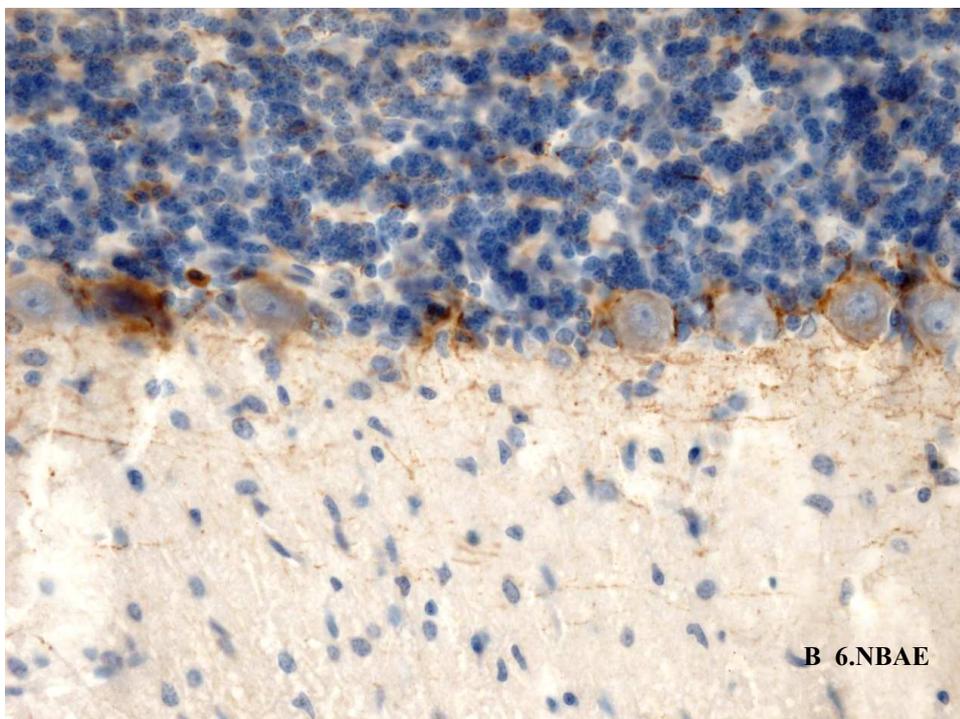
B: sechs Wochen altes NBAE-Tier: unterbrochene Verästelung der Dendriten in der Molekularschicht und deutliche Aggregation der pNF (*Pfeil*)

## Ergebnisse

Abbildung 16: pNF, Vergrößerung ca. x 160



A: sechs Wochen altes Kontrolltier: feine Verästelung der Fortsätze bis weit in die Molekularschicht hinein und schwache Darstellung der pNF im Perikaryon



B: sechs Wochen altes NBAE-Tier: unterbrochene Verästelung der Dendriten in der Molekularschicht und schwache Darstellung der pNF im Perikaryon

## Ergebnisse

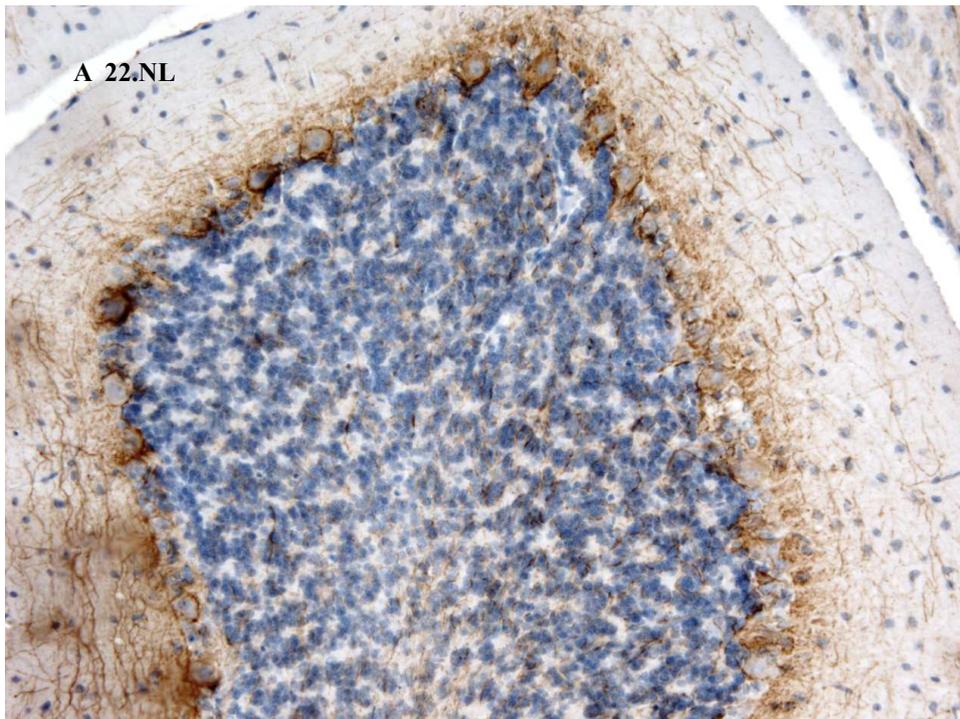
Bei 22 Wochen alten Ratten verstärken sich die Veränderungen an den Neurofilamenten zunehmend.

Bei Kontrolltieren erkennt man, dass gesunde Purkinje-Zellen von einem deutlich angefärbten Saum von Neurofilamenten umgeben werden. Das Perikaryon ist schwach reaktiv, der Zellkern ist negativ (*Abbildung 17 A*). Verglichen mit sechs Wochen alten Ratten (*Abbildung 15 A*) nimmt die Reaktion der pNF deutlich zu. Ein ausgeprägtes Netzwerk von Dendriten und Axonen ist gut identifizierbar und kann bis weit in die Molekularschicht der Kleinhirnrinde verfolgt werden (*Abbildung 17 A*).

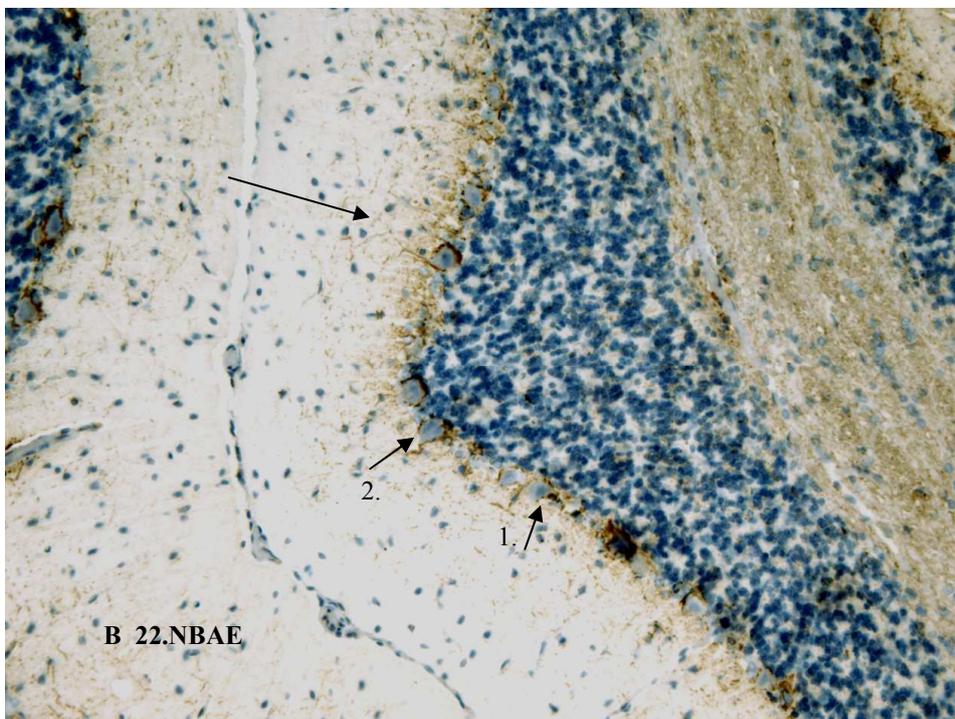
Im Vergleich dazu fällt bei infizierten Gehirnen die stark verminderte Purkinje-Zellzahl auf (*Abbildung 17 B*). Zur Darstellung der Veränderungen an den Neurofilamenten wird zur Dokumentation ein Bereich des Kleinhirns ausgewählt, in dem relativ viele Purkinje-Zellen erhalten sind (*Abbildung 18 B*). Manche dieser Zellen sind von Neurofilament umgeben, wobei hier die pNF punktuell körnige Kondensationen und Aggregationen bilden. Oftmals sind die Zellen nicht vollständig von einem Neurofilament-Saum umgeben. Einigen Purkinje-Zellen fehlt die Ummantelung mit Neurofilamenten vollständig (*Abbildung 17 B und Abbildung 18 B, kurze Pfeile Nr. 1*), oder nur die Hälfte der Zelle wird von Neurofilamenten ummantelt (*Abbildung 17 B und Abbildung 18 B, kurze Pfeile Nr. 2*). Das Zytoplasma und der Kern sind negativ (*Abbildung 17 B und Abbildung 18 B*). Die Verästelung der Dendriten nimmt im Vergleich zu den sechs Wochen alten NBAE-Tieren weiter ab und die Neurofilamente sind weniger reaktiv als bei Kontrolltieren. An Stellen, an denen noch einige Purkinje-Zellen erhalten sind, sind noch feine Dendriten identifizierbar (*Abbildung 17 B, langer Pfeil*). Diese enden größtenteils blind in der Molekularschicht, sind an vielen Stellen akkumuliert und wirken dadurch perlschnurartig aufgetrieben. In manchen Bereichen – mit vorhandenen Purkinje-Zellen – erscheint die Struktur der Dendriten völlig aufgelöst (*Abbildung 18 B*).

## Ergebnisse

Abbildung 17: pNF, Vergrößerung ca. x 125



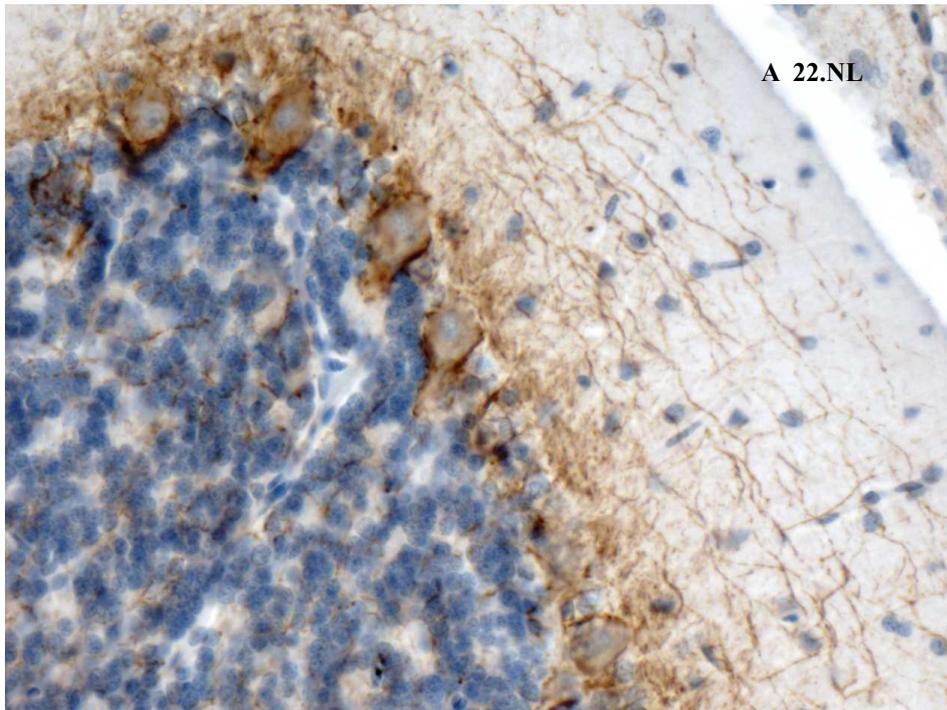
A: 22 Wochen alte Kontrollratte: PZ von NF-Saum umgeben, Perikaryon schwach angefärbt, feine Verästelungen der Fortsätze sind bis weit in die Molekularschicht hinein zu verfolgen



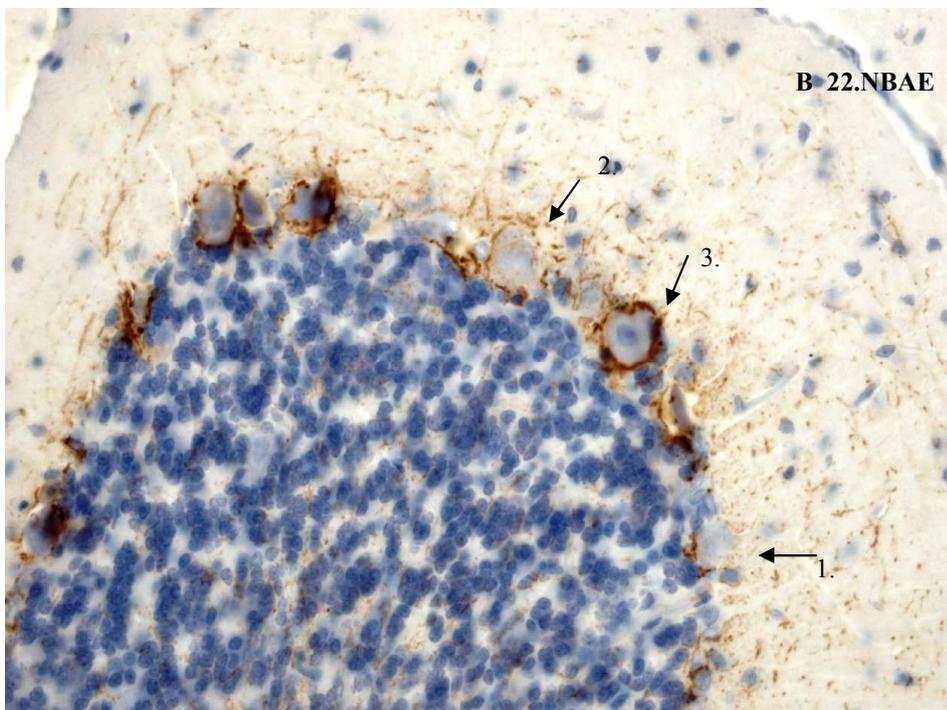
B: 22 Wochen altes NBAE-Tier: verminderte PZ-Zahl; NF-Saum der PZ fehlt vollständig (*Pfeil Nr. 1*) oder teilweise (*Pfeil Nr. 2*); Dendriten sind stellenweise noch ausgebildet (*langer Pfeil*)

## Ergebnisse

Abbildung 18: pNF Vergrößerung ca. x 160



A: 22 Wochen altes Kontrolltier: NF-Saum der PZ deutlich zu erkennen, feine und kontinuierliche Verästelung der Dendriten und Axone, schwache Darstellung von pNF im Perikaryon



B: 22 Wochen alte NBAE-Ratte: NF-Saum der PZ: fehlt vollständig (*Peil Nr.1*), fehlt teilweise (*Pfeil Nr.2*), ist vollständig vorhanden (*Pfeil Nr.3*); Dendriten und Axone sind perlschnurartig aufgetrieben und abgebrochen

#### 4.4.2 Nicht phosphorylierte Neurofilamente (npNF)

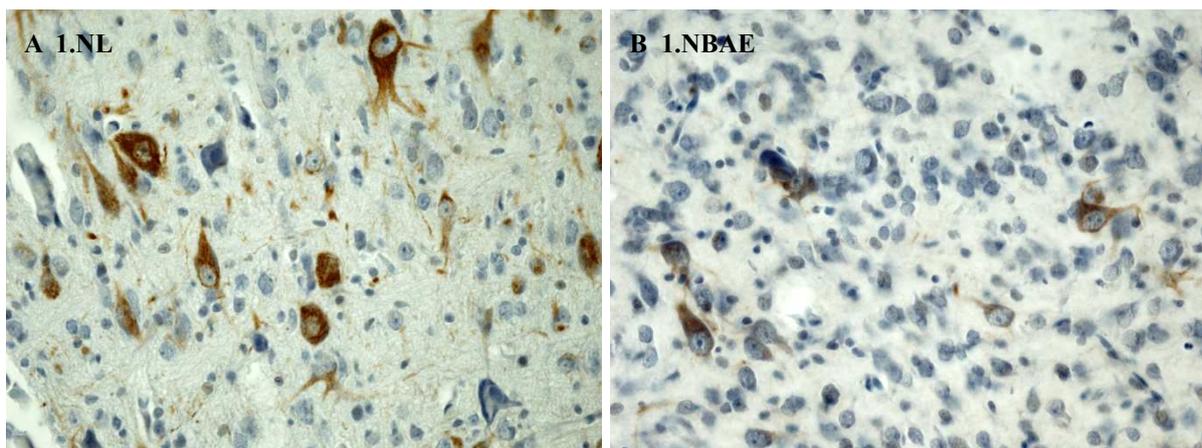
##### Erste Lebenswoche

NpNF sind im Alter von einer Woche bei den meisten Neuronen relativ schwach dargestellt. In dem sich noch entwickelnden Kleinhirn sieht man bei der nicht infizierten Ratte eine positive Färbung bei den Purkinje- und Körnerzellen. Bei beiden Zellarten sind Reaktionen im Zytoplasma lokalisiert. Dendriten oder Axone sind nicht identifizierbar. Bei den infizierten Ratten ist bei manchen Purkinje-Zellen auch der Zellkern positiv gefärbt.

Im Hippocampus sind vereinzelt Pyramidenzellen im Stratum pyramidale schwach positiv gefärbt, dabei sind zwischen nicht infizierten und infizierten Ratten in Intensität und Verteilungsmuster der Färbung keine Unterschiede festzustellen.

Einige Neuronen der Stammhirnganglien zeigen schon bei ganz jungen Ratten eine sehr intensive Reaktion. Bei den Neuronen nicht infizierter Tiere sind das Zytoplasma und die Zellfortsätze deutlich positiv, die Zellkerne negativ (*Abbildung 19 A*). Bei infizierten Tieren ist die Reaktion innerhalb des Zytoplasmas weniger kräftig, und es färben sich insgesamt weniger Zellen an. Zellfortsätze sind im Ansatz in der Nähe des Perikaryons zu erkennen, ihr Verlauf lässt sich allerdings nicht verfolgen (*Abbildung 19 B*).

Abbildung 19: npNF, Vergrößerung ca. x 125



A: eine Woche altes Kontrolltier: intensive Färbung von Perikaryon und Zellfortsätzen der Stammhirnganglien

B: eine Woche altes NBAE-Tier: Färbung des Perikaryons weniger intensiv, Zellfortsätze nur schwach angefärbt, weniger reaktive Zellen

### Sechste Lebenswoche

Ab einem Alter von sechs Wochen färben sich die npNF sehr deutlich an.

Im Hippocampus der nicht infizierten Ratte sind in der Pyramidenzellschicht bis auf einen kurzen Abschnitt im CA1-Bereich (*Abbildung 20 A, Blockpfeil*) nahezu alle Pyramidenzellen angefärbt. Der Gyrus dentatus befindet sich bei dieser Ratte außerhalb der dargestellten Schnittebene (*Abbildung 20 A*).

Bei dem NBAE-Tier sind kaum Zellen aus dem Stratum pyramidale angefärbt, im CA2-Bereich sieht man vereinzelt angefärbte Pyramidenzellen. Bei den kleinen punktförmigen dunklen Auftreibungen in der Pyramidenzellschicht, im Gyrus dentatus und im umliegenden Neuropil handelt es sich wahrscheinlich um geschwollene Axone (*Abbildung 20 B*).

Abbildung 20: npNF, Vergrößerung ca. x 40



A: sechs Wochen alte Kontrollratte: zahlreiche angefärbte Neurone im Hippocampus, im CA1-Bereich sind deutlich weniger Zellen angefärbt (*Blockpfeil*)

B: sechs Wochen altes NBAE-Tier: kaum positive Zellen im Stratum pyramidale, angefärbte Pyramidenzellen und geschwollene Axone im CA2-Bereich

In *Abbildung 21 A und B* ist die Pyramidenzellschicht des Hippocampus in einer stärkeren Vergrößerung dargestellt. Bei dem nicht infizierten Tier ist zu sehen, dass sich die npNF im Zytoplasma der Zelle befinden. Im nach außen an das Stratum pyramidale angrenzenden Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare ist ein feines Netzwerk von Neurofilamenten zu erkennen. Die Zellkerne sind nicht angefärbt (*Abbildung 21 A*).

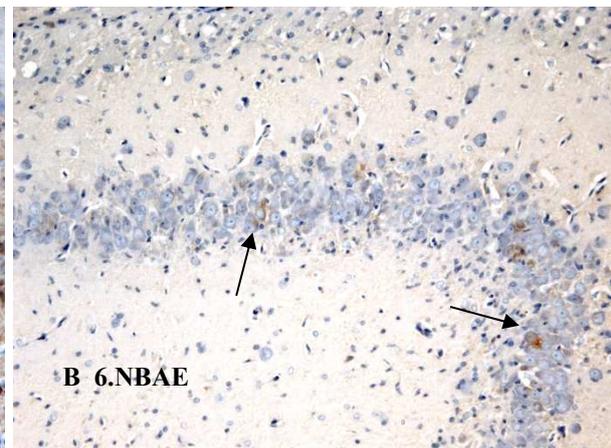
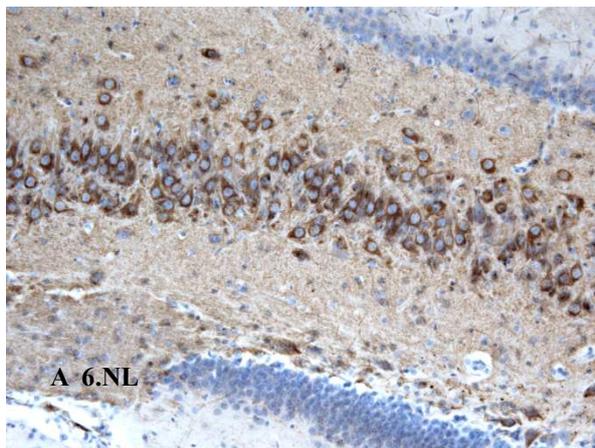
Bei der infizierten Ratte findet man nur vereinzelt reaktive Zellen im CA2-Bereich. Auch bei diesen Zellen ist die – im Vergleich zum nicht infizierten Tier – viel schwächere Färbung der

## Ergebnisse

Neurofilamente im Zytoplasma lokalisiert (*Abbildung 21 B, Pfeile*). Im Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare sind keine Neurofilamentfärbungen zu finden (*Abbildung 21 B*).

Abbildung 21: npNF, Vergrößerung NL ca. x 75

Vergrößerung NBAE ca. x 100



A: sechs Wochen alte Kontrollratte: npNF in den Fortsätzen der Neurone des Hippocampus

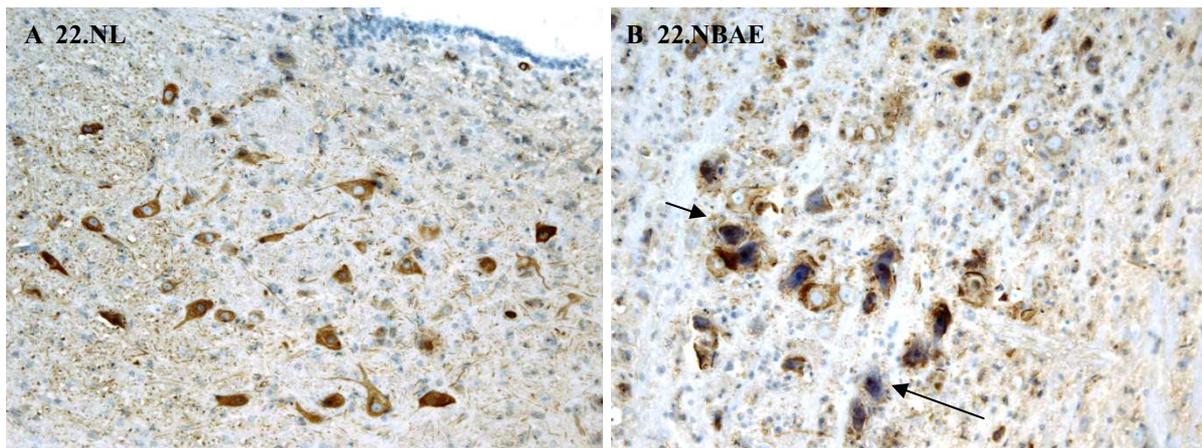
B: sechs Wochen alte NBAE-Ratte: vereinzelt exprimierte npNF im Hippocampus

## 22. Lebenswoche

Im Alter von 22 Wochen (*Abbildung 22 A und B*) hat sich die Reaktivität der Neuronen der Stammhirnganglien bei dem NBAE-Tier deutlich verstärkt (vergleiche *Abbildung 19 B*). Die npNF zeigen hier eine eigentümlich körnige, „kondensierte“ Struktur. Bei einigen Zellen färbt sich sowohl das Zytoplasma als auch der Zellkern an (*Abbildung 22 B, kurzer Pfeil*). Eine klare Abgrenzung zwischen Bestandteilen des umliegenden Neuropils und Perikaryons ist bei manchen Zellen nicht möglich (*Abbildung 22 B, langer Pfeil*). Der Verlauf der Zellfortsätze im Neuropil ist im Gegensatz zum nicht infizierten Tier nicht zu erkennen und stellt sich nur noch schwach und diskontinuierlich dar.

