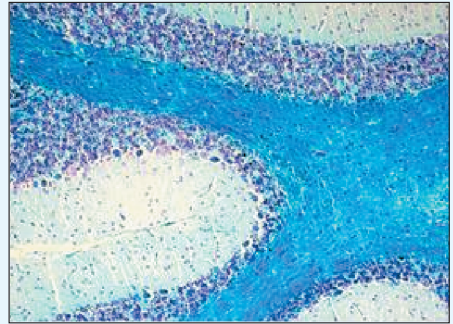
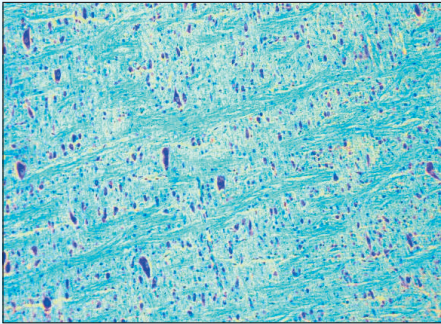


**NEUROPATHOLOGISCHE LANGZEITVERÄNDERUNGEN
IM GEHIRN VON LEWIS-RATTEN
NACH NEONATALER AEROSOL-INFEKTION
MIT DEM BORNA-DISEASE-VIRUS**

KAROLINE KRAUTZ



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2015

© 2015 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,
Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-239-1

Verlag: DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen und dem Institut für Immunologie des
Friedrich-Loeffler-Instituts Greifswald/Insel Riems

Betreuer: Prof. Dr. Lothar Stitz

und

dem Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Bilzer

**NEUROPATHOLOGISCHE LANGZEITVERÄNDERUNGEN IM GEHIRN
VON LEWIS-RATTEN NACH NEONATALER AEROSOL-INFEKTION
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

Karoline Krautz

Tierärztin aus Cottbus

Gießen 2015

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

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Lothar Stitz

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Bilzer

Prüferin: Prof. Dr. Christiane Herden

Tag der Disputation: 20.01.2015

*Meinen Eltern
und
in Gedenken an Gabi*

Was wirklich zählt, ist Intuition.

Albert Einstein
(1879 – 1955)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGENIV

1. EINLEITUNG..... 1

2. LITERATURÜBERSICHT 4

2.1. Historische Aspekte der Borna Disease 4

2.2. Epidemiologie 5

2.3. Das Borna-Disease-Virus 7

 2.3.1. Allgemeine Eigenschaften..... 7

 2.3.2. Das BDV-Genom 8

 2.3.3. Persistenz..... 10

2.4. BDV-Infektion 11

 2.4.1. Natürliche BDV-Infektion beim Tier 11

 2.4.2. Differenzialdiagnosen 12

 2.4.3. BDV-Infektion beim Menschen 12

 2.4.4. Tier-Modelle..... 15

 2.4.4.1. Das Ratten-Modell..... 16

 2.4.4.1.1. Die adult-infizierte Ratte 16

 2.4.4.1.2. Die neonatal-infizierte Ratte..... 17

 2.4.4.2. Das Maus-Modell 18

 2.4.4.3. Das Gerbil-Modell 19

2.5. Gliazellen 20

 2.5.1. Astrozyten 21

 2.5.2. Oligodendrozyten 23

 2.5.3. Mikroglia..... 26

2.6. Virale Einflüsse auf Gliazellen..... 27

3. MATERIAL UND METHODEN	29
3.1. Material	29
3.1.1. Versuchstiere	29
3.1.2. Virus	29
3.1.3. Antikörper	29
3.1.4. Lösungen, Chemikalien und Puffer	30
3.1.4.1. Alkoholreihe	30
3.1.4.2. Standardfärbung	30
3.1.4.3. Spezialfärbungen	30
3.1.4.4. Immunhistochemische Färbungen	31
3.1.4.5. Eindeckmittel	31
3.1.5. Gebrauchsmaterial und Geräte	32
3.2. Methoden	33
3.2.1. Infektion	33
3.2.2. Probenentnahme	33
3.2.3. Aufarbeitung der Gehirne	33
3.2.3.1. Paraffin-Einbettung	33
3.2.3.2. Ausgießen und Aufblocken	34
3.2.3.3. Paraffinschnitte	34
3.2.4. Vor- und Nachbereitung der Färbungen	34
3.2.4.1. Entparaffinieren	34
3.2.4.2. Entwässern	35
3.2.4.3. Eindecken	35
3.2.5. Standardfärbung (Hämatoxylin-Eosin-/HE-Färbung)	35
3.2.6. Spezialfärbungen	36
3.2.6.1. Kresylviolett-/KV-/Nissl-Färbung	36
3.2.6.2. Luxol-Fast-Blue-/LFB-Färbung (Kombinierte Zell- und Markscheidenfärbung nach Klüber-Barrera)	37
3.2.7. Immunhistochemische Färbungen	38
3.2.7.1. BDV-Nukleoprotein (p38)	39
3.2.7.2. Saures Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein/GFAP)	40
3.2.7.3. Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor (Olig2)	41
3.2.7.4. Ionized Calcium-binding Adapter Molecule 1 (Iba1)	42
3.2.8. Zelluläre Quantifizierungen	43

4. ERGEBNISSE.....	45
4.1. Standardfärbung (HE-Färbung).....	48
4.2. Spezialfärbungen.....	52
4.2.1. Neuronen (KV-Färbung).....	52
4.2.2. Neuronen und Markscheiden (LFB-Färbung).....	60
4.3. Immunhistochemische Färbungen.....	64
4.3.1. BDV-Antigen (p38).....	64
4.3.2. Astrozyten (GFAP).....	69
4.3.3. Oligodendrozyten (Olig2).....	73
4.3.4. Mikroglia/Makrophagen (Iba1).....	77
5. DISKUSSION	82
5.1. Neuronale Degeneration im Hippocampus und Kleinhirn.....	82
5.1.1. Infektionsausbreitung im ZNS	82
5.1.2. Virale Strategie und biologischer Sinn.....	84
5.2. Was war zuerst da: die Axonopathie oder die Myelinopathie?.....	86
5.2.1. Interaktion von Neuronen und Oligodendrozyten bei BDV-Infektion.....	86
5.2.2. Oligodendrogliale Störungen als Ursache neurodegenerativer Krankheiten	89
5.3. Korrelation von Gliosen und BDV-Persistenz	90
6. ZUSAMMENFASSUNG	91
7. SUMMARY	93
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	95
9. ANHANG	120
10. PUBLIKATION.....	136
11. ERKLÄRUNG.....	137
12. DANKSAGUNG.....	138

ABKÜRZUNGEN

A	Aquaeductus mesencephali
aa	Amino Acid, Aminosäuren
Abb.	Abbildung
ABV	aviäres Bornavirus
AG	Antigen
AIF-1	Allograft Inflammatory Factor-1
AK	Antikörper
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Astrozyten
BD	Borna Disease
BDV	Borna-Disease-Virus
BEFV	Bovine Ephemeral Fever Virus
BNYV	Broccoli Necrotic Yellows Virus
BPIV-3	Bovines Parainfluenzavirus-3
BRSV	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
β2M	β2-Mikroglobulin
CA	Cornu ammonis, Ammonshorn
Cc	Corpus callosum
CD	Cluster of differentiation
CDC2/CDK1	Cyclin-abhängige Kinase
CIC	Circulating Immune Complexes, zirkulierende Immunkomplexe
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
deg	degeneriert
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECLIA	Electrochemiluminescence Immunoassay
EHV-1	Equines Herpes Virus-1
EIA	Equine infektiöse Anämie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie

ABKÜRZUNGEN

ffu	Focus Forming Units
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
G	Glykoprotein des BDV
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gd	Gyrus dentatus
ges	gesamt
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, Saures Gliafaserprotein
GZ	Gliazellen
G2	postsynthetische/prämitotische Phase im Zellzyklus
Hc	Hippocampus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus
HPF	high-power field, Hauptgesichtsfeld
HPIV-1	Humanes Parainfluenzavirus-1
Iba1	Ionized Calcium-binding Adapter Molecule 1
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IFA	Immunfluoreszenz-Analyse
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IHNV	Infektiöse Hämatopoetische Nekrose-Virus
IL	Interleukin
K	Kortex
k. A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
kDa	kilo Dalton
KHM	Kleinhirnmarch
Kör	Körnerzellschicht des Kleinhirns
KV	Kresylviolett
L	Polymerase des BDV
LFB	Luxol-Fast-Blue, Zell- und Markscheidenfärbung
LNyV	Lettuce Necrotic Yellows Virus
M	Matrixprotein des BDV
M.	Morbus
m	männlich
MDCK	Madin-Darby canine kidney