Bei dem nicht infizierten Tier sieht man eine gleichmäßige Anfärbung von Neuronen und eine deutliche Zeichnung von Zellfortsätzen (*Abbildung 22 A*).

Abbildung 22: npNF, Vergrößerung x 100



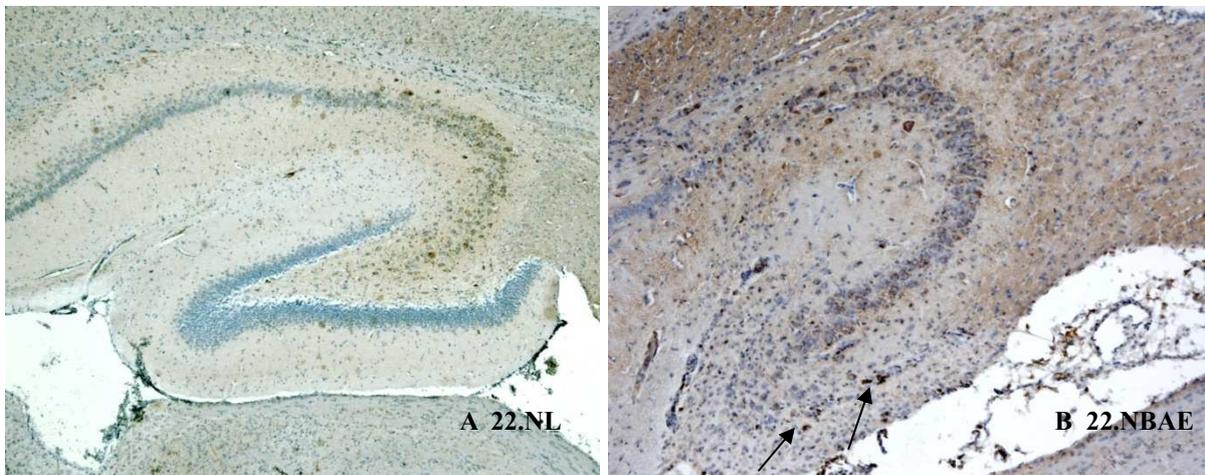
A: 22 Wochen alte Kontrollratte: Perikaryon und Zellfortsätze der Neuronen intensiv angefärbt, klare Abgrenzung der Neurone vom umliegenden Neuropil

B: 22 Wochen alte Kontrollratte: Zellkern und Zytoplasma angefärbt, Zellfortsätze diskontinuierlich, eindeutige Abgrenzung der Neurone vom Neuropil nicht möglich

## Ergebnisse

Bei der 22 Wochen alten nicht infizierten Ratte ist die Hippocampusformation in einer anderen Ebene angeschnitten (*Abbildung 23 A und B*). Hier sieht man, dass auch die Zellen des CA2- und CA3-Bereichs des Hippocampus eine positive Neurofilament-Färbung aufweisen. Lediglich die Zellen des Gyrus dentatus sind hier frei von Anfärbungen. Bei dem infizierten Tier sind – verglichen mit *Abbildung 21 B* – im Alter von 22 Wochen nun deutlich mehr Zellen des CA2- und CA3-Bereichs im Hippocampus angefärbt. Insgesamt sind es jedoch weniger Zellen als bei dem nicht infizierten Kontrolltier. Vereinzelt findet man hier auch Anfärbungen im Gyrus dentatus (*Abbildung 23 B, Pfeile*).

Abbildung 23: npNF, Vergrößerung ca. x 40



A: 22 Wochen alte Kontrollratte: npNF-positiv gefärbte Zellen im Hippocampus

B: 22 Wochen alte Kontrollratte: npNF-positiv gefärbte Zellen in Hippocampus und Gyrus dentatus

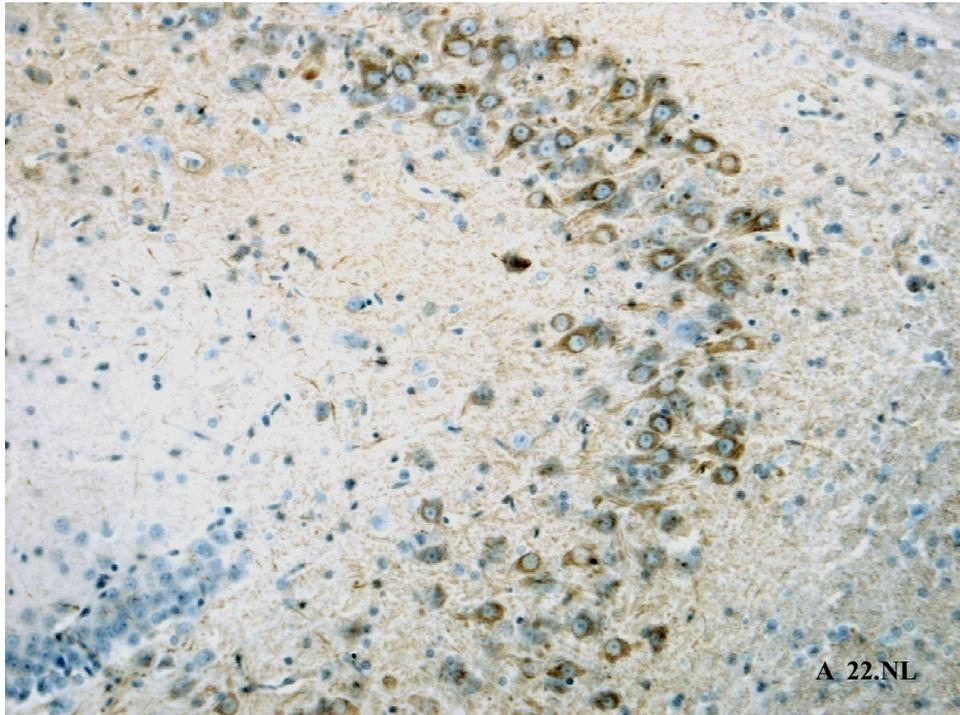
## Ergebnisse

Die folgende 125-fache Vergrößerung zeigt jeweils einen Ausschnitt des Hippocampus im Bereich CA2 zum Übergang CA3 (*Abbildung 24 A und B*). Auch hier werden die npNF sowohl beim nicht infizierten als auch beim infizierten Tier im Zytoplasma der Nervenzelle exprimiert. Beim infizierten Gehirn fällt im Vergleich zum nicht infizierten die unregelmäßige Anfärbung auf. Während die Zellen im CA2-Bereich des Hippocampus fast alle von Neurofilamenten umgeben sind, gibt es eine deutliche Abnahme von Neurofilamenten am Übergang zum CA3-Bereich (*Abbildung 24 B, Blockpfeil*).

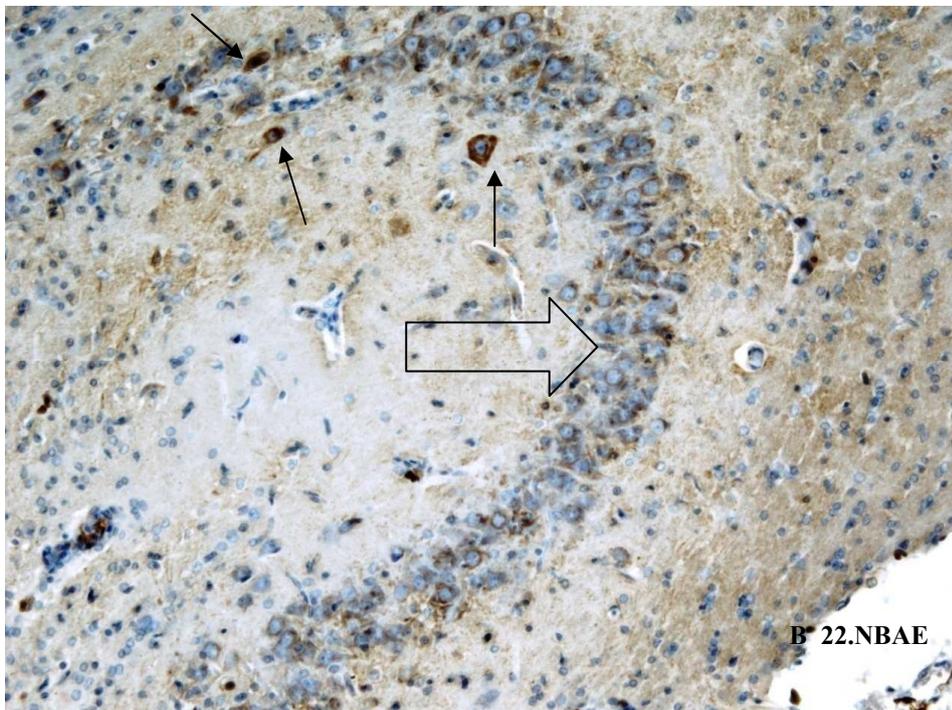
Im Vergleich zum nicht infizierten Tier sieht man, dass beim infizierten Tier die Neurofilamente im Zytoplasma deutlich schwächer angefärbt sind. Ähnlich wie bei den pNF bilden sich auch hier körnige Kondensationen der Filamente, die sich bei den npNF im Zytoplasma der Zelle befinden (*Abbildung 24 B, Pfeile*). Die Nervenzellfortsätze sind beim infizierten Tier im Gegensatz zum nicht infizierten nicht zu erkennen.

## Ergebnisse

Abbildung 24: npNF, Vergrößerung x 125



A: 22 Wochen alte Kontrollratte: npNF in fast allen Neuronen des Hippocampus, Zellforsätze sind deutlich zu erkennen

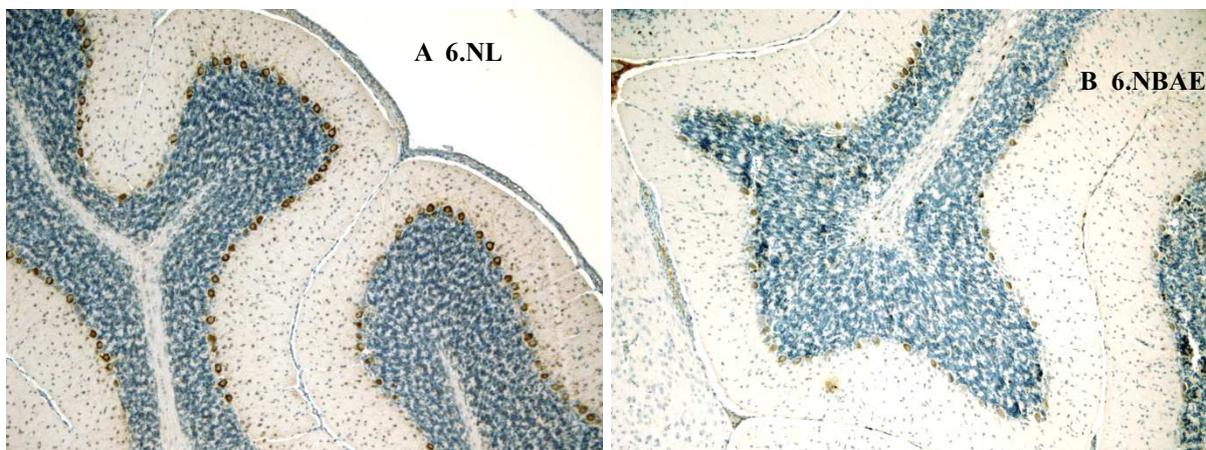


B: 22 Wochen altes NBAE-Tier: körnige Kondensation der npNF im Zytoplasma der Neuronen (*Pfeile*), Abnahme der npNF am Übergang des CA2-Bereichs des Hippocampus (*Blockpfeil*)

Veränderungen der npNF-Expression an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns

Im Alter von sechs Wochen sieht man bereits bei schwacher Vergrößerung, wie sich bei nicht infizierten Tieren die Purkinje-Zellen in der Ganglienzellschicht in regelmäßigen Abständen aneinanderreihen und die Neurofilamente im Zytoplasma dieser Zellen exprimiert werden (*Abbildung 25 A*). Bei der infizierten Ratte ist die Purkinje-Zelldichte im Alter von sechs Wochen deutlich vermindert. Die Neurofilamente werden unregelmäßig in Zellen des Stratum gangliosum und Stratum granulosum exprimiert (*Abbildung 25 B*).

Abbildung 25: npNF, Vergrößerung x 60



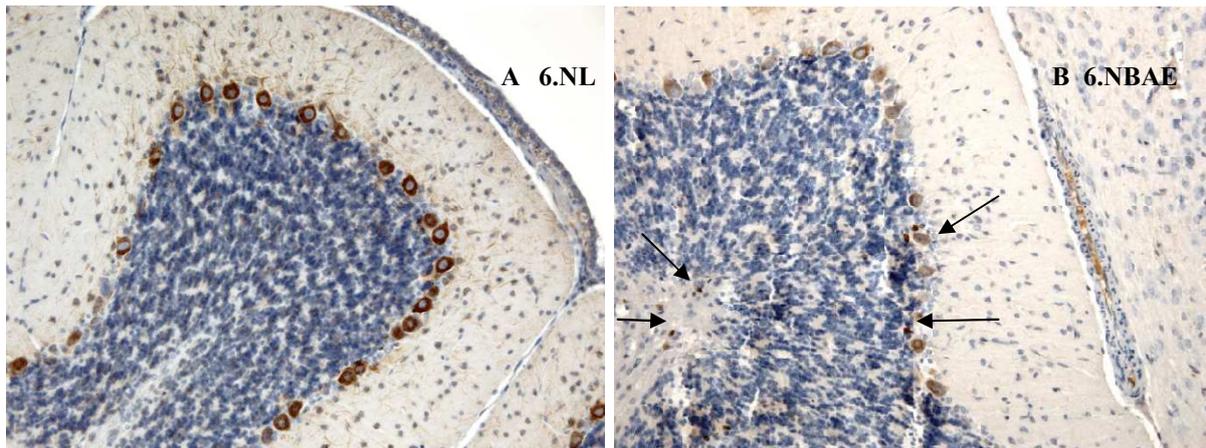
A: sechs Wochen altes Kontrolltier: unveränderte PZ-Dichte, npNF werden im Zytoplasma der PZ exprimiert

B: sechs Wochen altes NBAE-Tier: verminderte PZ-Dichte, unregelmäßige positive npNF-Färbung im Stratum gangliosum und Stratum granulosum

## Ergebnisse

Bei stärkerer Vergrößerung lassen sich die nur schwach reaktiven Purkinje-Zellen des NBAE-Tieres besser erkennen. Auffällig sind punktuelle Anfärbungen in der Ganglienzellschicht und im Kleinhirnmak (*Abbildung 26 B, Pfeile*), die schwer zuzuordnen sind. Möglicherweise handelt es sich um veränderte Purkinje-Zell-Dendriten.

Abbildung 26: npNF, Vergrößerung ca. x 100



A: sechs Wochen altes Kontrolltier: unveränderte PZ-Dichte, npNF werden im Zytoplasma der PZ exprimiert

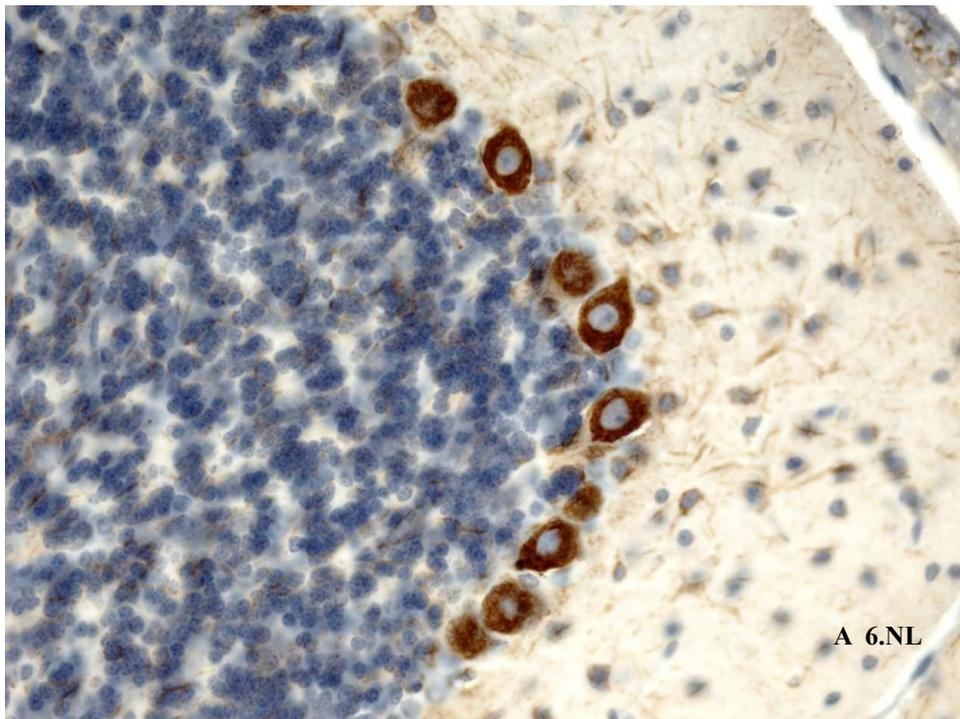
B: sechs Wochen alte NBAE-Ratte: das Zytoplasma der PZ zeigt eine schwache npNF-Färbung, punktuelle Anfärbungen in der Ganglienzellschicht und im Kleinhirnmak

## Ergebnisse

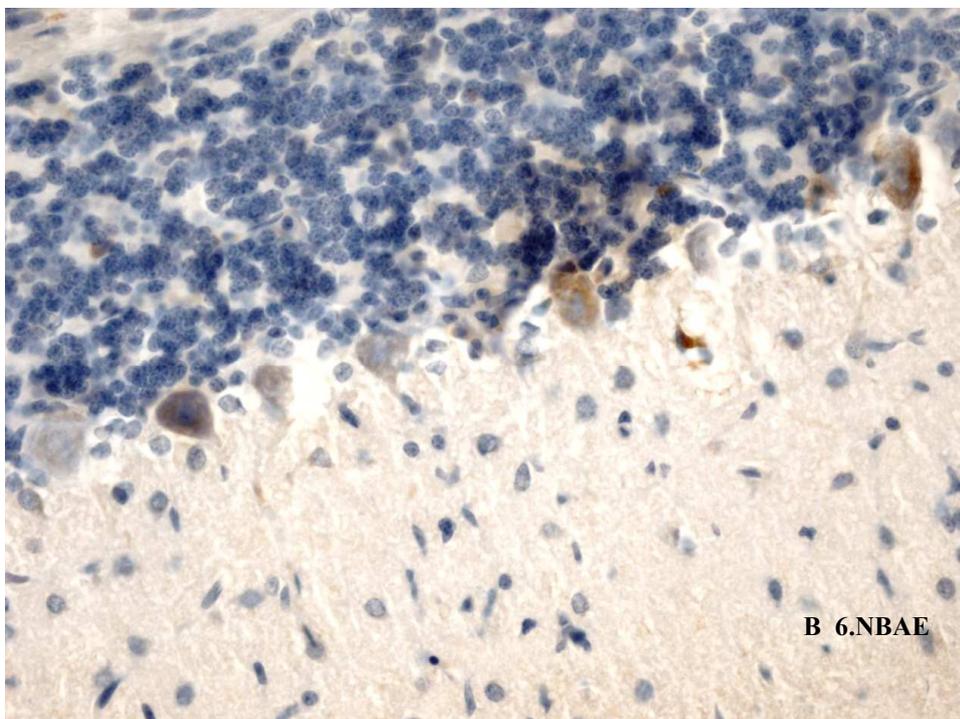
Bei stärkerer Vergrößerung (x 160) sieht man beim nicht infizierten Tier eine kräftige und gleichmäßige Anfärbung der npNF im Zytoplasma der Purkinje-Zellen. Ihre Ausläufer sind deutlich bis weit in die Molekularschicht zu verfolgen. Schemenhaft kann man auch Zellausläufer in der Körnerzellschicht erkennen (*Abbildung 27 A*). Der Zellkern ist frei von Reaktionsprodukten. Bei der infizierten Ratte sieht man bei den verbliebenen Purkinje-Zellen eine sehr viel schwächere Anfärbung der Neurofilamente im Zytoplasma. Der Kern der Purkinje-Zelle ist teilweise nicht deutlich vom Zytoplasma abgrenzbar. Zellfortsätze sind weder in der Molekularschicht noch in der Körnerschicht angefärbt (*Abbildung 27 B*).

## Ergebnisse

Abbildung 27: npNF, Vergrößerung ca. x 160



A: sechs Wochen altes Kontrolltier: npNF im Zytoplasma der PZ exprimiert, Kern ist nicht angefärbt, Zellfortsätze in der Molekularschicht und Körnerzellschicht sind zu erkennen



B: sechs Wochen altes NBAE-Tier: Perikaryon der PZ ist schwach braun gefärbt, Zellkern ist nicht klar vom Zytoplasma abgrenzbar, Zellfortsätze sind nicht angefärbt

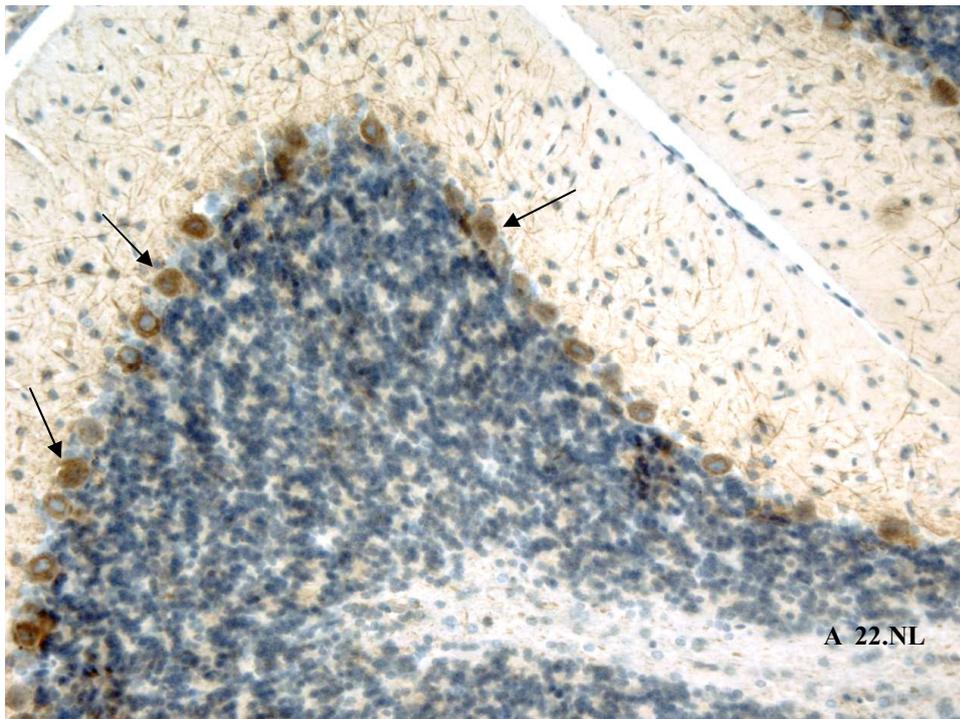
## Ergebnisse

Bei der 22 Wochen alten nicht infizierten Ratte sieht man ein ausgeprägtes Netzwerk an npNF in den Dendriten, die sich weit in die Molekularschicht hinein verzweigen. Die Anfärbung des Zytoplasmas erscheint weniger kräftig als bei der sechs Wochen alten Ratte (vergleiche *Abbildung 26 A* und *27 A*) und bei drei Zellen ist der Zellkern mit angefärbt (*Abbildung 28 A, Pfeile*).