ABKÜRZUNGEN

MG	Mikroglia
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MHV	Maus-Hepatitis-Virus
Mol	Molekularschicht des Kleinhirns
Mon.	Monate
N	Nukleoprotein des BDV, p38
n. a.	nicht auswertbar
NBAE	newborn aerosol infected
NF-H	schwere Neurofilament-Untereinheit („heavy“)
NF-L	leichte Neurofilament-Untereinheit („light“)
NF-M	mittlere Neurofilament-Untereinheit („medium“)
NK	natürliche Killerzellen
Olig2	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor
OPC	Oligodendrocyte Precursor Cell, Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
ORF	Open Reading Frame, offener Leserahmen
OT	Objektträger
OZ	Oligodendrozyten
P	Phosphoprotein des BDV
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDD	Proventricular Dilatation Disease
p. i.	post infectionem, „nach einer Infektion“
p. p.	post partum, „nach der Geburt“
PTI-NB	persistente, tolerante Infektion Neugeborener
PYDV	Potato Yellow Dwarf Virus
PZ	Purkinjezellen
qRT-PCR	Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAS	Supervisory Attentional System
SeV	Sendai Virus
Tab.	Tabelle
TBST-20X	Tris Buffered Saline with Tween 20, Tween-Waschpuffer

ABKÜRZUNGEN

TRTV	Turkey Rhinotracheitis Virus
V	Ventrikel
VSIV	Vesicular Stomatitis Indiana Virus
w	weiblich
X	Nichtstrukturprotein des BDV
ZEBOV	Zaire-Ebolavirus
ZNS	Zentrales Nervensystem
+	positiv
-	keine Veränderung bzw. p38-negativ

1. EINLEITUNG

Im Jahre 1985 gab es erste serologische Hinweise darauf, dass das Borna-Disease-Virus (BDV) ein mögliches, ätiologisches Agens für neuropsychiatrische Krankheiten sein könnte (ROTT et al., 1985). In den folgenden Jahren wurden international vermehrt in-vivo-Studien an Labortieren und psychiatrischen Patienten, u. a. mit Schizophrenie, durchgeführt. Der Krankheitswert des BDV als Erreger psychiatrischer Krankheiten des Menschen ist nach wie vor umstritten (BODE et al., 1988, CHALMERS et al., 2005, HORNIG et al., 2012).

Das Nager-Modell bietet aufgrund der hohen Empfänglichkeit der Tiere gegenüber dem BDV eine hervorragende Möglichkeit, den Virus-assoziierten Mechanismus der Pathogenese der Borna Disease (BD) zu untersuchen. So findet z. B. das Ratten-Modell Verwendung bei der Untersuchung von humanen, neurologischen Dysfunktionen wie Autismus (BRIESE et al., 1999, PLETNIKOV et al., 1999b, HORNIG et al., 2001, SOLBRIG, 2010).

Das BDV ist ein behülltes, nicht-segmentiertes, einsträngiges RNA-Virus mit negativer Polarität. Es stellt eines der am strengsten neurotrophen Viren dar und zeichnet sich durch besondere Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Bedingungen in neuronalem Gewebe aus (BRIESE et al., 1994, CUBITT et al., 1994). Besondere Eigenschaften zeigen sich vor allem in einer starken Affinität zu Neuronen der Hippocampus-Formation und einer hohen Konservierung des BDV-Genoms (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984, GOSZTONYI et al., 1993, SCHNEIDER et al., 1994, GOSZTONYI und LUDWIG, 1995, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997). Neuere Beobachtungen aus Fernost beweisen allerdings Evidenzen für eine BDV-Variante, die möglicherweise schon über lange Zeit Bestandteil des humanen Genoms ist (LI et al., 2013). Aus den nicht-zytolytischen Eigenschaften und dem sehr langsamen Replikationszyklus resultiert eine persistierende Virusinfektion (HIRANO et al., 1983, LUDWIG et al., 1988, RICHT et al., 1992).