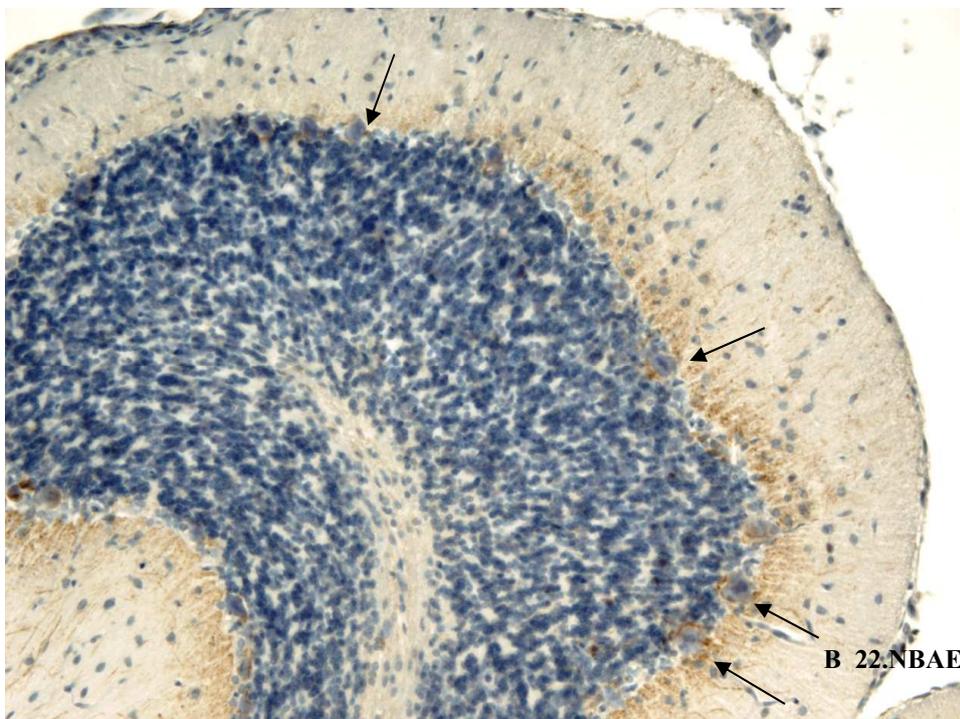
Bei der 22 Wochen alten infizierten Ratte sind nur noch wenige Purkinje-Zellen erhalten (*Abbildung 28 B, Pfeile*), das Zytoplasma dieser Zellen ist nur geringgradig angefärbt. Zwischen den Purkinje-Zellen zeigen sich in der Molekularschicht Neurofilament positive Strukturen, die den Dendriten zuzuordnen sind. Am dichtesten ist die Anfärbung im inneren Drittel, zur Peripherie hin nehmen die Strukturen deutlich ab und es bleiben nur noch einzelne Fasern übrig (*Abbildung 28 B*).

## Ergebnisse

Abbildung 28: npNF, Vergrößerung ca. x 125



A: 22 Wochen alte Kontrollratte: Intensität der Färbung der npNF im Perykarion der PZ nimmt ab, Zellkerne sind teilweise positiv gefärbt (*Pfeile*), deutliche Darstellung der Dendriten bis weit in die Molekularschicht



B: 22 Wochen altes NBAE-Tier: deutliche Reduktion der PZ, deren Zytoplasma sehr schwach angefärbt ist (*Pfeile*), Dendriten nur im inneren Drittel der Molekularschicht deutlich dargestellt

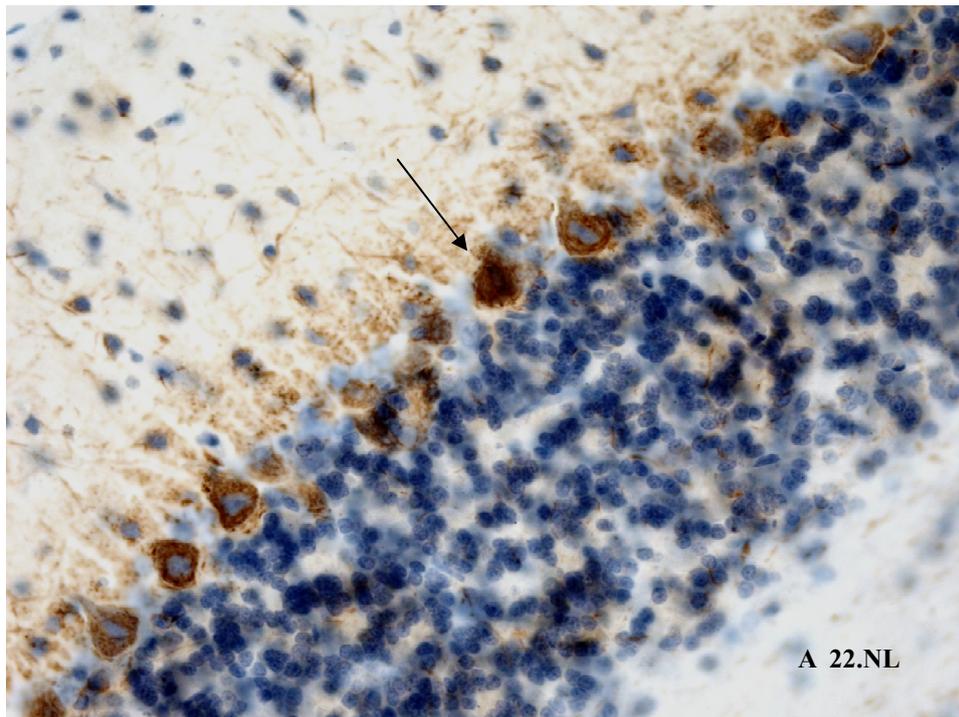
## Ergebnisse

In der in *Abbildung 29 A* und *B* dargestellten 160-fachen Vergrößerung erkennt man noch besser, wie sich die kräftige Färbung im Zytoplasma der Purkinje-Zellen des nicht infizierten Tieres gegenüber dem sechs Wochen alten Tier (vergleiche *Abbildung 27 A*) vermindert hat, sie erscheint insgesamt etwas aufgelockert. Bei einer der Zellen ist der Zellkern mit angefärbt (*Abbildung 29 A, Pfeil*). Deutlich kann man hier das feine Dendritennetzwerk verfolgen. Auch in der Körnerzellschicht sieht man angefärbte feine Strukturen der Zellfortsätze (*Abbildung 29 A*).

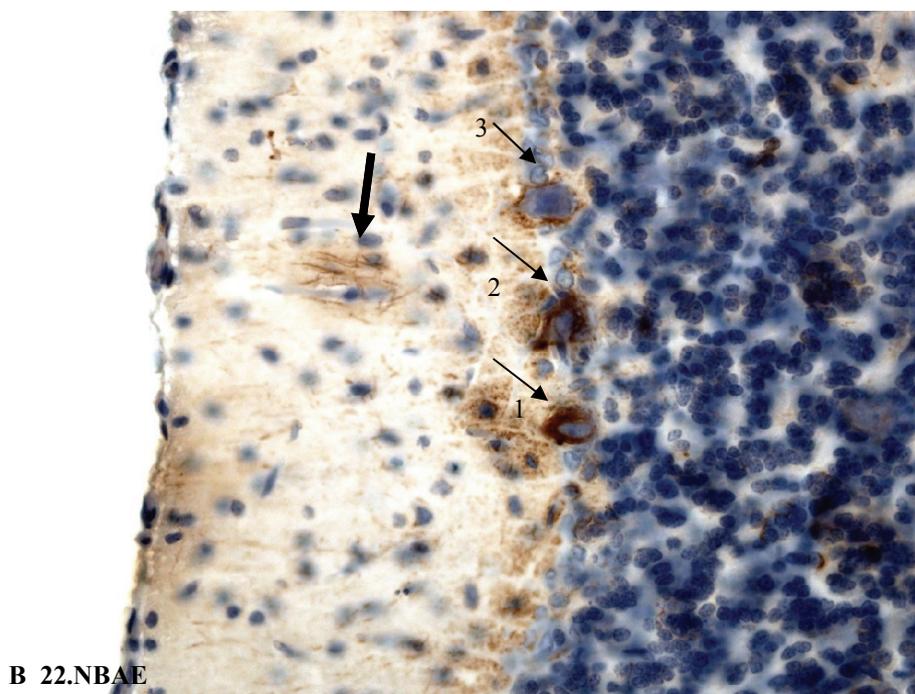
Bei den drei dargestellten Purkinje-Zellen des NBAE-Tieres ist nur bei einer das Zytoplasma angefärbt (*Abbildung 29 B, Pfeil Nr. 1.*), bei der zweiten kann man keine klaren Grenzen zwischen Zytoplasma, Kern und Zellwand ziehen (*Abbildung 29 B, Pfeil Nr. 2.*). Bei der dritten sind Zytoplasma und Kern nicht angefärbt, sondern die Zelle ist von einem feinen Neurofilamentsaum umgeben (*Abbildung 29 B, Pfeil Nr. 3.*), ähnlich dem Bild der pNF (siehe *Abbildung 18 B, Pfeil Nr. 3.*). Im ersten Drittel der Molekularschicht erkennt man eine sehr feine Anfärbung der Dendriten, die zur Peripherie hin schwächer wird und diskontinuierlich erscheint. An einer Stelle sieht man noch ein angeschnittenes Faserbündel (*Abbildung 29 B, dicker Pfeil*).

## Ergebnisse

Abbildung 29: npNF, Vergrößerung x 160



A: 22 Wochen alte Kontrollratte: aufgelockerte Darstellung der npNF im Perikaryon der PZ, bei einer Zelle ist der Zellkern angefärbt (*Pfeil*), Zellfortsätze sind in Molekularschicht und in Körnerzellschicht zu erkennen



B: 22 Wochen altes NBAE-Tier: PZ: positiv gefärbtes Zytoplasma (*Pfeil Nr. 1*), unklare Grenze zwischen Zytoplasma, Kern und Zellwand (*Pfeil Nr. 2*), npNF-Saum (*Pfeil Nr. 3*), angeschnittenes Faserbündel (*dicker Pfeil*)

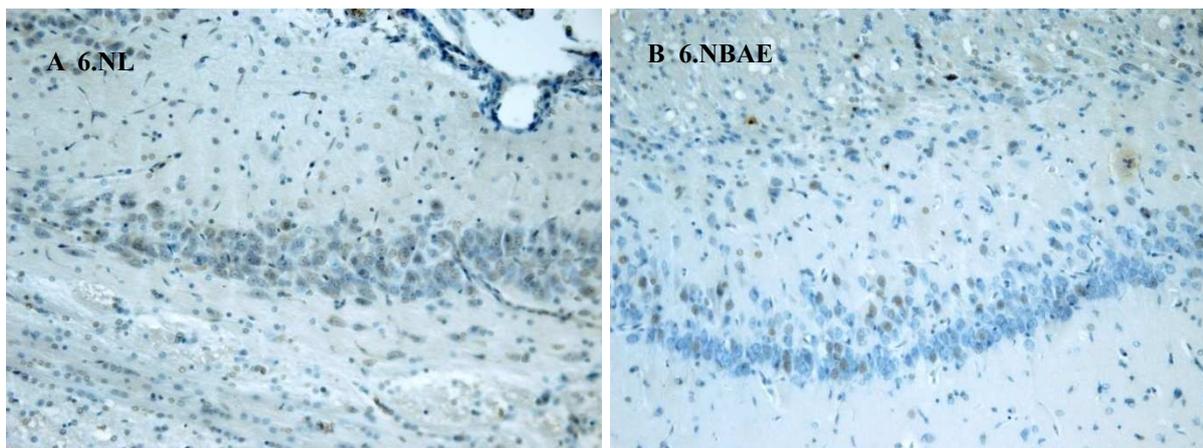
## 4.5 DISC1

Der Antikörper (AK) wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Korth, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, produziert und zur Verfügung gestellt. Der AK erkennt rekombinantes DISC1-Protein (Isoformen full-length-rDISC1, DISC1 C-terminal, DISC1 589-C-terminal). Dabei muss die Bindungsstelle des AKs N-terminal von AS 589 liegen. Ausgewertet wurden sechs bzw. 22 Wochen alte Tiere. Ab einem Alter von sechs Wochen sind die Färbung und die Veränderungen gut darstellbar. Beurteilt wurden Nervenzellen aus der Hippocampusformation.

### Sechste Lebenswoche

Bei den nicht infizierten Kontrolltieren erkennt man bei ca. 100-facher Vergrößerung zahlreiche – allerdings schwach – positiv gefärbte Zellen in der Pyramidenzellschicht des Hippocampus (*Abbildung 30 A*). Bei der NBAE-Ratte sind insgesamt weniger Zellen angefärbt, jedoch erscheint die Färbung kräftiger als bei der nicht infizierten Ratte (*Abbildung 30 B*).

Abbildung 30: DISC1, Vergrößerung ca. x 100



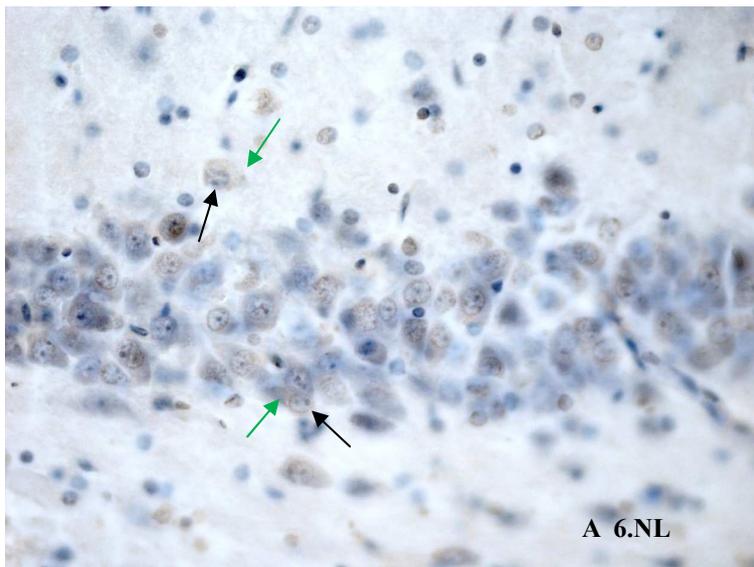
A: sechs Wochen alte Kontrollratte: zahlreiche positiv gefärbte Zellen im Hippocampus

B: sechs Wochen alte infizierte Ratte: einzelne positiv gefärbte Zellen im Hippocampus

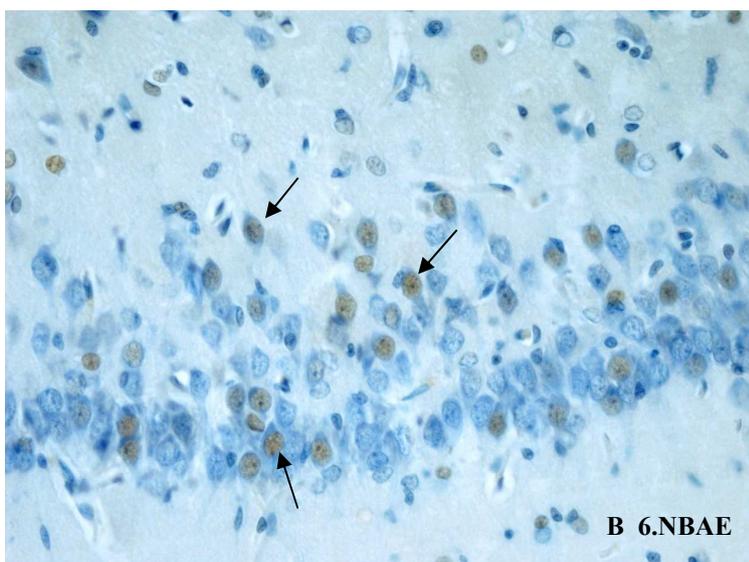
## Ergebnisse

Bei 160-facher Vergrößerung erkennt man, dass die quantitativ höhere, jedoch qualitativ schwächere Expression des DISC1 beim nicht infizierten Tier im Zytoplasma (*Abbildung 31 A, grüne Pfeile*) und im Zellkern (*Abbildung 31 A, schwarze Pfeile*) lokalisiert ist. Beim NBAE-Tier wird das Protein stärker und offenbar ausschließlich im Zellkern der Nervenzelle exprimiert (*Abbildung 31 B, Pfeile*).

Abbildung 31: DISC1, Vergrößerung x 160



A: sechs Wochen altes Kontrolltier: schwache DISC1-Färbung im Zytoplasma (*grüne Pfeile*) und im Zellkern (*schwarze Pfeile*) des Neurons

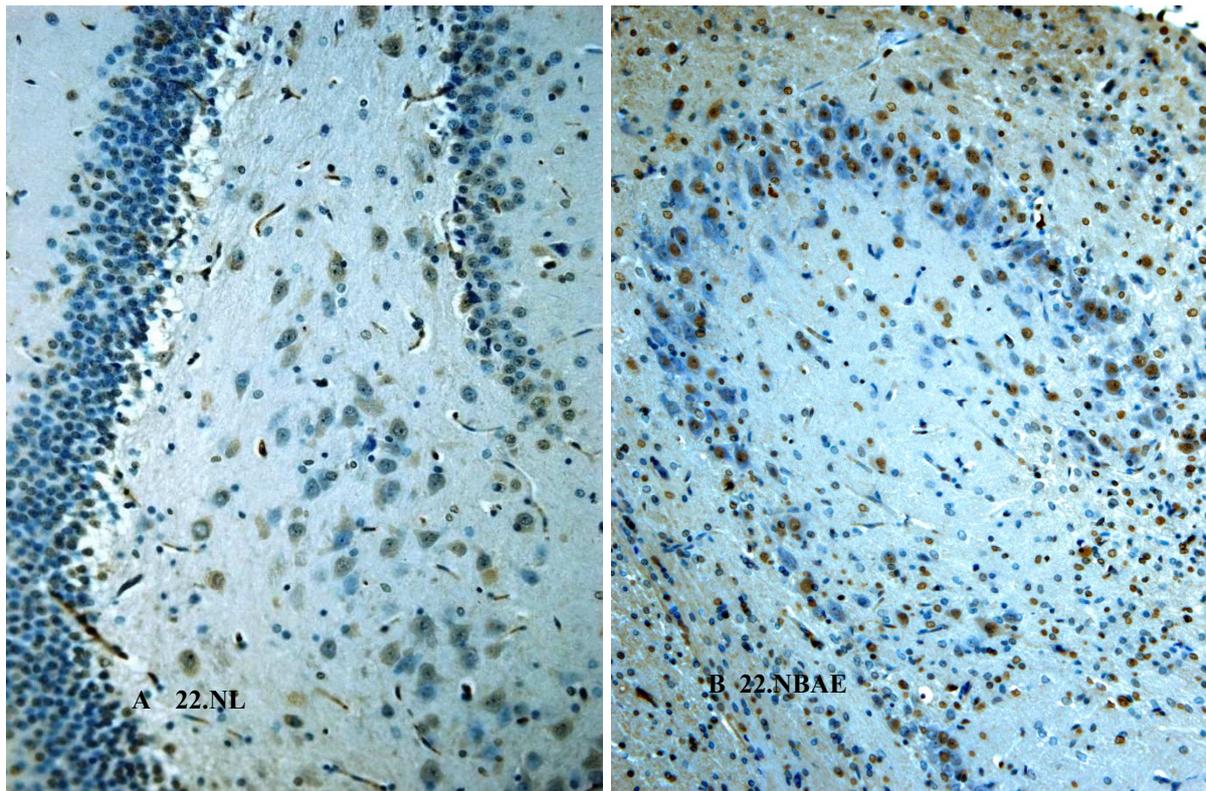


B: sechs Wochen alte NBAE-Ratte: deutliche Expression des DISC1 im Zellkern der Neuronen

22. Lebenswoche

Bei den 22 Wochen alten Ratten wird die unterschiedliche Expression des DISC1 schon in der 20-fachen Vergrößerung deutlich (*Abbildung 32 A und B*). Darüber hinaus hat die Anzahl an DISC1 exprimierenden Neuronen bei der infizierten Ratte deutlich zugenommen.

Abbildung 32: DISC1, Vergrößerung ca. x 60



A: 22 Wochen altes Kontrolltier: zahlreiche DISC1 positive Zellen

B: 22 Wochen altes NBAE-Tier: zahlreiche DISC1 positiv gefärbte Zellen

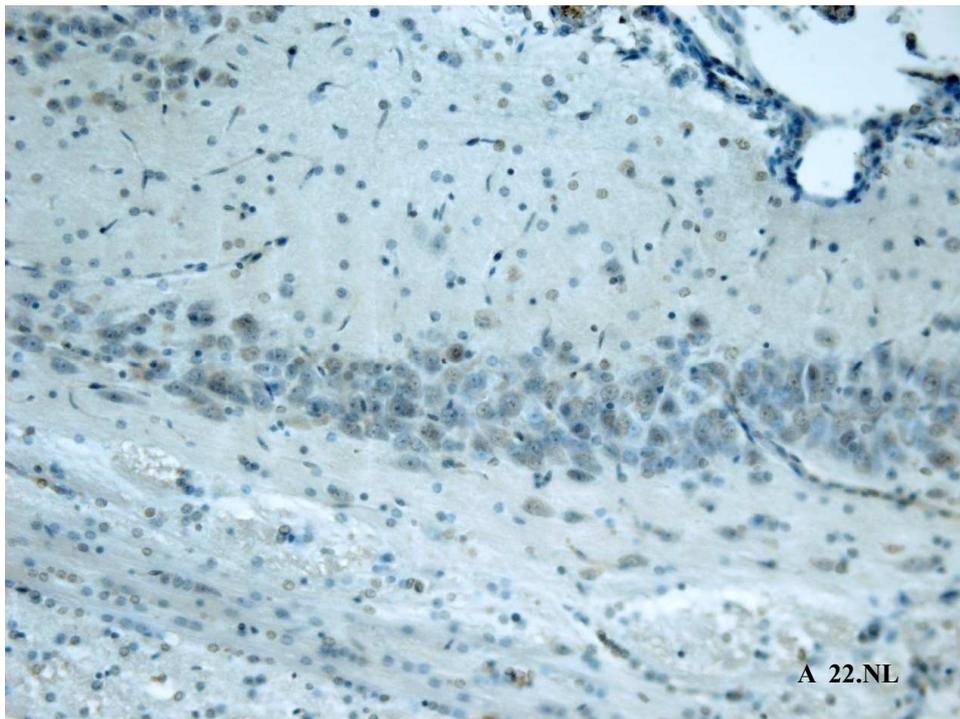
## Ergebnisse

Bei den 22 Wochen alten Tieren hat sich die Expression des DISC1-Proteins verstärkt. Nach wie vor ist bei dem gesunden Tier die Expression des DISC1 – verglichen mit dem NBAE-Tier – schwächer und sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (*Abbildung 33 A*). Bei der NBAE-Ratte sieht man eine deutlich stärkere Expression des DISC1 mit ausschließlicher Lokalisation im Zellkern der Neuronen (*Abbildung 33 B*).

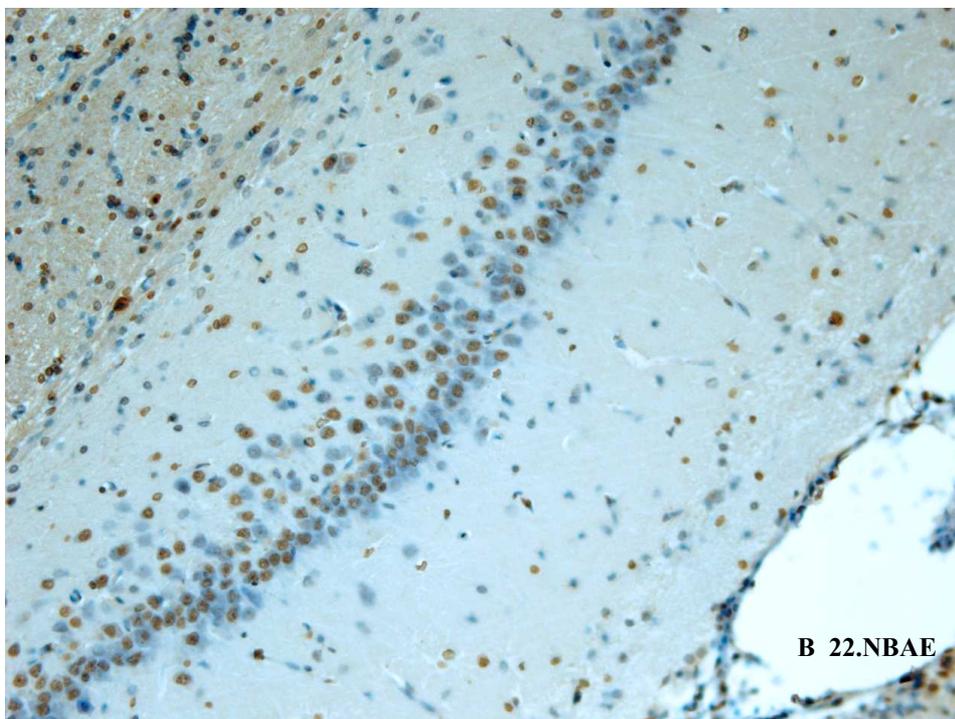
*Abbildung 34* zeigt Ausschnitte aus *Abbildung 33* bei stärkerer Vergrößerung (*Abbildung 34 A* ca. x 160, *Abbildung 34 B* ca. x 150), um die unterschiedliche Verteilung des DISC1-Proteins innerhalb der Zellkompartimente zwischen infizierter und nicht infizierter Ratte zu verdeutlichen.

Ergebnisse

Abbildung 33: DISC1, Vergrößerung x 125



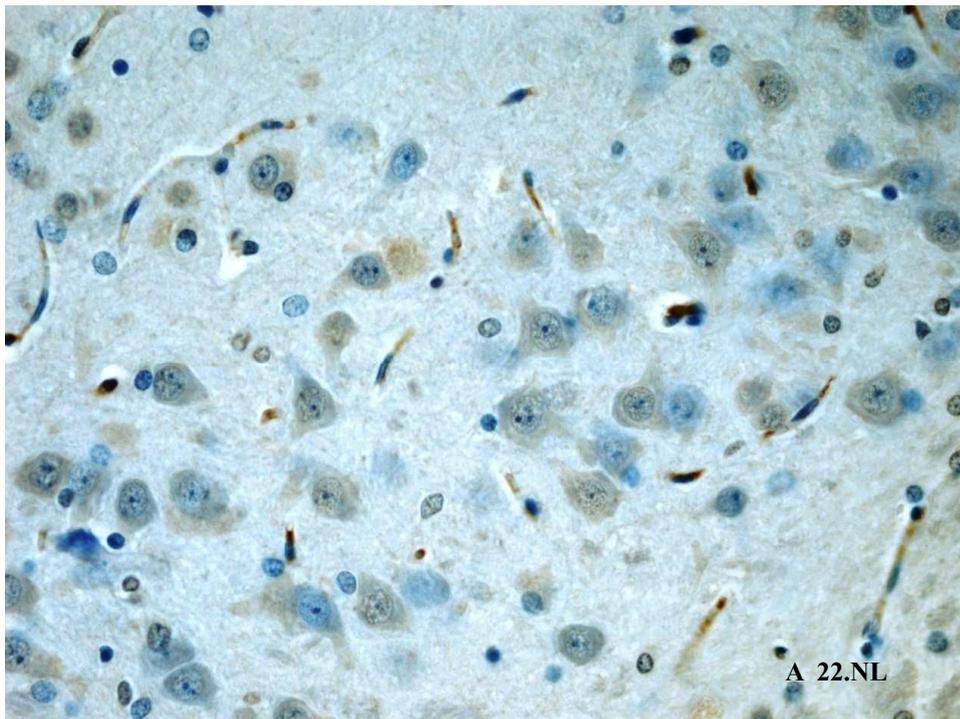
A: 22 Wochen alte Kontrollratte: Expression des DISC1 im Zytoplasma und Zellkern zahlreicher Neuronen des Hippocampus



B: 22 Wochen alte NBAE-Ratte: starke Expression des DISC1 ausschließlich im Zellkern der Neuronen des Hippocampus

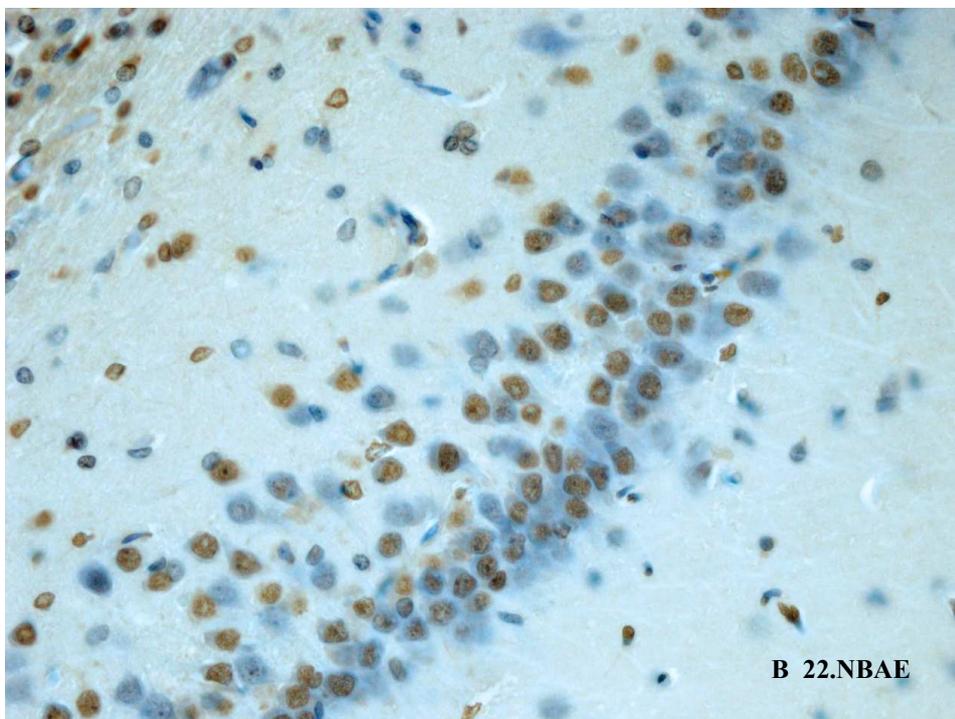
Ergebnisse

Abbildung 34: DISC1, Vergrößerung NL ca. x 160



A: 22 Wochen alte Kontrollratte: Expression des DISC1 im Zytoplasma und Zellkern zahlreicher Neuronen des Hippocampus

DISC1, Vergrößerung NBAE ca. x 150



B: 22 Wochen alte NBAE-Ratte: starke Expression des DISC1 ausschließlich im Zellkern der Neuronen des Hippocampus

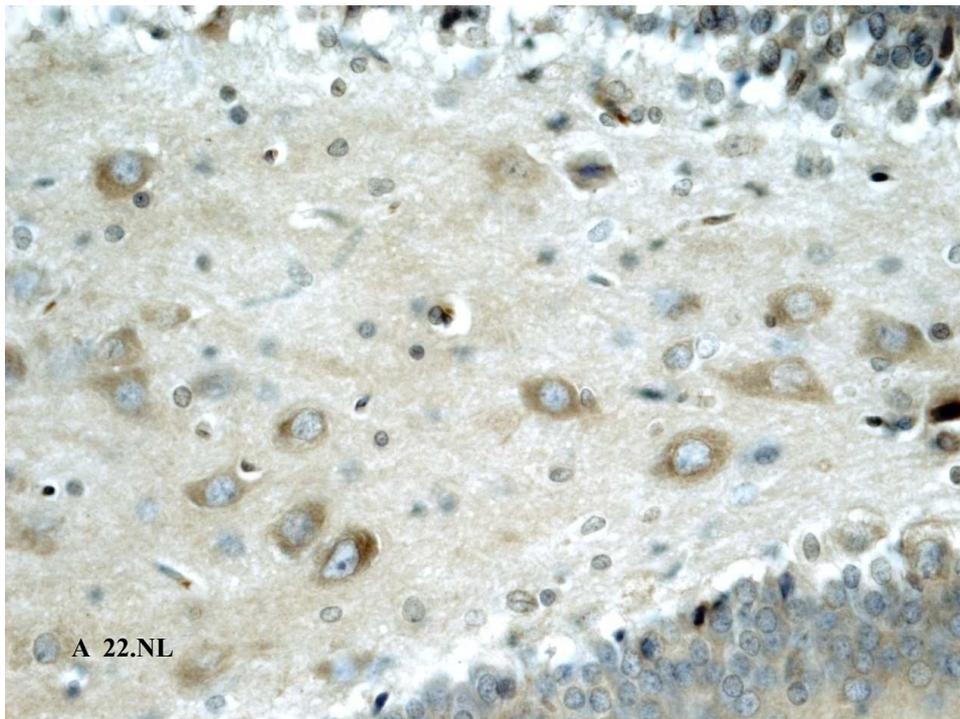
#### 4.6 NUDEL

Auch für die Darstellung von NUDEL wurde ein AK von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Korth, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, produziert und zur Verfügung gestellt. Auch hier wird die Reaktion innerhalb des Hippocampus gezeigt.

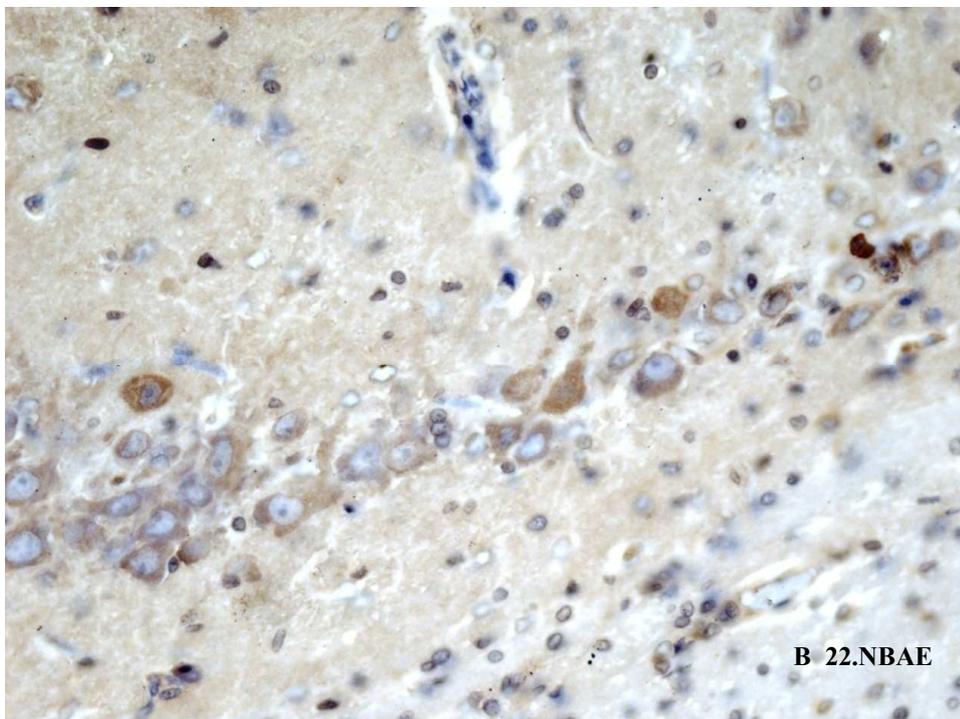
In der vorliegenden Untersuchung lässt sich das NUDEL-Protein nur bei den sechs und 22 Wochen alten Ratten erkennen. *Abbildung 35 A* und *35 B* zeigen unterschiedliche Areale aus dem Hippocampus, in denen sich die Expression des NUDEL-Proteins auf zellulärer Ebene sehr ähnelt. Sowohl bei nicht infizierten als auch bei infizierten Tieren kann das NUDEL-Protein ausschließlich im Zytoplasma von Nervenzellen des Hippocampus nachgewiesen werden. Der Zellkern zeigt keine Reaktionen (*Abbildung 35 A und B*).

Ergebnisse

Abbildung 35: NUDEL, Vergrößerung x 160



A: 22 Wochen altes Kontrolltier: Expression von NUDEL im Zytoplasma von Neuronen im Hippocampus



B: 22 Wochen altes NBAE-Tier: Expression von NUDEL im Zytoplasma von Neuronen im Hippocampus

#### 4.7 Übersicht der Expressionen von p38, pNF, npNF, DISC1 und NUDEL

NBAE-Ratte Wo p. i.	Morphologie	p38	pNF	npNF	DISC1	NUDEL
1	Neurogenese unvollständig	Vereinzelt positive Zellen	Zytoplasma sehr schwach gefärbt, Axone und Dendriten noch nicht zu erkennen; erste Aggregationen	Zytoplasma und Axonhügel angefärbt, Verlauf der Axone und Dendriten nicht erkennbar	n. d.	n. d.
2	Neurogenese unvollständig	Zahl der p38 positiven Zellen nimmt zu	unverändert	unverändert	n. d.	n. d.
4	Neurogenese unvollständig	„	Zytoplasma geringgradig angefärbt, Kern frei; feines Geflecht um Purkinje-Zelle; stellenweise starke Aggregation, Dendriten teilweise nicht so weit verästelt wie bei Kontrollratte	„	n. d.	n. d.
6	Beginnender Verlust der Purkinje-Zellen im Kleinhirn	„	Veränderungen werden deutlicher	Zytoplasma deutlich schwächer angefärbt als bei Kontrollratten	Hyperexpression im Zellkern erkennbar	In der Expression keine Unterschiede zwischen NBAE-Ratte und Kontrollratte

Ergebnisse

NBAE-Ratte Wo p.i.	Morphologie	p38	pNF	npNF	DISC1	NUDEL
9	Verlust der Purkinje-Zellen schreitet fort; bei manchen Tieren corticale Schrumpfung und erweiterte Ventrikel erkennbar	„	Veränderungen werden deutlicher	„	n.d.	n.d.
22	Deutlich reduzierte Purkinje-Zellzahl im Kleinhirn	Zahlreiche p38 positive Neuronen und Astrozyten in allen Schichten des Hippocampus und des Kleinhirns	Zytoplasma nicht mehr angefärbt; Purkinje-Zellen oft nicht vollständig von pNF umgeben, deutliche Aggregation, Dendriten perlschnurartig aufgetrieben und Verlauf abgebrochen	Zytoplasma und teilweise Kern angefärbt, Zellfortsätze schwach angefärbt, Perikaryon schlecht von umliegendem Gewebe abzugrenzen	deutliche Hyperexpression im Zellkern	In der Expression keine Unterschiede zwischen BDV-infizierter Ratte und Kontrollratte

Abkürzungen: Wo p. i. = Woche post infectionem, n. d. = nicht durchgeführt

## 5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Auswirkungen des BDV auf Strukturveränderungen verschiedener Hirnareale und insbesondere die Zytoarchitektur von Neuronen und Gliazellen im Gehirn von Ratten nach neonataler Infektion über ein Aerosol (NBAE-Ratten) untersucht. Die Tiere erwiesen sich bei virologischen und immunologischen Tests (Untersuchungen durchgeführt von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. L. Stitz, Institut für Immunologie, Friedrich-Loeffler-Institut des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit, Tübingen) als persistent BDV-infiziert und immuntolerant. Im Mittelpunkt der neuropathologischen Untersuchungen standen Kleinhirn und Hippocampus, also Strukturen, die einerseits bevorzugte Infektionsgebiete des BDV darstellen, andererseits zu den bei Schizophrenie hauptsächlich mit betroffenen Hirnanteilen gerechnet werden. Dieser experimentelle Ansatz der nicht invasiven Aerosol-Infektion neugeborener Ratten wurde gewählt, um 1. den Einfluss von Entzündungsreaktionen auf Wechselwirkungen zwischen Wirt und Virus möglichst klein zu halten und um der Frage nachzugehen, ob 2. die persistierende Infektion mit dem nicht zytopathogenen BDV Gehirnzellen derart verändert, dass sich dies morphologisch nachweisen lässt und 3. daraus strukturelle Hirnveränderungen entstehen, deren Qualität und Verteilungsmuster einen Zusammenhang/eine Parallelität mit der Entstehung von Schizophrenie denkbar erscheinen lassen.

In vorangegangenen Arbeiten wurde untersucht, ob und welche Art von Entzündungsreaktionen bei der BDV-Aerosol-Infektion von neugeborenen Ratten entstehen können, ob sich morphologische Veränderungen am Zytoskelett von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten sowie an Myelinscheiden nachweisen lassen und ob, bzw. inwieweit, sich dabei Wechselwirkungen mit Immunreaktionen erkennen lassen (Sollmann, 2007; Schepers, 2009). Dabei hatte sich herausgestellt, dass zunächst eine transiente Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen (Mikrogliose) aufgetreten war, mit der Folge einer späteren astrozytären Gliose in den betroffenen Arealen. Außerdem war eine weitgehende Reduktion von Nervenzellen, darunter auch den Purkinje-Zellen im Kleinhirn, aufgefallen. Überraschenderweise waren bei den NBAE-Tieren auch viele Oligodendrozyten infiziert, die an sich nicht zu den Hauptzielzellen des BDV gehören und deren Anzahl drastisch vermindert wurde. Morphologisch hatten sich bei den Purkinje-Zellen Apoptose, bei den Oligodendrozyten Desorganisation der Zellkerne,

fokale Vakuolisierungen und Störungen der Myelinstruktur nachweisen lassen (Sollmann, 2007; Schepers, 2009). In diesen Arbeiten konnte ein sowohl von der typischen Hauptform der BD (a) beim natürlichen Wirt Pferd und (b) nach experimenteller Infektion der immun-kompetenten Ratte, die beide als lymphozytäre Meningo-Polioencephalomyelitis verlaufen, abweichendes Krankheitsbild und pathologisches Bild beschrieben werden. Die Veränderungen bei den NBAE-Ratten unterscheiden sich auch deutlich von anderen bisher beschriebenen BDV-induzierten nicht-entzündlichen Enzephalopathien in neugeborenen intracerebral infizierten (NB) oder aber immunkompromittierten Ratten. Vorherrschend sind bei NBAE-Ratten nicht-entzündliche degenerative Hirnveränderungen, die neben Neuronen und Astrozyten als klassische BDV-Zielzellen auch die Oligodendroglia, und damit die gesamte weiße Substanz einbeziehen, und damit eine für die BD bisher völlig untypische Leukoenzephalopathie verursachen. Darüber hinaus erwiesen sich die Veränderungen des Zytoskeletts von Neuronen und Astrozyten als so schwerwiegend, dass sie in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurden.

Um die Bedeutung dieser Beobachtungen richtig einschätzen zu können, muss man sich vergegenwärtigen, dass auch bei der Vielzahl der natürlichen Wirte des BDV nicht nur die typische Encephalitis vorkommt, sondern auch subklinische teilweise nicht entzündliche Verläufe, die bisher nicht ausreichend erforscht sind. Der Wert der experimentell erzeugten NBAE-Encephalopathie der Ratte liegt darin, dass sie einen Zustand imitiert, wie er in der Natur mit Sicherheit häufig vorkommt: die unmittelbar postnatale Infektion der Nachkommenschaft über den natürlichen Hauptinfektionsweg, die zur Immuntoleranz und persistierenden Infektion führt. Deren strukturelle und funktionelle Folgen im Zentralnervensystem, die nach Beobachtungen von Verhaltensänderungen beim Wildtyp und den bisher erhobenen experimentellen Befunden nur durch hirnorganische neurodegenerative Veränderungen zu erklären sind, sind noch kaum erforscht. Einige strukturelle Veränderungen konnten in dieser Arbeit gezeigt und ihre Ursachen zumindest teilweise erklärt werden, wie z. B. bei den Neurofilamenten (siehe Seite 94 ff.).

Um der Frage nach BDV-assoziierten neurogenen Funktionsstörungen und insbesondere möglichen Bezügen zu Schizophrenien nachzugehen, wurde exemplarisch im Sinn eines „Read-out-Systems“ die Expression des DISC1-Proteins als Schlüsselprotein der „schizophrenieverdächtigen Gene“ (Bord *et al.*, 2006; Camargo *et al.*, 2007; Carter, 2006; Chubb *et al.*, 2008) untersucht. Außerdem spielt DISC1 eine wichtige Rolle innerhalb des

Dynein-Motor-Komplexes (siehe Seite 97), der im zentralen Nervensystem während der Neurogenese neuronale Migration sowie axonale Formation und Transport reguliert (Ahmad *et al.*, 1998; Ishizuka *et al.*, 2006; Kamiya *et al.*, 2005; Waterman-Storer *et al.*, 1997) und sich insofern als geeigneter Indikator für BDV-assoziierte Funktionsstörungen im Zentralnervensystem anbot, insbesondere hinsichtlich schizophrenieähnlicher Veränderungen. Die Frage nach möglichen Zusammenhängen zwischen viralen Infektionen und psychiatrischen Krankheiten wie der Schizophrenie wird seit dem frühen 20. Jahrhundert diskutiert, als der Verdacht aufkam, dass die Influenza-Infektion der schwangeren Frau das Risiko für das Kind, später an Schizophrenie zu erkranken, um ein Vielfaches erhöht. Grund dieser Annahme war die Parallelität zwischen der großen Influenza-Epidemie von 1918 bis 1919 und dem erheblichen Anstieg an Schizophrenieerkrankungen wenige Jahrzehnte später (Yudofsky, 2009). Außer Influenzaviren gerieten noch weitere virale Pathogene in Verdacht durch Läsionen in frühen Phasen der Gehirnentwicklung zur Entstehung psychiatrischer Krankheiten beizutragen (Carter, 2008; Fruntes & Limosin, 2008).

In diesem Zusammenhang ergibt sich die Frage, inwieweit Erreger direkt oder indirekt an der Pathogenese hirnorganischer Krankheiten beteiligt sein können und ob sie z. B. ähnliche intrazelluläre Signalnetzwerke „nutzen“ wie Gene und/oder Proteine, die in Verdacht stehen, bei der Pathogenese neuropsychiatrischer Krankheiten beteiligt zu sein. Es spricht viel dafür, dass solche Gene auch in die Lebenszyklen von Erregern involviert sind (Carter, 2008), so dass dem Aufschluss über Ursachen und Wirkungen innerhalb dieser Netzwerke große Bedeutung zukommt.

Um die Auswirkungen des BDV auf die Zytoarchitektur von Neuronen und Gliazellen näher zu charakterisieren, wurden an Stufenschnitten von Gehirnen NBAE-infizierter Ratten und gesunder Kontrollratten gleichen Alters neben klassischen neuropathologischen Färbungen – wie der Kresylviolett-Reaktion nach NISSL – auch immunhistochemische Färbungen mit verschiedenen Markern durchgeführt.

#### **Gewebsreaktionen:**

Bei den NBAE-Ratten fielen – altersabhängig – bereits makroskopisch neokortikale Atrophien, Kleinhirnatrophien und begleitende Hydrocephali interni und externi auf. Ein solches Bild ähnelt den in der Literatur beschriebenen kortikalen Atrophien und Kleinhirnhypoplasien bei neonatal intracerebral BDV-infizierten Ratten (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Rubin *et al.*, 1999; Waltrip *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang wurde auch die

Degeneration des Gyrus dentatus des Hippocampus beschrieben, die durch den Verlust von Neuronen zustande kommt (Bautista *et al.*, 1995; Gonzalez-Dunia *et al.*, 2000; Hornig *et al.*, 1999; Lipkin *et al.*, 2001). Diese morphologischen Auffälligkeiten weisen Parallelen zu Veränderungen auf, die an Gehirnen von Schizophrenie-Patienten auftreten können. Steen *et al.* (2006) beschrieben folgende durch Magnetresonanztomografie dokumentierte Veränderungen an Gehirnen von nicht therapierten Schizophrenie-Patienten: Erweiterung der Ventrikel, Reduktion des gesamten Hirnvolumens, Variabilitäten in den kortikalen Schichtendurchmessern, Veränderungen des Hippocampus, insbesondere des Gyrus dentatus, und zerebrale Asymmetrie.

### ***Entzündliche Veränderungen:***

In der vorliegenden Untersuchung zeigten die NBAE-Ratten bei persistierender Infektion mit dem BDV keine Anzeichen von Entzündungsreaktionen und erwiesen sich als immuntolerant. Ausnahmen bildeten drei Tiere: bei zwei Ratten im Alter von sechs Wochen fanden sich perivaskuläre Mini-Infiltrate, ähnlich den in der Literatur bei neugeborenen intracerebral BDV-infizierten Ratten im Alter von vier Wochen beschriebenen transienten mononukleären Infiltrationen (Hornig *et al.*, 1999; Sauder & de la Torre, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000). Bei einer der vier Wochen alten Ratten konnte eine ausgeprägte lymphozytäre Entzündungsreaktion nachgewiesen werden.

Im letzten Fall ist aufgrund der Schwere der Entzündungsreaktionen anzunehmen, dass bei der neonatalen Aerosolinfektion nicht genügend Virus inkorporiert wurde, um eine Immuntoleranz herbeizuführen, sodass sich das Tier zu einem späteren Zeitpunkt bei ausgereiftem Immunsystem an den von den persistent infizierten immuntoleranten Wurfgeschwistern ausgeschiedenen Viren infiziert hat. Dass auch die Mutter sich bei ihren Nachkommen infiziert hatte, konnte durch p38 positive Zellen im Gehirn nachgewiesen werden. Das Muttertier entwickelt in der Regel aber durch Graviditäts-Immunsuppression keine Entzündungsreaktionen.

### ***Neurodegenerative Veränderungen:***

Während der in dieser Arbeit beobachteten Entwicklung der Rattengehirne von der ersten bis zur 22. Lebenswoche war – wie schon von Sollmann und Schepers berichtet – ein fortschreitender Verlust von Purkinje-Zellen zu beobachten. Die Beurteilung der Anzahl der Purkinje-Zellen war erst ab etwa Tag 14 möglich, da vorher die Kleinhirntogenese noch nicht abgeschlossen ist. Die Gehirne der vier Wochen alten Ratten hatten noch eine physiologische Zelldichte, ab einem Alter von sechs Wochen ließ sich eine fortschreitende Reduktion der

Purkinje-Zellzahl beobachten, die sich bis zur 22. Woche steigerte. Da Neurone die Hauptzielzellen des BDV sind, zeigte sich auch in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, dass Purkinje-Zellen bereits ab Tag sieben infiziert werden können und bei neugeborenen intracerebral infizierten Ratten zwischen Tag 27 und 75 p. i. völlig verloren gehen (Bautista *et al.*, 1995; Eisenman *et al.*, 1999; Zocher *et al.*, 2000). Es sollte hier kritisch bemerkt werden, dass bei den Tieren mit verminderter Purkinje-Zellzahl nur wenige Zellen ausgezählt werden konnten, da pro gesamter Schnittfläche teilweise nicht mehr als 40 Purkinje-Zellen zu finden waren und Prozentangaben hier keine sinnvollen und verlässlichen repräsentativen Ergebnisse darstellen.

Auch bei pharmakologisch (z. B. durch Cyclosporin A oder Cortison) immunkompromittierten Tieren werden BDV-infizierte Neurone im Gyrus dentatus fortschreitend zerstört (Stitz *et al.*, 1991b; Stitz *et al.*, 1989; Waltrip *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang ist es sehr wichtig, noch einmal festzuhalten und zu betonen, dass zwischen „konventionell“ – also per injectionem hauptsächlich intracerebral, in einzelnen Untersuchungen auch peripher – neonatal infizierten Ratten und den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten NBAE-Ratten ein profunder immunologischer Unterschied besteht: Der Grad der Immuntoleranz von NBAE-Tieren erwies sich in den begleitenden immunologischen Testverfahren als ungleich höher. Das bedeutet, dass bei diesen Tieren entzündliche Reaktionen eine wesentlich geringere Rolle als mögliche Ursache für neurodegenerative Veränderungen spielen. Da das BDV selbst nicht zytopathogen ist, ist zu vermuten, dass direkt oder indirekt durch das BDV beeinflusste zelluläre Mechanismen an der Entstehung von Hirnveränderungen beteiligt sind.

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die zu BDV-assoziierten Neurodegenerationen führen, sind weitestgehend ungeklärt. Williams und Lipkin (2006) machen u. a. die Entstehung von Stress auf das Endoplasmatisches Retikulum (ER) durch das Virus für den Zelltod verantwortlich. Im ER existieren viele Kontrollmechanismen (z. B. Unfolded Protein Response (UPR)), um auf Störfaktoren zu reagieren. Überfordern Störfaktoren diese Kontrollmechanismen oder hält der Stress zu lange an, kommt es zu einem Ungleichgewicht in der UPR, das zum Zelltod führt. Williams und Lipkin (2006) beschreiben, dass bei neonatal infizierten Ratten Astrozyten proliferieren und im Gegensatz zu den Purkinje-Zellen bei den Astrozyten keine Apoptose ausgelöst wird. Infizierte Astrozyten scheinen die Fähigkeit zu besitzen, sich an ER-Stress zu adaptieren und somit resistent gegenüber der Apoptose zu werden. Die initialen Signale, die in Neuronen und Astrozyten zu ER-Stress führen, scheinen assoziiert zu sein mit

Störungen von extrazellulären Signalen (z. B. Zytokinen), die durch virale Proteine ausgelöst werden, ausgehend von infizierter und aktivierter Glia (Carbone, 2001; Hornig *et al.*, 1999). Das virale Glykoprotein von BDV (gp 94) scheint ein Kandidat für die Induktion von ER-Stress in neonatal BDV-infizierten Ratten zu sein (Williams & Lipkin, 2006).

Mikrogliose und Astrozytose sind auch in den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannte Reaktionen bei der BDV-Infektion neugeborener NBAE-Ratten (Sollmann, 2007). Eine astrozytäre Apoptose kommt dabei nicht vor. Bei intracerebral infizierten Ratten lassen sich Mikro- und Makroglionen in allen Hirnregionen im Zeitraum von etwa vier Wochen p. i. bis mindestens 52 Wochen p. i. nachweisen (Weissenböck *et al.*, 2000). Bautista *et al.* (1995) und Carbone *et al.* (1991) beschrieben eine diffuse reaktive Astrozytose schon ab dem dritten Tag nach intracerebraler Infektion.

Bei der immunhistochemischen p38-Färbung zeigte sich häufig, dass nicht immer die Purkinje-Zellen selbst infiziert waren, sondern die umgebende Glia (Bergmann-Glia). Aus der Literatur ist bekannt, dass außer den Neuronen vor allem Astrozyten BDV-empfindlich sind (Carbone *et al.*, 1989). Denkbar ist neben der axonalen Ausbreitung des Virus ein – ähnlich der Staupevirusinfektion (Beineke *et al.*, 2009) – liquorogener perimengialer Infektionsweg, wobei die initial infizierten Zellen hier die Gliazellen sind (Gliagrenzmembran = Membrana limitans gliae externa) (Bilzer, mündliche Mitteilung). In diesem Fall breitet sich die Infektion zentripetal über neuronale Dendritenbäume und astrozytäre Zellfortsätze in der Molekularschicht der Kleinhirnrinde aus. Somit könnte für die Degeneration der Purkinje-Zelle ein Funktionsausfall der infizierten, aber Apoptose-resistenten Gliazellen zumindest mitverantwortlich sein.

### ***Neurofilamente:***

Neurofilamente sind fädige Proteinstrukturen in Neuronen und gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente. Sie haben innerhalb der Zelle vielfältige Funktionen, die die Stabilität und die dynamischen Eigenschaften des Zytoskeletts betreffen, wie z. B. Axonwachstum, Transportvorgänge innerhalb der Zelle und Kontrolle des Axonkalibers. Für eine ungestörte Funktion der Neurofilamente spielt die Phosphorylierung eine wichtige Rolle. Neurofilamente sind keine starren Strukturen, sondern sie unterliegen einem ständigen Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungs-gekoppelten Auf- und Abbau, was als Neurofilament-Dynamik bezeichnet wird.

Bei **nicht infizierten Kontrollratten** bis zur 22. Lebenswoche

- stellten sich nicht phosphorylierte Neurofilamente nur im Perikaryon dar und erst ab der 22. Woche auch in Dendriten und Axonen.
- stellten sich phosphorylierte Neurofilamente hingegen in jedem Alter als feiner Saum dar, der die Nervenzelle umgibt; sie waren kaum im Perikaryon zu sehen, deutlich jedoch in Dendriten und Axonen.

Dieses Phänomen lässt sich entwicklungsbedingt erklären. Die eigentliche Bildung findet im Perikaryon statt, dabei befinden sich die Neurofilamente noch im nicht phosphorylierten Zustand. Erst nach Eintritt in das Axon werden die Neurofilamente phosphoryliert und dann durch Nutzung des anterograden Kinesin- und retrograden Dynein-Motors entlang des Axons transportiert (Rao *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Yabe *et al.*, 1999). Diese zelluläre Verteilung der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Neurofilamente ließ sich auch in der vorliegenden Arbeit zeigen.

Bei **BDV-infizierten Ratten** bis zur 22. Lebenswoche

- stellten sich nicht phosphorylierte Neurofilamente im Perikaryon weniger deutlich dar als bei den Kontrollratten. Eine Abgrenzung der Verteilung zwischen Bestandteilen des umliegenden Neuropils und Perikaryon war kaum möglich. Zellfortsätze waren erst bei den älteren Tieren zu erkennen, wobei sie sich aber auch dann nur schwach und diskontinuierlich darstellten.
- stellten sich phosphorylierte Neurofilamente mit zunehmendem Alter immer mehr als körnige Kondensationen und Aggregationen von Neurofilamenten dar. Die wenigen verbliebenen Purkinje-Zellen waren nur noch von einem unregelmäßigen Neurofilament-Saum umgeben. Während bei den gesunden Ratten eine feine Verästelung der Zellfortsätze bis weit in die Molekularschicht hinein zu erkennen war, zeigten sich bei den infizierten Tieren aufgetriebene unterbrochene Dendriten und Axone, die nur über kurze Strecken zu verfolgen waren, wie abgebrochen wirkten und dabei blind in der Molekularschicht endeten oder an vielen Stellen akkumulierten und dabei perlschnurartig aufgetrieben wirkten.

Diese Befunde zeigen, dass Bildung und Entwicklung sowie die für die Zellfunktion wichtige Dynamik der Neurofilamente gestört ist. Wie das BDV dabei in die Neurofilament-Entwicklung eingreift, ob durch direkte virusvermittelte Interferenz oder durch indirekte

Mechanismen wie z. B. durch Hemmung von Neurotrophinen, war nicht Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit und hätte deren Rahmen gesprengt. Über die Möglichkeiten, an welcher Stelle das BDV eingreifen könnte, soll jedoch im Folgenden diskutiert werden, um Möglichkeiten weiterführender Untersuchungen aufzuzeigen. Ein wesentliches Untersuchungsziel sind dabei die Störungen der Neurofilamente. Da die Entwicklung der Neurofilamente in vielen aufeinanderfolgenden Schritten abläuft, könnte das BDV in jedem Entwicklungsabschnitt eine Störung auslösen. Wie oben beschrieben, findet die Bildung im Zytoplasma der Zelle statt. Die Neurofilamente werden dabei aus den verschiedenen Untereinheiten NF-L, NF-M und NF-H zusammengesetzt. Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, in welchem Verhältnis zueinander die einzelnen Untereinheiten zusammengefügt werden. Findet eine Störung beim Zusammenbau statt, die sich entweder auf das Neurofilamentgerüst im Ganzen oder auf die Verteilung der prozentualen Anteile der Untereinheiten auswirkt, kann das fatale Folgen für die Funktionalität und Formstabilität der Neurofilamente und damit der ganzen Zelle haben. Ist die N-terminale Kopfdomäne betroffen, hat dies Auswirkungen auf den Zusammenbau. Beeinflusst das Virus jedoch die C-terminale Schwanzdomäne, könnte dies Auswirkungen auf die Organisation des Neurofilament-Netzwerkes und die vielfältigen Protein-Protein-Interaktionen haben (Chubb *et al.*, 2008; James *et al.*, 2004). Die Bildung des Intermediärfilaments wird auch durch Mikrotubuli und Mikrofilamente beeinflusst. Die Mikrotubuli sorgen zusammen mit den Neurofilamenten v. a. im Axon für die Stabilität im dynamischen Neuronenskelett. Eine Störung innerhalb der Mikrotubuli könnte die Interaktion mit den Neurofilamenten und somit ebenfalls die Stabilität des gesamten Zytoskeletts gefährden.

Nach dem Zusammenbau im Zytoplasma der Zelle werden die unreifen Neurofilamente beim Ausschleusen in das Axon phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird durch ein Kinase-Phosphatase-System vermittelt und durch Kontakt zum myelinbildenden Oligodendrozyten nach mehreren Zwischenschritten abgeschlossen (siehe Kap. 2.3.2). Auch im Rahmen dieser Mechanismen könnte das Virus als Störfaktor in einzelne Schritte der Phosphorylierung eingreifen. Aus vorangegangenen Arbeiten geht hervor, dass bei BDV-infizierten Ratten die Oligodendrozyten und die Myelinisierung im ZNS gestört sind (Schepers, 2009). Außerdem ist bekannt, dass die Oligodendrozyten sehr sensibel auf Stress durch Virusinfektionen reagieren (Williams & Lipkin, 2006). Folglich könnte eine gestörte Oligodendrozytenfunktion und Myelinisierung auch Auswirkungen auf die myelinabhängige Phosphorylierung haben.

Neurofilamente unterliegen einem ständigen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflussten Auf- und Abbau. Entsteht hierbei ein Ungleichgewicht, kann es zur Bildung von Neurofilament-Aggregaten kommen, die pathologische, strukturelle und funktionelle Folgen haben. In der vorliegenden Arbeit ließen sich bei den älteren NBAE-Ratten perlschnurartig aufgetriebene Aggregate deutlich erkennen. Die Akkumulationen von Neurofilamenten sind ein häufiger Befund bei verschiedenen experimentellen (Julien & Mushynski, 1998) und menschlichen (Al-Chalabi & Miller, 2003) neurodegenerativen Krankheiten, die wahrscheinlich durch einen gestörten axonalen Transport verursacht werden (Gies *et al.*, 1998; Holzbaur, 2004; Miller *et al.*, 2002). Viele Untersuchungen haben ergeben, dass Phosphorylierung ein entscheidender Faktor für die Regulation des Transports der Neurofilamente durch das Axon ist (Miller *et al.*, 2002). Bei manchen neurodegenerativen Krankheiten vermutet man, dass die Signalkaskade von Phosphatasen und Kinasen gestört ist und es somit zu einer Unterbrechung im Transportmechanismus kommt (Miller *et al.*, 2002). Um die Neurofilamente durch das Axon zu befördern, nutzen diese den Dynein-Motor-Komplex.

DISC1 ist eine wichtige Komponente des auf Mikrotubuli-basierenden Dynein-Motor-Komplexes, der aus einer Reihe von Proteinen besteht, wozu u. a. Dynein, Dynactin, LIS1 und NUDEL gehören. Im ZNS reguliert dieser Komplex während der Neurogenese die neuronale Migration und die axonale Formation (Rao *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 2000). Kamiya *et al.* (2005) zeigten, dass DISC1 diesen Komplex am Zentrosom stabilisiert und die mikrotubuläre Dynamik unterstützt. Sie konnten zeigen, dass eine Verminderung der Funktion des DISC1-Proteins *in vitro* zur Dissoziation des Komplexes vom Zentrosom führt und dadurch das Wachstum von Neuronen abnimmt. Bei Mäusegehirnen führte diese verminderte Funktion des DISC1-Proteins *in vivo* zu gestörter neuronaler Migration mit verminderter Verästelung der Dendriten im Neocortex.

### ***DISC1 und NUDEL:***

Als direkter Interaktionspartner von DISC1 (Schurov *et al.*, 2004) bildet NUDEL eine Brücke zwischen DISC1 und LIS1 und gewährleistet somit zusammen mit Dynein den Transport der Neurofilament-Untereinheiten. NUDEL erleichtert auch die Polymerisation von Neurofilamenten im Neuron durch direkte Interaktion mit der leichten Kette der drei Untereinheiten (NF-L) (Nguyen *et al.*, 2004). Wie oben beschrieben, führen Veränderungen am DISC1-Protein zu gestörter neuronaler Migration. Wenn der Dynein-Motor-Komplex nicht mehr funktionsfähig ist, können auch die Neurofilamente nicht mehr koordiniert transportiert werden, was zu strukturellen Störungen im Bereich der neuronalen Zellfortsätze führt.

Die Verminderung der Anzahl und der Verästelung der Dendriten sind auch ein Bestandteil der Pathologie der Schizophrenie (Glantz & Lewis, 2000).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass – im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollratten – das DISC1-Protein bei BDV-NBAE Ratten veränderte Expressionen aufweist, und zwar besonders im Sektor CA2 im Zellband des Hippocampus. Bei den Kontrolltieren ist DISC1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden, während bei NBAE-Tieren das Protein ausschließlich im Kern des Neurons exprimiert wird. Darüber hinaus nahmen bei den NBAE-Ratten die Anzahl der DISC1-exprimierenden Zellen ebenso wie die Intensität der intranukleären Proteinexpression deutlich zu. Ein Effekt, der sich mit zunehmendem Alter (identisch mit der Dauer nach Infektion) im Sinn einer Hyperexpression des DISC1-Proteins noch verstärkte. Diese Ergebnisse zeigen, dass das BDV einen direkten oder indirekten Einfluss auf die DISC1-Expression hat oder – anders ausgedrückt – sich die DISC1-Expression während der BDV-Infektion verändert. Über Ausmaß, Spezifität und mögliche Folgen dieses Effekts ist im Rahmen und auf der Basis der vorliegenden Untersuchungen keine Aussage möglich. Der hohe Stellenwert des DISC1-Proteins für die Bildung und Aufrechterhaltung des Zytoskeletts lässt vermuten, dass Veränderungen am DISC1-Protein entscheidenden Einfluss auf dessen Entwicklung haben. Die Struktur des Proteins könnte so weit verändert sein, dass manche Bindungen mit wichtigen Interaktionspartnern wie z. B. dem NUDEL-Protein nicht mehr eingegangen werden können und sich dadurch folgenschwere strukturelle und funktionelle Veränderungen ergeben.

Bei immunhistochemischen Untersuchungen des NUDEL-Proteins waren weder bei sechs noch bei 22 Wochen alten Ratten Unterschiede bei der Expression zwischen der nicht infizierten Kontrolle und NBAE-Ratten zu erkennen. Möglicherweise hat BDV keinen direkten Einfluss auf die Expression des NUDEL-Proteins, könnte aber über den Bindungspartner DISC1 Einfluss auf die Funktion von NUDEL nehmen.

***Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen BDV-assoziierten neurodegenerativen Veränderungen und neuropathologischen Veränderungen im Zusammenhang mit Schizophrenien:***

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Infektion immuntoleranter NBAE-Ratten mit dem nicht-zytopathogenen BDV während der Gehirnentwicklung zu schweren Schäden an neuroektodermalen Strukturen führt. Dazu zählen Veränderungen an Neuronen (wozu auch die Purkinje-Zellen zählen) und Astrozyten – also Hauptzielzellen des BDV – aber im Unterschied zu den immunpathologischen Verläufen der BD in großem

Ausmaß auch die Infektion von Oligodendrozyten und somit Störungen der Myelinisierung bis hin zur Ausbildung regelrechter Leukoencephalopathien. Das überraschende Ausmaß der Veränderungen an Neurofilamenten ist ein entscheidender Befund (Schepers, 2009), der unter Umständen nur durch den Einsatz der neuen nicht invasiven Infektionsmethode und das offenbar völlige Fehlen von Immunreaktionen erkennbar werden konnte.

Die beschriebenen strukturellen Veränderungen ähneln denen, die man bei Schizophrenie findet. In beiden Fällen sind Kleinhirn und Hippocampus besonders betroffen. Bisher ist unbekannt, auf welche Art und Weise das Virus in zelluläre Mechanismen eingreift. Trotz zahlreicher internationaler Studien mit Einzelnachweisen von BDV-spezifischen Antikörpern und/oder RNA bei Patienten mit Schizophrenie oder bipolaren Störungen ist nach wie vor unklar, ob und gegebenenfalls welchen Krankheitswert das BDV beim Menschen hat. Die Wahrscheinlichkeit einer direkten Viruswirkung wird als sehr gering eingeschätzt. Unabhängig davon erscheint die Untersuchung BDV-assoziiierter Mechanismen („Störfaktoren“) im Gehirn ein wichtiges Modellsystem zu sein, um pathologische Vorgänge in virusinduzierten neurologischen Krankheiten zu untersuchen. Die Ähnlichkeit der Änderungen in Verhalten und Neuronenentwicklung bei NBAE-Ratten zu einigen Hauptmerkmalen von menschlichen neuropsychiatrischen Störungen gibt gerade diesem Tiermodell eine besondere Bedeutung für das Verständnis solcher nicht immunvermittelter, neurodegenerativer Krankheiten.

Ein Virus kann über mehrere Wege Einfluss auf die Gehirnentwicklung nehmen. Viren können Gehirnzellen direkt schädigen, oder sie nehmen Einfluss z. B. über die Anregung der Produktion von Neurotrophinen. Zudem können sie an entscheidenden Stellen in lebenswichtige Signalkaskaden eingreifen (Carter, 2008; Fruntes & Limosin, 2008). Dabei können alle Stadien der Entwicklung betroffen sein, von der neuronalen Differenzierung bis hin zur Auswanderung von Dendriten und Axonen und deren Myelinisierung. Wenn viral verursachte Störungen in einem genetisch vorbelasteten Gehirn stattfinden, könnte dies ausreichen, um eine psychiatrische Erkrankung auszulösen (Fruntes & Limosin, 2008).

Ein eingehend erforschtes Beispiel für den Einfluss eines Virus auf neuroektodermale Entwicklung stellt die Influenza-Infektion dar. Vermutet wird eine Hemmung der Reelin-Produktion, wodurch die cortico-hippocampale Zellmigration behindert wird. Hinzu kommt, dass die Infektion einer genetisch prädisponierten Mutter wahrscheinlich eine Autoimmunantwort auslöst, welche toxisch für das fetale Gehirn ist (Fatemi *et al.*, 2000; Fatemi *et al.*, 1999; Impagnatiello *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass virale Pathogene, die mit Schizophrenie in Verbindung gebracht werden, während ihres Lebenszyklus auf vielen verschiedenen Wegen mit einer ganzen Reihe von Genen interagieren, die zum Teil wichtige Bausteine in verschiedenen Signalkaskaden des menschlichen Gehirns darstellen. Dazu gehören u. a. glutamaterge Neurotransmission, neuronale Plastizität, Oligodendrozytenfunktion und oxidativer Stress. All diese Funktionen sind wichtige Faktoren bei der Pathogenese von Schizophrenie. Umgekehrt sind diese Gene wichtige Bestandteile für die virale Entwicklung und Vermehrung. Eine Auflistung aller verdächtigen Gene findet man unter <http://www.polygenicpathways.co.uk>.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das BDV Veränderungen in der Expression des DISC1-Proteins hervorruft. Gleichzeitig ließen sich verschiedene strukturelle Unregelmäßigkeiten an den Neurofilamenten beobachten. Es ist bekannt, dass das DISC1-Protein eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Zytoskeletts innerhalb der Neurone spielt. Zusammen mit vielen anderen Interaktionspartnern gewährleistet es u. a. die Neurogenese durch Axon-Elongation und die Stabilisierung des Zytoskeletts durch Neurofilamente (siehe Kap. 2.4.2).

Durch Änderungen der Expression des DISC1-Proteins bei BDV-infizierten Ratten könnte das Protein selbst so weit verändert sein, dass es zu Störungen bei der Interaktion mit den anderen Proteinen kommt, die derart gravierend sind, dass eine einwandfreie Entwicklung von wichtigen Strukturelementen wie den Neurofilamenten nicht mehr gewährleistet ist. Hinzu kommt, dass das BDV sich das Mikrotubuli-System zunutze macht, um in den Zellkern der Wirtszelle zu gelangen. Folglich besteht in diesem für die Zytoskelettentwicklung sehr wichtigen System eine hohe Viruskonzentration. Die Frage, an welchen Stellen das Virus diesen komplexen Zusammenbau der Zytoarchitektur stört, bleibt offen.

Das DISC1-Gen ist nicht nur am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt, sondern spielt auch bei Neurogenese, weiteren zytoskelettalen Funktionen und cAMP-Signalgebung eine wichtige Rolle. Darüber hinaus wurden viele DISC1-Interaktionspartner auch als genetische Risikofaktoren für die Schizophrenie identifiziert. Somit gelangte das DISC1-Protein zu der Bezeichnung „Schlüsselprotein“ in einem multidimensionalen Signalweg voller Risikofaktoren für psychiatrische Erkrankungen (Camargo *et al.*, 2007; Chubb *et al.*, 2008).

Das DISC1-Protein wird in vielen verschiedenen Zellkompartimenten exprimiert, besonders in den Mitochondrien, dem Kern und dem Zytoplasma (siehe Kap. 2.4.2.3). Man vermutet, dass DISC je nach Lokalisationsort verschiedene Bindungspartner und somit Funktionen zur Verfügung stehen. Auch die jeweiligen Kopf- bzw. Schwanzstrukturen des Proteins

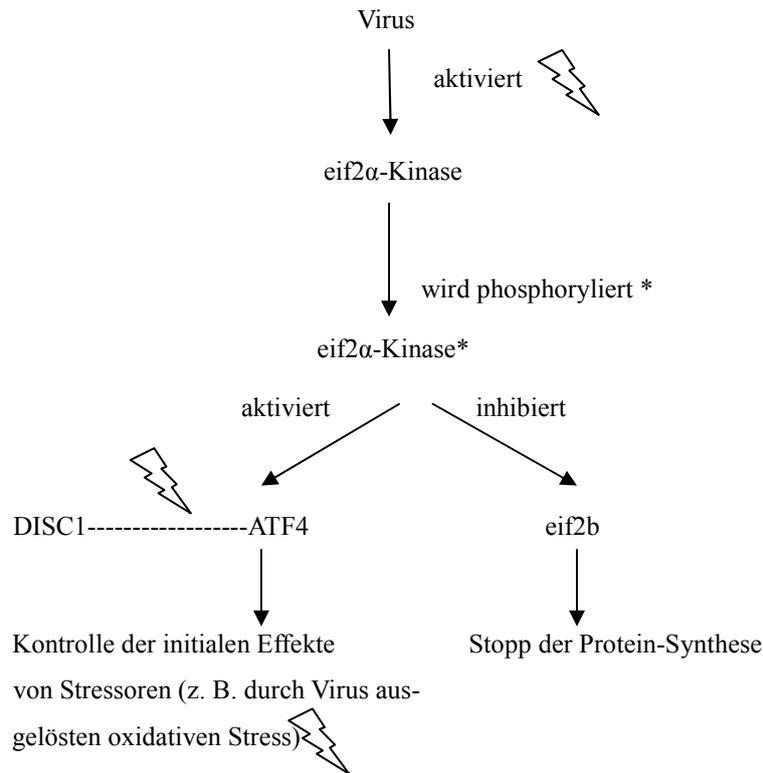
beeinflussen seine zelluläre Lokalisation. So ermöglicht die C-terminale Sequenz eine zentrosomale Verbindung, während für die mitochondriale und nukleäre Expression die N-terminale Sequenz zuständig ist (Millar *et al.*, 2005a). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Expression des DISC1-Proteins durch die BDV-Infektion ändert. Insbesondere zeigt eine vermehrte Anzahl von Zellen im Sektor CA2 des Hippocampus eine DISC1-Expression und diese Zellen weisen eine „Verlagerung“ der Expression in den Zellkern auf. Millar *et al.* (2005a) beschreiben, dass sich bei einem Verlust des C-terminalen Endes des DISC1-Proteins die nukleäre Expression signifikant erhöht. Da das full-length DISC1 nur schwach im Kern exprimiert wird (James *et al.*, 2004), vermuten Miller *et al.* (2005a), dass dem Nukleären Lokalisations-Signal (NLS) der Kopfdomäne Bestandteile aus der Schwanzdomäne entgegenwirken. Über Möglichkeiten der Einflussnahme des BDV auf das DISC1-Protein und seine Funktionen lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren. Eine aktuelle Übersicht über Funktionen und Störungen im Bereich der DISC1-Protein-Familie findet sich bei Chubb *et al.*, 2008.

### ***Weiterführende Untersuchungen***

Im Infektionszyklus eines Virus ist eine ganze Reihe von Genen involviert, die auch bei bedeutenden Signalwegen der Wirtszelle eine wichtige Rolle spielen. Störungen an diesen Genen – ausgelöst durch das Virus – können somit zu Störungen in den Signalwegen führen, die für das Überleben und die Funktion der Zelle schwerwiegende Folgen haben (Carter, 2008; Fruntes & Limosin, 2008).

Einer der wichtigsten Signalwege ist die eif2 $\alpha$ -Kaskade, die in den Zellen verantwortlich für die Proteinsynthese und deren Regulation unter Stresskonditionen ist. Die Aktivierung der eif2 $\alpha$ -Kaskade führt hauptsächlich zum Stopp der Proteinsynthese. Neben Viren und anderen Pathogenen führen oxidativer Stress und ER-Stress zur Aktivierung der eif2 $\alpha$ -Kaskade, die viele schizophreneverdächtige Gene beinhaltet. Auch verschiedene Neurotrophine werden über diese Kaskade gesteuert, wie z. B. Neurotrophine für synaptische Plastizität und Wachstum von Dendriten. Funktioniert dieses Netzwerk nicht, führt dies u. a. zum Verlust von Oligodendrozyten, reduzierter glutamaterger Funktion und schlechter Verbindung zwischen den Synapsen. Auch bei der Infektion von NBAE-Ratten mit dem BDV kommt es zu einem markanten Verlust von Oligodendrozyten (Schepers, 2009). Besonders Oligodendrozyten reagieren sehr empfindlich auf eine Störung des eif2b-Faktors. Dysfunktionen in diesem Signalweg werden verantwortlich gemacht für den Zelltod der Oligodendrozyten, wie z. B. bei der Schizophrenie (Carter, 2008).

## Diskussion



 = Stellen, an denen das Virus eingreifen könnte

Das BDV könnte durch Interaktion an entscheidenden Stellen in dieser Kaskade eingreifen. Durch BDV-assoziierte Veränderungen am DISC1-Protein könnte auch eine Bindungsstörung zwischen ATF4 und DISC1 entstehen. Hinzuzufügen ist, dass es nicht nur zu einer Blockade der Kontrollmechanismen bei durch Stressoren ausgelösten Schädigungen kommt, sondern dass das BDV noch zusätzlich in der Lage ist, oxidativen Stress und ER-Stress auszulösen. Die BDV-Infektion von NBAE-Ratten löst ER-Stress in Neuronen und Astrozyten aus und induziert die UPR. ER-Stress führt zu einer Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER, diese führen dann zur Aktivierung der UPR. Die UPR erhöht zum einen die Proteinfaltungskapazität des ER und erniedrigt zum anderen die Proteinlast im ER. Letzteres gelingt durch die Phosphorylierung der eIF2 $\alpha$ -Kinase und die Aktivierung von ATF4. Weil bei den NBAE-Ratten die UPR gestört ist, kommt es zu einem neuronenspezifischen Ungleichgewicht zwischen proapoptischen Signalen und Überlebenssignalen, was zum Zelltod bei Purkinje-Zellen und Oligodendrozyten führt. Man konnte feststellen, dass bei den BDV-infizierten

Ratten die eif2 $\alpha$ -Kinase zwar phosphoryliert wird, dies aber nicht zu einer detektierbaren Reduktion der Proteinsynthese führte (Williams & Lipkin, 2006).

Insgesamt zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass das nicht zytopathogene BDV bei immuntoleranten Ratten Veränderungen der Zytoarchitektur von Neuronen und Gliazellen sowie eine veränderte Expression des DISC1-Proteins hervorrufen kann.

Im Unterschied zu früheren Studien an immunkompromittierten neugeborenen intracerebral infizierten Ratten zeigen die eingesetzten NBAE-Ratten einen tiefen immunologischen Unterschied. Der Grad der Immuntoleranz ist ungleich höher, und somit spielen entzündliche und/oder immunpathologische Reaktionen als mögliche Ursache für neurodegenerative Veränderungen eine wesentlich geringere Rolle. Auch wenn nach wie vor immunvermittelte Reaktionen sich nicht völlig ausschließen lassen, kann man davon ausgehen, dass bei der verwendeten Aerosol-Methode die überwiegende Mehrzahl der pathologischen Hirnveränderungen durch die Infektion selbst, das heißt durch direkte oder indirekte durch das BDV beeinflusste Mechanismen, hervorgerufen wurde.

Mit Ausnahme von drei Tieren zeigen alle Tiere eine mit dem Alter zunehmende Expression des p38-Proteins und eine deutliche Mikro- und Astroglie sowie Neuronenschädigungen und Neuronenverluste (v. a. Purkinje-Zellen) bei Abwesenheit einer spezifischen Immunreaktion. Bei zwei Ratten im Alter von sechs Wochen finden sich perivaskuläre Mini-Infiltrate, ähnlich den in der Literatur bei neugeborenen intracerebral BDV-infizierten Ratten im Alter von vier Wochen beschriebenen transienten mononukleären Infiltrationen (Hornig *et al.*, 1999; Sauder & de la Torre, 1999; Weissenböck *et al.*, 2000). Bei einer der vier Wochen alten Ratten konnte eine ausgeprägte lymphozytäre Entzündungsreaktion nachgewiesen werden, welche aufgrund ihrer Schwere auf eine Ansteckung in höherem immunkompetentem Alter bei den immuntoleranten Wurfgeschwistern zurückzuführen ist.

In diesen Untersuchungen fallen vor allem die Änderungen in der Expression von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem Neurofilamenten auf. Die nicht phosphorylierten Neurofilamente stellen sich bei den infizierten Tieren weniger deutlich als bei den nicht infizierten Kontrollratten dar. Während sich bei den Kontrolltieren die nicht phosphorylierten Neurofilamente in höherem Alter auch in Dendriten und Axonen nachweisen lassen, sind diese bei den infizierten Tieren nur schwach und diskontinuierlich zu erkennen. Die phosphorylierten Neurofilamente bilden bei den nicht infizierten Kontrolltieren in jedem Alter einen feinen, die Nervenzelle umgebenden Saum. Dendriten und Axone sind deutlich zu

erkennen. Im Vergleich dazu bilden die phosphorylierten Neurofilamente bei den infizierten Tieren lediglich bruchstückhafte körnige Kondensationen und Aggregationen. Die Dendriten und Axone sind aufgetrieben und unterbrochen. Diese Veränderungen verstärken sich mit zunehmendem Alter der infizierten Tiere. Diese Befunde zeigen, dass Bildung und Entwicklung sowie die für die Zellfunktion wichtige Dynamik der Neurofilamente gestört sind.

Das DISC1-Protein weist – im Vergleich zu gesunden Kontrollen – bei NBAE-Ratten veränderte Expressionen auf, und zwar besonders im Sektor CA2 im Zellband des Hippocampus. Bei den Kontrolltieren ist DISC1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden, während bei NBAE-Tieren das Protein ausschließlich im Kern des Neurons exprimiert wird. Darüber hinaus nimmt bei den infizierten Ratten die Anzahl der DISC1-exprimierenden Zellen ebenso wie die Intensität der intranukleären Proteinexpression deutlich zu. Ein Effekt, der sich mit zunehmendem Alter im Sinn einer Hyperexpression des DISC1-Proteins noch verstärkt. Diese Ergebnisse zeigen, dass das BDV einen direkten oder indirekten Einfluss auf die DISC-Expression hat.

Ob die beobachteten Veränderungen an DISC-Protein und Neurofilamenten in Zusammenhang stehen, ob das DISC-Protein Einfluss auf die Entwicklung der Neurofilamente hat und wie das BDV dabei in die Neurofilament-Entwicklung eingreift sollte zukünftig weiter untersucht werden. Über Ausmaß, Spezifität und mögliche Folgen der Neurofilament-Veränderungen ist im Rahmen und auf Basis der vorliegenden Untersuchungen noch keine Aussage möglich.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der experimentellen Infektion von neugeborenen Ratten mit dem BDV war, ein Modell einer lebenslangen Viruspersistenz im Zentralnervensystem zu erzeugen, ohne wesentliche immunpathologische Reaktionen auszulösen. Es dient als repräsentatives Modell zur Erforschung von Störungen der Hirnentwicklung und Hirnfunktion durch nicht zytopathogene RNA-Viren.

In dieser Arbeit konzentrierten wir uns auf die Charakterisierung struktureller Veränderungen und die Untersuchung der Auswirkungen der Infektion auf Neurofilamente und andere neuronale Proteine, die vermutlich auch bei verschiedenen neuropsychiatrischen Krankheiten eine Rolle spielen.

Bei der hier durchgeführten, nicht invasiven Infektion mit einem virushaltigen Aerosol ist der Grad der Immuntoleranz ungleich höher und entzündliche Reaktionen spielen eine wesentlich geringere Rolle als mögliche Ursache für neurodegenerative Veränderungen als bei der herkömmlichen intracerebralen Infektion immunkompromittierter Ratten.

In den eigenen Untersuchungen wurden neugeborene infizierte Lewis-Ratten sowie gesunde Kontrolltiere verwendet. Von den Gehirnen der Tiere wurden Stufenschnitte angefertigt und neben Standardfärbungen immunhistochemische Färbungen mit Markern für BDV-Protein, DISC1-Protein und NUDEL-Protein durchgeführt. Um die himnmorphologischen Veränderungen näher zu untersuchen, wurden Marker für phosphorylierte und nicht phosphorylierte Neurofilamente verwendet.

Zwölf der 13 NBAE-Ratten zeigten das typische Bild der persistierenden toleranten Infektion ohne infiltrierende Immunzellen. Mit zunehmendem Alter exprimierten diese Ratten immer mehr BDV-Protein in Zellen aller Gehirnregionen und zeigten Mikrogliose und Astrozytose. Bis zu einem Alter von vier Wochen zeigten die infizierten Ratten eine physiologische Zelldichte, ab der sechsten Lebenswoche ließ sich eine fortschreitende Reduktion der Purkinje-Zellzahl beobachten, die sich bis zur 22. Woche steigerte.

Bei zwei Ratten im Alter von sechs Wochen fanden sich perivaskuläre Mini-Infiltrate, dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine transiente unspezifische Immunantwort. Eine der vier Wochen alten Ratten zeigte eine ausgeprägte lymphozytäre Entzündungsreaktion. Wahrscheinlich war bei diesem Tier die Infektion am ersten Lebenstag nicht erfolgreich und die Aufnahme von BDV, vermutlich von infizierten und virusausscheidenden Geschwistertieren, führte im höheren immunkompetenten Alter zur Infektion.

## Zusammenfassung

Mit fortschreitendem Alter der Ratten konnten zunehmend Veränderungen der Neurofilamente beobachtet werden. Die nicht phosphorylierten Neurofilamente stellten sich bei den infizierten Tieren weniger deutlich dar. Während sich bei den Kontrolltieren die nicht phosphorylierten Neurofilamente in höherem Alter auch in Dendriten und Axonen darstellen ließen, waren diese bei den infizierten Tieren nur schwach und diskontinuierlich zu erkennen. Die phosphorylierten Neurofilamente stellten sich bei den gesunden Kontrolltieren in jedem Alter als feiner, die Nervenzelle umgebender Saum dar. Dendriten und Axone waren deutlich zu erkennen. Im Vergleich dazu bildeten die phosphorylierten Neurofilamente bei den infizierten Tieren körnige Kondensationen und Aggregationen. Die Dendriten und Axone waren aufgetrieben, unterbrochen und wirkten an vielen Stellen perlschnurartig aufgetrieben.

Bei den Kontrolltieren wurde das DISC1-Protein im Zytoplasma und Zellkern des Neurons exprimiert, während es bei den NBAE-Tieren nur im Zellkern exprimiert wurde. Die veränderte Expression des DISC1-Proteins war besonders im Sektor CA2 im Zellband des Hippocampus zu sehen. Die Anzahl der DISC1-exprimierenden Zellen, ebenso wie die Intensität der intranukleären Proteinexpression, nahm bei den infizierten Ratten deutlich zu. Ein Effekt, der sich mit zunehmendem Alter im Sinn einer Hyperexpression des DISC1-Proteins noch verstärkte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass BDV die Bildung, Entwicklung und Dynamik der Neurofilamente stört und auch einen direkten oder indirekten Einfluss auf die DISC1-Expression hat. Es bleibt zu klären, wie das BDV dabei in die Neurofilament-Entwicklung eingreift. Es ist bekannt, dass das DISC1-Protein für die Bildung und Aufrechterhaltung des Zytoskeletts einen hohen Stellenwert hat, was wiederum die gesamte Hirnfunktion betrifft. Daher ergibt sich die Annahme, dass Veränderungen am DISC1-Protein entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung der Neurofilamente haben.

Diese pathologischen Befunde spielen daher möglicherweise eine signifikante Rolle bei der neurologischen Erkrankung neonatal BDV-infizierter Ratten. Veränderungen an Neurofilamenten sind ein häufiger Befund bei verschiedenen humanen neurodegenerativen Krankheiten. Somit scheinen die BDV-NBAE-Ratten ein geeignetes Modell darzustellen, um die Pathogenese solcher nicht immunvermittelter, neurodegenerativer Krankheiten besser verstehen zu lernen.

Um genauere Aussagen über die Beteiligung der BDV-Infektion an der Entstehung von neuropsychiatrischen Krankheiten zu treffen, müssen in Zukunft Ausmaß, Spezifität und mögliche Folgen der beobachteten Veränderungen näher untersucht werden.

## 7 Summary

The goal of the experimental infection of newborn rats with Borna disease virus (BDV) was to induce lifelong persistency of the virus in the central nervous system, without provoking profound immunopathologic reactions. This should serve as a representative model for the investigation of disruptions in the development and in the function of the brain due to non-zytopathogenic RNA-viruses.

In this study we focused on characterizing the impact of the infection by looking at morphological changes in Neurofilaments and other neuronal proteins, as are also seen in the formation of neuropsychiatric diseases. Therefore we chose to non-invasively infect the newborn rats with aerosol containing virus, for the immunotolerance is higher and the inflammatory reactions, which could also lead to neurodegenerative changes are fewer using this route of infection than in the conventional intracerebral infection.

We infected newborn Lewis rats and kept a non-infected control group. Sequential slides of the brains were cut and stained with standard and immunohistochemic stains with markers for BDV protein, DISC1 protein and NUDEL protein. Markers for phosphorylated and non-phosphorylated Neurofilaments were used to further investigate the morphological changes in the brain tissue.

No clinical signs and no specific immune response, as is typical for a persistent immunotolerant infection, were found in 12 of the 13 newborn aerosol infected rats (NBAE rats). These rats showed microgliosis and astrocytosis with increased age, also more and more BDV protein was expressed in cells of all regions of the brain. The cell density was within the physiological range in the infected rats up to an age of four weeks. From the 6<sup>th</sup> week on a reduction of Purkinje cells was noted, which then further decreased up to week 22.

Perivascular mini-infiltrates were found in two rats aged six weeks. We assume that these were due to a transient unspecific immune response. A marked lymphocytic inflammatory reaction was detected in one rat aged four weeks. In this animal the infection on the first day of life was not successful and it acquired BDV, probably from an infected and virus-shedding sibling, at an older and thus immunocompetent age leading to an infection.

With advanced age of the rats an increased number of alterations in the Neurofilaments were seen. The non-phosphorylated Neurofilaments were less distinct in the infected animals than in the healthy controls.

## Summary

It was possible to distinguish the non-phosphorylated Neurofilaments as dendrites and axons in the older control animals, yet in the infected rats these were only slightly and discontinuously recognizable. In the healthy control animals the phosphorylated Neurofilaments were seen as a subtle hem surrounding the neuron, dendrites and axons were distinct at any age. In contrast, the phosphorylated Neurofilaments of the infected rats formed granulous condensations and aggregations. Here the dendrites and the axons were interrupted and swollen, in many locations comparable to a row of beads.

In the controls the DISC1 protein was expressed in the cytoplasm and in the nucleus of the neuron, whereas in the NBAE rats it was only present in the nucleus, this change in the expression pattern of the DISC1 protein was mainly notable in the CA2 sector of the hippocampus. The amount of DISC1 expressing cells, as well as the intensity of the intranuclear expression of the protein was markedly increased in the infected rats. This resulted in a stage of hyper expression of DISC1 in older animals.

These results show that BDV infection affects the formation, development and dynamics of the Neurofilaments and thus may have a direct or indirect influence on the expression of DISC1. Further clarification is needed on how the BDV influences the development of the Neurofilaments.

It is known that the DISC1 protein has a major impact on the formation, maintenance and stability of the cytoskeleton of the neurons and thus all functions of the brain. Hence one can assume that a change in DISC1 expression can severely influence the development and morphological appearance of the Neurofilaments. Consequently these pathological findings may play a significant role in the neurological disease of neonatal BDV infected rats.

In neurodegenerative diseases of humans alterations of the Neurofilaments are frequently seen. The BDV-NBAE rats may thus prove to be a suited model to further understand the pathogenesis of such non-immune mediated, neurodegenerative diseases.

To make additional statements about the involvement of BDV infection on the development of neuropsychiatric diseases extent, specificity and possible consequences of the noted changes will have to be further investigated in the future.

## 8 Literaturverzeichnis

- Ackerley, S., P. Thornhill, A. J. Grierson, J. Brownlees, B. H. Anderton, P. N. Leigh, C. E. Shaw and C. C. Miller (2003).** Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J Cell Biol* 161(3): 489.
- Ahmad, F. J., C. J. Echeverri, R. B. Vallee and P. W. Baas (1998).** Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon. *J Cell Biol* 140(2): 391.
- Al-Chalabi, A. and C. C. Miller (2003).** Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays* 25(4): 346.
- Allmang, U., M. Hofer, S. Herzog, K. Bechter and P. Staeheli (2001).** Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry* 6(3): 329.
- Altshuler, L. L., A. Conrad, J. A. Kovelman and A. Scheibel (1987).** Hippocampal pyramidal cell orientation in schizophrenia. A controlled neurohistologic study of the Yakovlev collection. *Arch Gen Psychiatry* 44(12): 1094.
- Arinami, T., T. Ohtsuki, H. Ishiguro, H. Ujike, Y. Tanaka, Y. Morita, M. Mineta, M. Takeichi, S. Yamada, A. Imamura, K. Ohara, H. Shibuya, K. Ohara, Y. Suzuki, T. Muratake, N. Kaneko, T. Someya, T. Inada, T. Yoshikawa, T. Toyota, K. Yamada, T. Kojima, S. Takahashi, O. Osamu, T. Shinkai, M. Nakamura, H. Fukuzako, T. Hashiguchi, S. I. Niwa, T. Ueno, H. Tachikawa, T. Hori, T. Asada, S. Nanko, H. Kunugi, R. Hashimoto, N. Ozaki, N. Iwata, M. Harano, H. Arai, T. Ohnuma, I. Kusumi, T. Koyama, H. Yoneda, Y. Fukumaki, H. Shibata, S. Kaneko, H. Higuchi, N. Yasui-Furukori, Y. Numachi, M. Itokawa and Y. Okazaki (2005).** Genomewide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p. *Am J Hum Genet* 77(6): 937.
- Austin, C. P., B. Ky, L. Ma, J. A. Morris and P. J. Shughrue (2004).** Expression of Disrupted-In-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development. *Neuroscience* 124(1): 3.

- Babulas, V., P. Factor-Litvak, R. Goetz, C. A. Schaefer and A. S. Brown (2006).** Prenatal exposure to maternal genital and reproductive infections and adult schizophrenia. *Am J Psychiatry* 163(5): 927.
- Balin, B. J., E. A. Clark, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (1991).** Neurofilament reassembly in vitro: biochemical, morphological and immuno-electron microscopic studies employing monoclonal antibodies to defined epitopes. *Brain Res* 556(2): 181.
- Balin, B. J. and V. M. Lee (1991).** Individual neurofilament subunits reassembled in vitro exhibit unique biochemical, morphological and immunological properties. *Brain Res* 556(2): 196.
- Bautista, J. R., S. A. Rubin, T. H. Moran, G. J. Schwartz and K. M. Carbone (1995).** Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain Res Dev Brain Res* 90(1-2): 45.
- Bautista, J. R., G. J. Schwartz, J. C. De La Torre, T. H. Moran and K. M. Carbone (1994).** Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain Res Bull* 34(1): 31.
- Bechter, K. (2004).** The mild encephalitis-hypothesis--new findings and studies. *Psychiatr Prax* 31 Suppl 1: S41.
- Beineke, A., C. Puff, F. Seehusen and W. Baumgartner (2009).** Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol* 127(1-2): 1.
- Benes, F. M., R. Majoča, E. D. Bird and C. A. Marotta (1987).** Increased vertical axon numbers in cingulate cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 44(11): 1017.
- Berg, M., M. Johansson, H. Montell and A. L. Berg (2001).** Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect* 127(1): 173.
- Billich, C., C. Sauder, R. Frank, S. Herzog, K. Bechter, K. Takahashi, H. Peters, P. Stacheli and M. Schwemmle (2002).** High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biol Psychiatry* 51(12): 979.
- Bilzer, T., O. Planz, W. I. Lipkin and L. Stitz (1995).** Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain Pathol* 5(3): 223.
- Bilzer, T. and L. Stitz (1994).** Immune-mediated brain atrophy. CD8+ T cells contribute to tissue destruction during borna disease. *J Immunol* 153(2): 818.

- Bilzer, T. and L. Stitz (1996).** Immunopathogenesis of virus diseases affecting the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 16(2): 145.
- Blackwood, D. H., A. Fordyce, M. T. Walker, D. M. St Clair, D. J. Porteous and W. J. Muir (2001).** Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet* 69(2): 428.
- Blasius, T. L., D. Cai, G. T. Jih, C. P. Toret and K. J. Verhey (2007).** Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J Cell Biol* 176(1): 11.
- Bode, L. (1995).** Human infections with Borna disease virus and potential pathogenic implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 103.
- Bode, L., R. Dürrwald and H. Ludwig (1994a).** Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet Rec* 135(12): 283.
- Bode, L., R. Dürrwald, F. A. Rantam, R. Ferszt and H. Ludwig (1996).** First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Mol Psychiatry* 1(3): 200.
- Bode, L. and H. Ludwig (2001).** Borna disease virus - a threat for human mental health? *Cambridge University Press*: 269.
- Bode, L., F. Steinbach and H. Ludwig (1994b).** A novel marker for Borna disease virus infection. *Lancet* 343(8892): 297.
- Bode, L., W. Zimmermann, R. Ferszt, F. Steinbach and H. Ludwig (1995).** Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nat Med* 1(3): 232.
- Boks, M. P., T. Rietkerk, M. H. van de Beek, I. E. Sommer, T. J. de Koning and R. S. Kahn (2007).** Reviewing the role of the genes G72 and DAAO in glutamate neurotransmission in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 17(9): 567.
- Bord, L., J. Wheeler, M. Paek, M. Saleh, A. Lyons-Warren, C. A. Ross, N. Sawamura and A. Sawa (2006).** Primate disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1): high divergence of a gene for major mental illnesses in recent evolutionary history. *Neurosci Res* 56(3): 286.
- Borrello, M. G., G. Pelicci, E. Arighi, L. De Filippis, A. Greco, I. Bongarzone, M. Rizzetti, P. G. Pelicci and M. A. Pierotti (1994).** The oncogenic versions of the Ret and Trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. *Oncogene* 9(6): 1661.

- Brady, S. T. (1985).** A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. *Nature* 317(6032): 73.
- Brazil, D. P. and B. A. Hemmings (2001).** Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26(11): 657.
- Briese, T., M. Hornig and W. I. Lipkin (1999).** Bornavirus immunopathogenesis in rodents: models for human neurological diseases. *J Neurovirol* 5(6): 604.
- Brown, A. S. (2006).** Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. *Schizophr Bull* 32(2): 200.
- Buday, L. (1999).** Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta* 1422(2): 187.
- Camargo, L. M., V. Collura, J. C. Rain, K. Mizuguchi, H. Hermjakob, S. Kerrien, T. P. Bonnert, P. J. Whiting and N. J. Brandon (2007).** Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12(1): 74.
- Caplazi, P. and F. Ehrensperger (1998).** Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 61(2-4): 203.
- Caplazi, P., A. Waldvogel, L. Stitz, U. Braun and F. Ehrensperger (1994).** Borna disease in naturally infected cattle. *J Comp Pathol* 111(1): 65.
- Carbone, K. M. (2001).** Borna disease virus and human disease. *Clin Microbiol Rev* 14(3): 513.
- Carbone, K. M., C. S. Duchala, J. W. Griffin, A. L. Kincaid and O. Narayan (1987).** Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol* 61(11): 3431.
- Carbone, K. M., S. W. Park, S. A. Rubin, R. W. Waltrip, 2nd and G. B. Vogelsang (1991).** Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol* 65(11): 6154.
- Carbone, K. M., S. A. Rubin, A. M. Sierra-Honigmann and H. M. Lederman (1993).** Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus

- (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol* 67(3): 1453.
- Carbone, K. M., B. D. Trapp, J. W. Griffin, C. S. Duchala and O. Narayan (1989).** Astrocytes and Schwann cells are virus-host cells in the nervous system of rats with Borna disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 48(6): 631.
- Carden, M. J., W. W. Schlaepfer and V. M. Lee (1985).** The structure, biochemical properties, and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. *J Biol Chem* 260(17): 9805.
- Carden, M. J., J. Q. Trojanowski, W. W. Schlaepfer and V. M. Lee (1987).** Two-stage expression of neurofilament polypeptides during rat neurogenesis with early establishment of adult phosphorylation patterns. *J Neurosci* 7(11): 3489.
- Carter, C. J. (2006).** Schizophrenia susceptibility genes converge on interlinked pathways related to glutamatergic transmission and long-term potentiation, oxidative stress and oligodendrocyte viability. *Schizophr Res* 86(1-3): 1.
- Carter, C. J. (2008).** Schizophrenia Susceptibility Genes Directly Implicated in the Life Cycles of Pathogens: Cytomegalovirus, Influenza, Herpes simplex, Rubella, and *Toxoplasma gondii*. *Schizophr Bull*.
- Chalmers, R. M., D. R. Thomas and R. L. Salmon (2005).** Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *Qjm* 98(4): 255.
- Chao, M. V. (2003).** Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signaling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4(4): 299.
- Chen, C. H., Y. L. Chiu, C. K. Shaw, M. T. Tsai, A. L. Hwang and K. J. Hsiao (1999).** Detection of Borna disease virus RNA from peripheral blood cells in schizophrenic patients and mental health workers. *Mol Psychiatry* 4(6): 566.
- Chubb, J. E., N. J. Bradshaw, D. C. Soares, D. J. Porteous and J. K. Millar (2008).** The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry* 13(1): 36.
- Cooper, G. M. (2000).** The cytoskeleton and cell movement. *The cell: a molecular approach*. Ed. I. Sinauer Associates, Cooper G.M.
- de Waegh, S. M., V. M. Lee and S. T. Brady (1992).** Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68(3): 451.

- Dean, K. and R. M. Murray (2005).** Environmental risk factors for psychosis. *Dialogues Clin Neurosci* 7(1): 69.
- Dietz, D. M. and M. V. Pletnikov (2003).** Postnatal weight gain inhibition does not account for neurobehavioral consequences of neonatal Borna disease virus infection. *Physiol Behav* 80(2-3): 359.
- Dittrich, W., L. Bode, H. Ludwig, M. Kao and K. Schneider (1989).** Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biol Psychiatry* 26(8): 818.
- Dong, D. L., Z. S. Xu, M. R. Chevrier, R. J. Cotter, D. W. Cleveland and G. W. Hart (1993).** Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *J Biol Chem* 268(22): 16679.
- Drubin, D. G., S. C. Feinstein, E. M. Shooter and M. W. Kirschner (1985).** Nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells involves the coordinate induction of microtubule assembly and assembly-promoting factors. *J Cell Biol* 101(5 Pt 1): 1799.
- Dürwald, R. and H. Ludwig (1997).** Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralbl Veterinarmed B* 44(3): 147.
- Eastwood, S. L., P. W. Burnet and P. J. Harrison (1995).** Altered synaptophysin expression as a marker of synaptic pathology in schizophrenia. *Neuroscience* 66(2): 309.
- Eickmann, M., S. Kiermayer, I. Kraus, M. Gossel, J. A. Richt and W. Garten (2005).** Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS Lett* 579(21): 4751.
- Eisenman, L. M., R. Brothers, M. H. Tran, R. B. Kean, G. M. Dickson, B. Dietzschold and D. C. Hooper (1999).** Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *J Neurovirol* 5(2): 181.
- Elder, G. A., V. L. Friedrich, Jr., P. Bosco, C. Kang, A. Gourov, P. H. Tu, V. M. Lee and R. A. Lazzarini (1998).** Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content. *J Cell Biol* 141(3): 727.
- Elhanany, E., H. Jaffe, W. T. Link, D. M. Sheeley, H. Gainer and H. C. Pant (1994).** Identification of endogenously phosphorylated KSP sites in the high-molecular-weight rat neurofilament protein. *J Neurochem* 63(6): 2324.

- Fatemi, S. H., J. A. Earle and T. McMenomy (2000).** Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol Psychiatry* 5(6): 654.
- Fatemi, S. H., E. S. Emamian, D. Kist, R. W. Sidwell, K. Nakajima, P. Akhter, A. Shier, S. Sheikh and K. Bailey (1999).** Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Mol Psychiatry* 4(2): 145.
- Fish, B., J. Marcus, S. L. Hans, J. G. Auerbach and S. Perdue (1992).** Infants at risk for schizophrenia: sequelae of a genetic neurointegrative defect. A review and replication analysis of pandy smaturation in the Jerusalem Infant Development Study. *Arch Gen Psychiatry* 49(3): 221.
- Fruntes, V. and F. Limosin (2008).** Schizophrenia and viral infection during neurodevelopment: a pathogenesis model? *Med Sci Monit* 14(6): RA71.
- Fu, Z. F., J. D. Amsterdam, M. Kao, V. Shankar, H. Koprowski and B. Dietzschold (1993).** Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with affective disorders by western immunoblot technique. *J Affect Disord* 27(1): 61.
- Fuchs, E. and K. Weber (1994).** Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63: 345.
- Fukuda, K., K. Takahashi, Y. Iwata, N. Mori, K. Gonda, T. Ogawa, K. Osonoe, M. Sato, S. Ogata, T. Horimoto, T. Sawada, M. Tashiro, K. Yamaguchi, S. Niwa and S. Shigeta (2001).** Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *J Clin Microbiol* 39(2): 419.
- Furrer, E., T. Bilzer, L. Stitz and O. Planz (2001).** High-dose Borna disease virus infection induces a nucleoprotein-specific cytotoxic T-lymphocyte response and prevention of immunopathology. *J Virol* 75(23): 11700.
- Ganguli, R., J. S. Brar, W. Solomon, K. N. Chengappa and B. S. Rabin (1992).** Altered interleukin-2 production in schizophrenia: association between clinical state and autoantibody production. *Psychiatry Res* 44(2): 113.
- Garcia, M. L., C. S. Lobsiger, S. B. Shah, T. J. Deerinck, J. Crum, D. Young, C. M. Ward, T. O. Crawford, T. Gotow, Y. Uchiyama, M. H. Ellisman, N. A. Calcutt and D. W. Cleveland (2003).** NF-M is an essential target for the myelin-directed "outside-in" signaling cascade that mediates radial axonal growth. *J Cell Biol* 163(5): 1011.

- Gardner, E. E., D. Dahl and A. Bignami (1984).** Formation of 10-nanometer filaments from the 150K-dalton neurofilament protein in vitro. *J Neurosci Res* 11(2): 145.
- Geisler, N., U. Plessmann and K. Weber (1985).** The complete amino acid sequence of the major mammalian neurofilament protein (NF-L). *FEBS Lett* 182(2): 475.
- Geisler, N. and K. Weber (1981).** Self-assembly in Vitro of the 68,000 molecular weight component of the mammalian neurofilament triplet proteins into intermediate-sized filaments. *J Mol Biol* 151(3): 565.
- Gies, U., T. Bilzer, L. Stitz and J. F. Staiger (1998).** Disturbance of the cortical cholinergic innervation in Borna disease prior to encephalitis. *Brain Pathol* 8(1): 39.
- Gies, U., T. J. Gorcs, J. Mulder, O. Planz, L. Stitz, T. Bilzer, P. G. Luiten and T. Harkany (2001).** Cortical cholinergic decline parallels the progression of Borna virus encephalitis. *Neuroreport* 12(17): 3767.
- Gillberg, C. (1999).** Neurodevelopmental processes and psychological functioning in autism. *Dev Psychopathol* 11(3): 567.
- Glantz, L. A. and D. A. Lewis (2000).** Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57(1): 65.
- Glatt, S. J., S. V. Faraone and M. T. Tsuang (2003).** Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8(11): 911.
- Gonzalez-Dunia, D., B. Cubitt and J. C. de la Torre (1998).** Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol* 72(1): 783.
- Gonzalez-Dunia, D., C. Sauder and J. C. de la Torre (1997).** Borna disease virus and the brain. *Brain Res Bull* 44(6): 647.
- Gonzalez-Dunia, D., M. Watanabe, S. Syan, M. Mallory, E. Masliah and J. C. De La Torre (2000).** Synaptic pathology in Borna disease virus persistent infection. *J Virol* 74(8): 3441.
- Goslin, K. and G. Banker (1989).** Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108(4): 1507.
- Gosztonyi, G. and H. Ludwig (1984).** Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals. *Acta Neuropathol* 64(3): 213.

- Gosztonyi, G. and H. Ludwig (1995).** Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 39.
- Gothelf, D., C. Feinstein, T. Thompson, E. Gu, L. Penniman, E. Van Stone, H. Kwon, S. Eliez and A. L. Reiss (2007).** Risk factors for the emergence of psychotic disorders in adolescents with 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Psychiatry* 164(4): 663.
- Hahn, C. G., H. Y. Wang, D. S. Cho, K. Talbot, R. E. Gur, W. H. Berrettini, K. Bakshi, J. Kamins, K. E. Borgmann-Winter, S. J. Siegel, R. J. Gallop and S. E. Arnold (2006).** Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypo-function in schizophrenia. *Nat Med* 12(7): 824.
- Hans, A., J. J. Bajramovic, S. Syan, E. Perret, I. Dunia, M. Brahic and D. Gonzalez-Dunia (2004).** Persistent, noncytolytic infection of neurons by Borna disease virus interferes with ERK 1/2 signaling and abrogates BDNF-induced synaptogenesis. *Faseb J* 18(7): 863.
- Harrison, P. J. (1999).** The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 ( Pt 4): 593.
- Harrison, P. J. and D. R. Weinberger (2005).** Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10(1): 40.
- Hatalski, C. G., W. F. Hickey and W. I. Lipkin (1998).** Evolution of the immune response in the central nervous system following infection with Borna disease virus. *J Neuroimmunol* 90(2): 137.
- Heins, S., P. C. Wong, S. Muller, K. Goldie, D. W. Cleveland and U. Aebi (1993).** The rod domain of NF-L determines neurofilament architecture, whereas the end domains specify filament assembly and network formation. *J Cell Biol* 123(6 Pt 1): 1517.
- Herzog, S., C. Kompter, K. Frese and R. Rott (1984).** Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Med Microbiol Immunol* 173(4): 171.
- Herzog, S., I. Pfeuffer, K. Haberzettl, H. Feldmann, K. Frese, K. Bechter and J. A. Richt (1997).** Molecular characterization of Borna disease virus from naturally infected animals and possible links to human disorders. *Arch Virol Suppl* 13: 183.
- Hickey, W. F. (1991).** Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1(2): 97.

- Hickey, W. F. (1999).** Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. *Semin Immunol* 11(2): 125.
- Hilbe, M., R. Herrsche, J. Kolodziejek, N. Nowotny, K. Zlinszky and F. Ehrensperger (2006).** Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerg Infect Dis* 12(4): 675.
- Hirano, N., M. Kao and H. Ludwig (1983).** Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol* 64 (Pt 7): 1521.
- Hirvonen, M., A. Laakso, K. Nagren, J. O. Rinne, T. Pohjalainen and J. Hietala (2004).** C957T polymorphism of the dopamine D2 receptor (DRD2) gene affects striatal DRD2 availability in vivo. *Mol Psychiatry* 9(12): 1060.
- Hisanaga, S. and N. Hirokawa (1988).** Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J Mol Biol* 202(2): 297.
- Hisanaga, S. and N. Hirokawa (1990).** Molecular architecture of the neurofilament. II. Reassembly process of neurofilament L protein in vitro. *J Mol Biol* 211(4): 871.
- Hisanaga, S., A. Ikai and N. Hirokawa (1990).** Molecular architecture of the neurofilament. I. Subunit arrangement of neurofilament L protein in the intermediate-sized filament. *J Mol Biol* 211(4): 857.
- Hoffman, P. N., J. W. Griffin and D. L. Price (1984).** Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* 99(2): 705.
- Hoffman, P. N. and R. J. Lasek (1975).** The slow component of axonal transport. Identification of major structural polypeptides of the axon and their generality among mammalian neurons. *J Cell Biol* 66(2): 351.
- Holzbaur, E. L. (2004).** Tangled NUDELS? *Nat Cell Biol* 6(7): 569.
- Hornig, M., M. Solbrig, N. Horscroft, H. Weissenböck and W. I. Lipkin (2001).** Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: models for neuropsychiatric disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 253: 157.
- Hornig, M., H. Weissenböck, N. Horscroft and W. I. Lipkin (1999).** An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21): 12102.
- Houslay, M. D. and D. R. Adams (2003).** PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 370(Pt 1): 1.

- Hsieh, S. T., G. J. Kidd, T. O. Crawford, Z. Xu, W. M. Lin, B. D. Trapp, D. W. Cleveland and J. W. Griffin (1994).** Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J Neurosci* 14(11 Pt 1): 6392.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001).** Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24: 677.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003).** Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72: 609.
- Ikuta, J., A. Maturana, T. Fujita, T. Okajima, K. Tatematsu, K. Tanizawa and S. Kuroda (2007).** Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) participates in the polarization of hippocampal neuron by controlling the mitochondrial motility. *Biochem Biophys Res Commun* 353(1): 127.
- Impagnatiello, F., A. R. Guidotti, C. Pesold, Y. Dwivedi, H. Caruncho, M. G. Pisu, D. P. Uzunov, N. R. Smalheiser, J. M. Davis, G. N. Pandey, G. D. Pappas, P. Tueting, R. P. Sharma and E. Costa (1998).** A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15718.
- Ishizuka, K., M. Paek, A. Kamiya and A. Sawa (2006).** A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry* 59(12): 1189.
- James, R., R. R. Adams, S. Christie, S. R. Buchanan, D. J. Porteous and J. K. Millar (2004).** Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) is a multicompartimentalized protein that predominantly localizes to mitochondria. *Mol Cell Neurosci* 26(1): 112.
- Joest, S. W. (1911).** Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirnrückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsweges und der Kerneinschlüsse. *Z Inf Krkh Haustiere* 10: 293.
- Julien, J. P., F. Cote, L. Beaudet, M. Sidky, D. Flavell, F. Grosveld and W. Mushynski (1988).** Sequence and structure of the mouse gene coding for the largest neurofilament subunit. *Gene* 68(2): 307.
- Julien, J. P. and W. E. Mushynski (1983).** The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. *J Biol Chem* 258(6): 4019.

- Julien, J. P. and W. E. Mushynski (1998).** Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 1.
- Kalkman, H. O. (2006).** The role of the phosphatidylinositide 3-kinase-protein kinase B pathway in schizophrenia. *Pharmacol Ther* 110(1): 117.
- Kamal, A. and L. S. Goldstein (2002).** Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 14(1): 63.
- Kamiya, A., K. Kubo, T. Tomoda, M. Takaki, R. Youn, Y. Ozeki, N. Sawamura, U. Park, C. Kudo, M. Okawa, C. A. Ross, M. E. Hatten, K. Nakajima and A. Sawa (2005).** A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 7(12): 1167.
- Karpus, W. J., J. D. Peterson and S. D. Miller (1994).** Anergy in vivo: down-regulation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> Th1 but not Th2 cytokine responses. *Int Immunol* 6(5): 721.
- Kemper, T. L. and M. L. Bauman (1993).** The contribution of neuropathologic studies to the understanding of autism. *Neurol Clin* 11(1): 175.
- Khoury, S. J., E. Akalin, A. Chandraker, L. A. Turka, P. S. Linsley, M. H. Sayegh and W. W. Hancock (1995).** CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. *J Immunol* 155(10): 4521.
- Kirkpatrick, L. L. and S. T. Brady (1994).** Modulation of the axonal microtubule cytoskeleton by myelinating Schwann cells. *J Neurosci* 14(12): 7440.
- Kishi, M., T. Nakaya, Y. Nakamura, M. Kakinuma, T. A. Takahashi, S. Sekiguchi, M. Uchikawa, K. Tadokoro, K. Ikeda and K. Ikuta (1995).** Prevalence of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from blood donors. *Med Microbiol Immunol* 184(3): 135.
- Kohno, T., T. Goto, T. Takasaki, C. Morita, T. Nakaya, K. Ikuta, I. Kurane, K. Sano and M. Nakai (1999).** Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 73(1): 760.
- Korostishevsky, M., M. Kaganovich, A. Cholostoy, M. Ashkenazi, Y. Ratner, D. Dahary, J. Bernstein, U. Bening-Abu-Shach, E. Ben-Asher, D. Lancet, M. Ritsner and R. Navon (2004).** Is the G72/G30 locus associated with schizophrenia? single nucleotide polymorphisms, haplotypes, and gene expression analysis. *Biol Psychiatry* 56(3): 169.

- Kronevi, T., M. Nordstrom, W. Moreno and P. O. Nilsson (1974).** Feline ataxia due to non-suppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nord Vet Med* 26(12): 720.
- Krystal, J. H., D. C. D'Souza, D. Mathalon, E. Perry, A. Belger and R. Hoffman (2003).** NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)* 169(3-4): 215.
- Krystal, J. H., D. C. D'Souza, I. L. Petrakis, A. Belger, R. M. Berman, D. S. Charney, W. Abi-Saab and S. Madonick (1999).** NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders. *Harv Rev Psychiatry* 7(3): 125.
- Lang, U. E., I. Puls, D. J. Muller, N. Strutz-Seebohm and J. Gallinat (2007).** Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 20(6): 687.
- Lasek, R. J., L. Phillips, M. J. Katz and L. Autilio-Gambetti (1985).** Function and evolution of neurofilament proteins. *Ann N Y Acad Sci* 455: 462.
- Lees, J. F., P. S. Shneidman, S. F. Skuntz, M. J. Carden and R. A. Lazzarini (1988).** The structure and organization of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. *Embo J* 7(7): 1947.
- Levy, E., R. K. Liem, P. D'Eustachio and N. J. Cowan (1987).** Structure and evolutionary origin of the gene encoding mouse NF-M, the middle-molecular-mass neurofilament protein. *Eur J Biochem* 166(1): 71.
- Lewis, D. A. and P. Levitt (2002).** Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu Rev Neurosci* 25: 409.
- Li, D., D. A. Collier and L. He (2006).** Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (NRG1) gene with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 15(12): 1995.
- Lipkin, W. I., M. Hornig and T. Briese (2001).** Borna disease virus and neuropsychiatric disease--a reappraisal. *Trends Microbiol* 9(7): 295.
- Lipska, B. K., T. Peters, T. M. Hyde, N. Halim, C. Horowitz, S. Mitkus, C. S. Weickert, M. Matsumoto, A. Sawa, R. E. Straub, R. Vakkalanka, M. M. Herman, D. R. Weinberger and J. E. Kleinman (2006).** Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. *Hum Mol Genet* 15(8): 1245.

- Lodish, H., Berk A., Zipursky L.S., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000).** Cell motility and shape II: Microtubules and intermediate filaments. *Molecular Cell Biology*. Ed. F. W.H.
- Lord, C., E. H. Cook, B. L. Leventhal and D. G. Amaral (2000).** Autism spectrum disorders. *Neuron* 28(2): 355.
- Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi and J. Schlessinger (1992).** The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70(3): 431.
- Ludwig, H. (2006).** Nicht nur bei Pferden (spezies-übergreifende Bornavirus Infektionen) und nicht nur bei Reitern (Aktuelles zur Humaninfektion). *Grosstierpraxis* 8: 324.
- Ludwig, H. and L. Bode (2000).** Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev Sci Tech* 19(1): 259.
- Ludwig, H., L. Bode and G. Gosztanyi (1988).** Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol* 35: 107.
- Lundgren, A. L. (1992).** Feline non-suppurative meningoencephalomyelitis. A clinical and pathological study. *J Comp Pathol* 107(4): 411.
- Lundgren, A. L., G. Czech, L. Bode and H. Ludwig (1993).** Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *Zentralbl Veterinarmed B* 40(4): 298.
- Ma, L., Y. Liu, B. Ky, P. J. Shughrue, C. P. Austin and J. A. Morris (2002).** Cloning and characterization of Discl1, the mouse ortholog of DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia 1). *Genomics* 80(6): 662.
- MacDonald, J. I., E. A. Gryz, C. J. Kubu, J. M. Verdi and S. O. Meakin (2000).** Direct binding of the signaling adapter protein Grb2 to the activation loop tyrosines on the nerve growth factor receptor tyrosine kinase, TrkA. *J Biol Chem* 275(24): 18225.
- Mackie, S., J. K. Millar and D. J. Porteous (2007).** Role of DISC1 in neural development and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 17(1): 95.
- Malkinson, M., Y. Weisman, E. Ashash, L. Bode and H. Ludwig (1993).** Borna disease in ostriches. *Vet Rec* 133(12): 304.
- Menninger, K. A. (1994).** Influenza and schizophrenia. An analysis of post-influenzal "dementia precox," as of 1918, and five years later further studies of the psychiatric aspects of influenza. 1926. *Am J Psychiatry* 151(6 Suppl): 182.

- Miki, H., M. Setou, K. Kaneshiro and N. Hirokawa (2001).** All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7004.
- Millar, J. K., S. Christie, S. Anderson, D. Lawson, D. Hsiao-Wei Loh, R. S. Devon, B. Arveiler, W. J. Muir, D. H. Blackwood and D. J. Porteous (2001).** Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of Disrupted In Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6(2): 173.
- Millar, J. K., R. James, S. Christie and D. J. Porteous (2005a).** Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): subcellular targeting and induction of ring mitochondria. *Mol Cell Neurosci* 30(4): 477.
- Millar, J. K., B. S. Pickard, S. Mackie, R. James, S. Christie, S. R. Buchanan, M. P. Malloy, J. E. Chubb, E. Huston, G. S. Baillie, P. A. Thomson, E. V. Hill, N. J. Brandon, J. C. Rain, L. M. Camargo, P. J. Whiting, M. D. Houslay, D. H. Blackwood, W. J. Muir and D. J. Porteous (2005b).** DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* 310(5751): 1187.
- Millar, J. K., J. C. Wilson-Annan, S. Anderson, S. Christie, M. S. Taylor, C. A. Semple, R. S. Devon, D. M. Clair, W. J. Muir, D. H. Blackwood and D. J. Porteous (2000).** Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9(9): 1415.
- Miller, C. C., S. Ackerley, J. Brownlees, A. J. Grierson, N. J. Jacobsen and P. Thornhill (2002).** Axonal transport of neurofilaments in normal and disease states. *Cell Mol Life Sci* 59(2): 323.
- Miyamoto, S., A. S. LaMantia, G. E. Duncan, P. Sullivan, J. H. Gilmore and J. A. Lieberman (2003).** Recent advances in the neurobiology of schizophrenia. *Mol Interv* 3(1): 27.
- Miyoshi, K., A. Honda, K. Baba, M. Taniguchi, K. Oono, T. Fujita, S. Kuroda, T. Katayama and M. Tohyama (2003).** Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. *Mol Psychiatry* 8(7): 685.
- Morales, J. A. (1988).** Immunhistologische Verlaufsuntersuchungen über die Ausbreitung des Virus der Bornaschen Krankheit bei der Lewis-Ratte nach perinataler intrazerebraler Infektion. *Vet Red thesis Universität Giessen, Giessen, Germany.*

- Morales, J. A., S. Herzog, C. Kompter, K. Frese and R. Rott (1988).** Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med Microbiol Immunol* 177(2): 51.
- Morimoto, K., D. C. Hooper, A. Bornhorst, S. Corisdeo, M. Bette, Z. F. Fu, M. K. Schaffer, H. Koprowski, E. Weihe and B. Dietzschold (1996).** Intrinsic responses to Borna disease virus infection of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 13345.
- Morris, J. A., G. Kandpal, L. Ma and C. P. Austin (2003).** DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 12(13): 1591.
- Müller, N. and M. Schwarz (2006).** Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission. *Neurotox Res* 10(2): 131.
- Murdoch, H., S. Mackie, D. M. Collins, E. V. Hill, G. B. Bolger, E. Klussmann, D. J. Porteous, J. K. Millar and M. D. Houslay (2007).** Isoform-selective susceptibility of DISC1/phosphodiesterase-4 complexes to dissociation by elevated intracellular cAMP levels. *J Neurosci* 27(35): 9513.
- Myers, M. W., R. A. Lazzarini, V. M. Lee, W. W. Schlaepfer and D. L. Nelson (1987).** The human mid-size neurofilament subunit: a repeated protein sequence and the relationship of its gene to the intermediate filament gene family. *Embo J* 6(6): 1617.
- Na, K. S., S. H. Tae, J. W. Song and Y. K. Kim (2009).** Failure to detect borna disease virus antibody and RNA from peripheral blood mononuclear cells of psychiatric patients. *Psychiatry Investig* 6(4): 306.
- Nakagawa, T., J. Chen, Z. Zhang, Y. Kanai and N. Hirokawa (1995).** Two distinct functions of the carboxyl-terminal tail domain of NF-M upon neurofilament assembly: cross-bridge formation and longitudinal elongation of filaments. *J Cell Biol* 129(2): 411.
- Nakamura, Y., S. Asahi, T. Nakaya, M. K. Bahmani, S. Saitoh, K. Yasui, H. Mayama, K. Hagiwara, C. Ishihara and K. Ikuta (1996).** Demonstration of borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *J Clin Microbiol* 34(1): 188.

- Narayan, O., S. Herzog, K. Frese, H. Scheefers and R. Rott (1983).** Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis* 148(2): 305.
- Nauta, W. J. H., Feirtag, M. (1984).** Die Architektur des Gehirns. *Gehirn und Nervensystem, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg. Ed.*
- Naves, F. J., J. J. Huerta, O. Garcia-Suarez, N. Urdangaray, I. Esteban, M. E. Del Valle and J. A. Vega (1996).** Distribution of immunoreactivity for cytoskeletal (microtubule, microtubule-associated, and neurofilament) proteins in adult human dorsal root ganglia. *Anat Rec* 244(2): 246.
- Nguyen, M. D., T. Shu, K. Sanada, R. C. Lariviere, H. C. Tseng, S. K. Park, J. P. Julien and L. H. Tsai (2004).** A NUDEL-dependent mechanism of neurofilament assembly regulates the integrity of CNS neurons. *Nat Cell Biol* 6(7): 595.
- Niethammer, M., D. S. Smith, R. Ayala, J. Peng, J. Ko, M. S. Lee, M. Morabito and L. H. Tsai (2000).** NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* 28(3): 697.
- Nimnual, A. S., B. A. Yatsula and D. Bar-Sagi (1998).** Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science* 279(5350): 560.
- Norton, N., V. Moskvina, D. W. Morris, N. J. Bray, S. Zammit, N. M. Williams, H. J. Williams, A. C. Preece, S. Dwyer, J. C. Wilkinson, G. Spurlock, G. Kirov, P. Buckland, J. L. Waddington, M. Gill, A. P. Corvin, M. J. Owen and M. C. O'Donovan (2006).** Evidence that interaction between neuregulin 1 and its receptor erbB4 increases susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 141B(1): 96.
- Nöske, K., T. Bilzer, O. Planz and L. Stitz (1998).** Virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells eliminate borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol* 72(5): 4387.
- Ovanesov, M. V., K. Moldovan, K. Smith, M. W. Vogel and M. V. Pletnikov (2008).** Persistent Borna Disease Virus (BDV) infection activates microglia prior to a detectable loss of granule cells in the hippocampus. *J Neuroinflammation* 5: 16.
- Ozeki, Y., T. Tomoda, J. Kleiderlein, A. Kamiya, L. Bord, K. Fujii, M. Okawa, N. Yamada, M. E. Hatten, S. H. Snyder, C. A. Ross and A. Sawa (2003).** Disrupted-in-

- Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 289.
- Perez, M., A. Sanchez, B. Cubitt, D. Rosario and J. C. de la Torre (2003).** A reverse genetics system for Borna disease virus. *J Gen Virol* 84(Pt 11): 3099.
- Pernas-Alonso, P.-C. a. d. P. (1997).** Neurofilaments in cytoskeletal function and motoneuron disease. *Curr Topics Neurochem* 1: 157.
- Planz, O., T. Bilzer, M. Sobbe and L. Stitz (1993).** Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J Exp Med* 178(1): 163.
- Planz, O., T. Bilzer and L. Stitz (1995).** Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. *J Virol* 69(2): 896.
- Planz, O., S. Pleschka, K. Oesterle, F. Berberich-Siebelt, C. Ehrhardt, L. Stitz and S. Ludwig (2003).** Borna disease virus nucleoprotein interacts with the CDC2-cyclin B1 complex. *J Virol* 77(20): 11186.
- Planz, O. and L. Stitz (2005).** Role of Borna disease virus in neuropsychiatric disorders. *Neuropsychiatric Disorders and Infection Ed. S. H. Fatemi, Taylor & Francis*: 123.
- Pletnikov, M. V., T. H. Moran and K. M. Carbone (2002a).** Borna disease virus infection of the neonatal rat: developmental brain injury model of autism spectrum disorders. *Front Biosci* 7: d593.
- Pletnikov, M. V., S. A. Rubin, K. Vasudevan, T. H. Moran and K. M. Carbone (1999).** Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav Brain Res* 100(1-2): 43.
- Pletnikov, M. V., S. A. Rubin, M. W. Vogel, T. H. Moran and K. M. Carbone (2002b).** Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. II. Neurochemical alterations and responses to pharmacological treatments. *Brain Res* 944(1-2): 108.
- Pschyrembel (1993).** Pschyrembel Medizinisches Wörterbuch Vol. 257, p.1376.
- Puorger, M. E., M. Hilbe, J. P. Muller, J. Kolodziejek, N. Nowotny, K. Zlinszky and F. Ehrensperger (2010).** Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Vet Pathol* 47(2): 236.

- Raedler, T. J., M. B. Knable and D. R. Weinberger (1998).** Schizophrenia as a developmental disorder of the cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 8(1): 157.
- Raine, C. S., B. Cannella, A. M. Duijvestijn and A. H. Cross (1990).** Homing to central nervous system vasculature by antigen-specific lymphocytes. II. Lymphocyte/endothelial cell adhesion during the initial stages of autoimmune demyelination. *Lab Invest* 63(4): 476.
- Rao, M. V., J. Campbell, A. Yuan, A. Kumar, T. Gotow, Y. Uchiyama and R. A. Nixon (2003).** The neurofilament middle molecular mass subunit carboxyl-terminal tail domains is essential for the radial growth and cytoskeletal architecture of axons but not for regulating neurofilament transport rate. *J Cell Biol* 163(5): 1021.
- Rao, M. V., L. J. Engle, P. S. Mohan, A. Yuan, D. Qiu, A. Cataldo, L. Hassinger, S. Jacobsen, V. M. Lee, A. Andreadis, J. P. Julien, P. C. Bridgman and R. A. Nixon (2002).** Myosin Va binding to neurofilaments is essential for correct myosin Va distribution and transport and neurofilament density. *J Cell Biol* 159(2): 279.
- Rapin, I. and R. Katzman (1998).** Neurobiology of autism. *Ann Neurol* 43(1): 7.
- Reeves, N. A., C. R. Helps, D. A. Gunn-Moore, C. Blundell, P. L. Finnemore, G. R. Pearson and D. A. Harbour (1998).** Natural Borna disease virus infection in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 143(19): 523.
- Reynolds, G. P. and M. K. Harte (2007).** The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 2): 433.
- Richt, J. A., S. Herzog, K. Habertzettl and R. Rott (1993).** Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Med Microbiol Immunol* 182(6): 293.
- Richt, J. A. and R. Rott (2001).** Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Vet J* 161(1): 24.
- Richt, J. A., S. VandeWoude, M. C. Zink, J. E. Clements, S. Herzog, L. Stitz, R. Rott and O. Narayan (1992).** Infection with Borna disease virus: molecular and immunobiological characterization of the agent. *Clin Infect Dis* 14(6): 1240.
- Roberts, R. C. (2007).** Schizophrenia in translation: disrupted in schizophrenia (DISC1): integrating clinical and basic findings. *Schizophr Bull* 33(1): 11.

- Roberts, R. C., J. K. Roche and R. R. Conley (2005).** Synaptic differences in the patch matrix compartments of subjects with schizophrenia: a postmortem ultrastructural study of the striatum. *Neurobiol Dis* 20(2): 324.
- Rott, R. and H. Becht (1995).** Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 17.
- Rott, R., S. Herzog, B. Fleischer, A. Winokur, J. Amsterdam, W. Dyson and H. Koprowski (1985).** Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228(4700): 755.
- Roy, S., P. Coffee, G. Smith, R. K. Liem, S. T. Brady and M. M. Black (2000).** Neurofilaments are transported rapidly but intermittently in axons: implications for slow axonal transport. *J Neurosci* 20(18): 6849.
- Rubin, S. A., P. Sylves, M. Vogel, M. Pletnikov, T. H. Moran, G. J. Schwartz and K. M. Carbone (1999).** Borna disease virus-induced hippocampal dentate gyrus damage is associated with spatial learning and memory deficits. *Brain Res Bull* 48(1): 23.
- Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M. J. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris and S. Hirotsune (2000).** A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* 28(3): 681.
- Sauder, C. and J. C. de la Torre (1998).** Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology. *J Virol Methods* 71(2): 229.
- Sauder, C. and J. C. de la Torre (1999).** Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J Neuroimmunol* 96(1): 29.
- Sauder, C., A. Muller, B. Cubitt, J. Mayer, J. Steinmetz, W. Trabert, B. Ziegler, K. Wanke, N. Mueller-Lantzsch, J. C. de la Torre and F. A. Grasser (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(11): 7713.
- Sauder, C. and P. Staeheli (2003).** Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications. *J Virol* 77(23): 12886.
- Schepers, M. (2009).** Immunhistochemische Untersuchungen zur Myelinisierung und Rolle der Oligodendroglia im Gehirn nach neonataler aerogener Infektion von Lewis Ratten mit dem Borna Disease Virus. *Gießen, JLU, veterinärmed. Fak., Diss.*

- Schindler, A. R., A. Vogtlin, M. Hilbe, M. Puorger, K. Zlinszky, M. Ackermann and F. Ehrensperger (2007).** Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Mol Cell Probes* 21(1): 47.
- Schlaepfer, W. W. and J. Bruce (1990).** Simultaneous up-regulation of neurofilament proteins during the postnatal development of the rat nervous system. *J Neurosci Res* 25(1): 39.
- Schneider, U., M. Schwemmle and P. Staeheli (2005).** Genome trimming: a unique strategy for replication control employed by Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9): 3441.
- Schubert, S. N. (2003).** Evaluation des neuroprotektiven Effektes von Methylprednisolon bei cardiopulmonalem Bypass und Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie *Berlin Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität, Dissertation*
- Schurov, I. L., E. J. Handford, N. J. Brandon and P. J. Whiting (2004).** Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol Psychiatry* 9(12): 1100.
- Schwardt, M., D. Mayer, R. Frank, U. Schneider, M. Eickmann, O. Planz, T. Wolff and M. Schwemmle (2005).** The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *J Gen Virol* 86(Pt 11): 3163.
- Schwemmle, M., C. Jehle, S. Formella and P. Staeheli (1999).** Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin. *Lancet* 354(9194): 1973.
- Seeman, P. and S. Kapur (2000).** Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7673.
- Sekimata, M., K. Tsujimura, J. Tanaka, Y. Takeuchi, N. Inagaki and M. Inagaki (1996).** Detection of protein kinase activity specifically activated at metaphase-anaphase transition. *J Cell Biol* 132(4): 635.
- Shah, J. V., L. A. Flanagan, P. A. Janmey and J. F. Leterrier (2000).** Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin. *Mol Biol Cell* 11(10): 3495.
- Shaw (1991).** Neurofilament proteins. *The neuronal cytoskeleton. Ed. R. Burgoyne: 185.*
- Shenton, M. E., C. C. Dickey, M. Frumin and R. W. McCarley (2001).** A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* 49(1-2): 1.

- Shinoda, T., S. Taya, D. Tsuboi, T. Hikita, R. Matsuzawa, S. Kuroda, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (2007).** DISC1 regulates neurotrophin-induced axon elongation via interaction with Grb2. *J Neurosci* 27(1): 4.
- Shu, T., R. Ayala, M. D. Nguyen, Z. Xie, J. G. Gleeson and L. H. Tsai (2004).** Ndel1 operates in a common pathway with LIS1 and cytoplasmic dynein to regulate cortical neuronal positioning. *Neuron* 44(2): 263.
- Sierra-Honigmann, A. M., S. A. Rubin, M. G. Estafanous, R. H. Yolken and K. M. Carbone (1993).** Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J Neuroimmunol* 45(1-2): 31.
- Sihag, R. K., M. Inagaki, T. Yamaguchi, T. B. Shea and H. C. Pant (2007).** Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res* 313(10): 2098.
- Sihag, R. K. and R. A. Nixon (1991).** Identification of Ser-55 as a major protein kinase A phosphorylation site on the 70-kDa subunit of neurofilaments. Early turnover during axonal transport. *J Biol Chem* 266(28): 18861.
- Soares, J. C. and J. J. Mann (1997).** The anatomy of mood disorders--review of structural neuroimaging studies. *Biol Psychiatry* 41(1): 86.
- Sobbe, M., T. Bilzer, S. Gommel, K. Noske, O. Planz and L. Stitz (1997).** Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8+ T cells and perforin mRNA. *J Virol* 71(3): 2400.
- Sollmann, D. (2007).** Charakterisierung der BDV-Infektion bei neugeborenen-aerogen-infizierten Ratten mittels immunhistochemischer Methoden. *Gießen, JLU, veterinärmed. Fak., Diss.*
- Sorg, I. and A. Metzler (1995).** Detection of Borna disease virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissues by nested PCR. *J Clin Microbiol* 33(4): 821.
- Sprankel, H., K. Richarz, H. Ludwig and R. Rott (1978).** Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol* 165(1): 1.
- St Clair, D., D. Blackwood, W. Muir, A. Carothers, M. Walker, G. Spowart, C. Gosden and H. J. Evans (1990).** Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 336(8706): 13.

- Staheli, P., C. Sauder, J. Hausmann, F. Ehrensperger and M. Schwemmler (2000).** Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol* 81(Pt 9): 2123.
- Starr, R., B. Attema, G. H. DeVries and M. J. Monteiro (1996).** Neurofilament phosphorylation is modulated by myelination. *J Neurosci Res* 44(4): 328.
- Steen, R. G., C. Mull, R. McClure, R. M. Hamer and J. A. Lieberman (2006).** Brain volume in first-episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 188: 510.
- Stitz, L., T. Bilzer and O. Planz (2002).** The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Front Biosci* 7: d541.
- Stitz, L., T. Bilzer, J. A. Richt and R. Rott (1993).** Pathogenesis of Borna disease. *Arch Virol Suppl* 7: 135.
- Stitz, L., B. Dietzschold and K. M. Carbone (1995).** Immunopathogenesis of Borna disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 75.
- Stitz, L., H. Krey and H. Ludwig (1981).** Borna disease in rhesus monkeys as a model for uveo-cerebral symptoms. *J Med Virol* 6(4): 333.
- Stitz, L., K. Nöske, O. Planz, E. Furrer, W. I. Lipkin and T. Bilzer (1998).** A functional role for neutralizing antibodies in Borna disease: influence on virus tropism outside the central nervous system. *J Virol* 72(11): 8884.
- Stitz, L., O. Planz, T. Bilzer, K. Frei and A. Fontana (1991a).** Transforming growth factor-beta modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus. Pathogenic importance of CD8<sup>+</sup> cells and suppression of antibody formation. *J Immunol* 147(10): 3581.
- Stitz, L., D. Schilken and K. Frese (1991b).** Atypical dissemination of the highly neurotropic Borna disease virus during persistent infection in cyclosporine A-treated, immunosuppressed rats. *J Virol* 65(1): 457.
- Stitz, L., D. Soeder, U. Deschl, K. Frese and R. Rott (1989).** Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *J Immunol* 143(12): 4250.
- Sullivan, P. F., K. S. Kendler and M. C. Neale (2003).** Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60(12): 1187.
- Sweeney, K. J., A. Prokscha and G. Eichele (2001).** NudE-L, a novel Lis1-interacting protein, belongs to a family of vertebrate coiled-coil proteins. *Mech Dev* 101(1-2): 21.

- Takenawa, T., H. Miki and K. Matuoka (1998).** Signaling through Grb2/Ash-control of the Ras pathway and cytoskeleton. *Curr Top Microbiol Immunol* 228: 325.
- Taya, S., T. Shinoda, D. Tsuboi, J. Asaki, K. Nagai, T. Hikita, S. Kuroda, K. Kuroda, M. Shimizu, S. Hirotsune, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (2007).** DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. *J Neurosci* 27(1): 15.
- Taylor, M. S., R. S. Devon, J. K. Millar and D. J. Porteous (2003).** Evolutionary constraints on the Disrupted in Schizophrenia locus. *Genomics* 81(1): 67.
- Torrey, E. F., J. J. Bartko, Z. R. Lun and R. H. Yolken (2007).** Antibodies to Toxoplasma gondii in patients with schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Bull* 33(3): 729.
- Toyo-oka, K., A. Shionoya, M. J. Gambello, C. Cardoso, R. Leventer, H. L. Ward, R. Ayala, L. H. Tsai, W. Dobyns, D. Ledbetter, S. Hirotsune and A. Wynshaw-Boris (2003).** 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet* 34(3): 274.
- Tsai, L. H. and J. G. Gleeson (2005).** Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron* 46(3): 383.
- Tsujimura, K., M. Ogawara, Y. Takeuchi, S. Imajoh-Ohmi, M. H. Ha and M. Inagaki (1994).** Visualization and function of vimentin phosphorylation by cdc2 kinase during mitosis. *J Biol Chem* 269(49): 31097.
- Vahlenkamp, T. W., H. K. Enbergs and H. Muller (2000).** Experimental and natural borna disease virus infections: presence of viral RNA in cells of the peripheral blood. *Vet Microbiol* 76(3): 229.
- Vale, R. D., T. S. Reese and M. P. Sheetz (1985).** Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42(1): 39.
- Vikstrom, K. L., S. S. Lim, R. D. Goldman and G. G. Borisy (1992).** Steady state dynamics of intermediate filament networks. *J Cell Biol* 118(1): 121.
- Waltrip, R. W., 2nd, R. W. Buchanan, A. Summerfelt, A. Breier, W. T. Carpenter, Jr., N. L. Bryant, S. A. Rubin and K. M. Carbone (1995).** Borna disease virus and schizophrenia. *Psychiatry Res* 56(1): 33.
- Wang, L., C. L. Ho, D. Sun, R. K. Liem and A. Brown (2000).** Rapid movement of axonal neurofilaments interrupted by prolonged pauses. *Nat Cell Biol* 2(3): 137.

- Waterman-Storer, C. M., S. B. Karki, S. A. Kuznetsov, J. S. Tabb, D. G. Weiss, G. M. Langford and E. L. Holzbaur (1997).** The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(22): 12180.
- Weissenböck, H., M. Hornig, W. F. Hickey and W. I. Lipkin (2000).** Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain Pathol* 10(2): 260.
- Weissenböck, H., N. Nowotny, P. Caplazi, J. Kolodziejek and F. Ehrensperger (1998).** Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol* 36(7): 2127.
- Wekerle, H., D. Sun, R. L. Oropeza-Wekerle and R. Meyermann (1987).** Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol* 132: 43.
- Wensman, J. J., P. Thoren, M. Hakhverdyan, S. Belak and M. Berg (2007).** Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus. *J Virol Methods* 143(1): 1.
- Williams, B. L. and W. I. Lipkin (2006).** Endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration in rats neonatally infected with borna disease virus. *J Virol* 80(17): 8613.
- Wong, G. H., P. F. Bartlett, I. Clark-Lewis, J. L. McKimm-Breschkin and J. W. Schrader (1985).** Interferon-gamma induces the expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *J Neuroimmunol* 7(5-6): 255.
- Yabe, J. T., A. Pimenta and T. B. Shea (1999).** Kinesin-mediated transport of neurofilament protein oligomers in growing axons. *J Cell Sci* 112 (Pt 21): 3799.
- Yamaguchi, K., T. Sawada, T. Naraki, R. Igata-Yi, H. Shiraki, Y. Horii, T. Ishii, K. Ikeda, N. Asou, H. Okabe, M. Mochizuki, K. Takahashi, S. Yamada, K. Kubo, S. Yashiki, R. W. Waltrip, 2nd and K. M. Carbone (1999).** Detection of borna disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 6(5): 696.
- Yudofsky, S. C. (2009).** Contracting schizophrenia: lessons from the influenza epidemic of 1918-1919. *Jama* 301(3): 324.
- Zhang, J., S. Li, R. Fischer and X. Xiang (2003).** Accumulation of cytoplasmic dynein and dynactin at microtubule plus ends in *Aspergillus nidulans* is kinesin dependent. *Mol Biol Cell* 14(4): 1479.

- Zhu, Q., S. Couillard-Despres and J. P. Julien (1997).** Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol* 148(1): 299.
- Zocher, M., S. Czub, J. Schulte-Monting, J. C. de La Torre and C. Sauder (2000).** Alterations in neurotrophin and neurotrophin receptor gene expression patterns in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *J Neurovirol* 6(6): 462.
- Zwick (1939).** Borna'sche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere. *Handbuch der Viruskrankheiten*. Ed. H. E. Gildemeister E, Waldmann O., Gildemeister E, Haagen E, Waldmann O., 2: pp. 254.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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 zur Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Kira Gehrke