Hinsichtlich seiner speziellen Eigenschaften repräsentiert das BDV innerhalb der Ordnung Mononegavirales den Prototypen einer neuen Virusfamilie, der Bornaviridae (PRINGLE, 1996, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997).

Gegenwärtig ist bekannt, dass das natürliche und experimentelle Wirtsspektrum des BDV neben Pferden und Schafen zahlreiche weitere Säugetier- und Vogel-Spezies umfasst (CERVOS-NAVARRO et al., 1981, CAPLAZI et al., 1994, HAGIWARA et al., 1996, WEISSENBOCK et al., 1998a, BERG et al., 2001). Insbesondere bei Pferden und Schafen kann eine natürliche Infektion mit dem BDV sowohl einen subklinischen Verlauf nehmen als auch eine progressiv verlaufende Meningopolyenzephalomyelitis nach sich ziehen (ZWICK, 1939, HEINIG, 1969, ROTT und BECHT, 1995).

Die Borna-Enzephalitis, die in dieser Form u. a. auch bei adult-infizierten Ratten vorkommt, ist überwiegend durch immunpathologische Vorgänge charakterisiert. Im Vordergrund stehen lymphozytäre Infiltrate. Während diese überwiegend aus CD4⁺ T-Effektorzellen bzw. T-Helferzellen bestehen, sind im neuronalen Parenchym zytotoxische CD8⁺ T-Zellen zu finden. Diese führen zu zellulären Degenerationen in der akuten Krankheitsphase und zu kortikaler Atrophie in der chronischen Phase (BILZER und STITZ, 1994, BILZER et al., 1995, STITZ et al., 2002).

Im Gegensatz dazu verläuft eine experimentelle Infektion neonataler immuninkompetenter Lewis-Ratten ohne wesentliche Entzündungsreaktionen. Demzufolge ist sie für die Erforschung von direkten Viruswirkungen und Persistenzmechanismen besonders geeignet (HIRANO et al., 1983, GONZALEZ-DUNIA et al., 2005).

Die in der hier vorliegenden Studie gewählte aerogene Infektion neonataler Ratten (newborn aerosol infected, NBAE) ist ein minimal-invasives Verfahren, das der natürlichen Infektion vermutlich sehr nahe kommt. Folgen mechanischer Schädigung wie bei der intrazerebralen Infektion sind nicht vorhanden, da der Kontakt des Virus mit dem peripheren Blut und die nachfolgende Immunisierung vermieden werden.

In den bisherigen Arbeiten dieser Studie ließ sich - in Abwesenheit einer spezifischen Immunantwort - das BDV-Protein in Neuronen und Gliazellen aller Gehirnregionen nachweisen. Zusätzlich waren neuronale Degenerationen, eine verminderte Purkinjezell-Dichte sowie Gliosen auffällig (SOLLMANN, 2007, SCHEPERS, 2009, GEHRKE, 2011). In dem NBAE-Modell traten außerdem Veränderungen der Neurofilamente auf (GEHRKE, 2011).

Störungen der Neurofilamente können u. a. durch eine fehlerhafte Myelinisierung verursacht werden, da diese die Phosphorylierung und Expression von intraaxonalen Neurofilamenten reguliert. Gleichzeitig ist sie von essenzieller Bedeutung für die zytoplasmatische Organisation und das Dickenwachstum von myelinisierten Axonen (STARR et al., 1996, GOTOW et al., 1999).

Alterationen der Neurofilamente, wie Phosphorylierung, Mutation und Oxidation, spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus (M.) Alzheimer (STERNBERGER et al., 1985), M. Parkinson (TROJANOWSKI und LEE, 1998), M. Charcot-Marie-Tooth (ZHAI et al., 2007) und amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (MANETTO et al., 1988, MURAYAMA et al., 1992). Exemplarisch ist die ALS eine progressiv neurodegenerative Krankheit mit unbekannter Ätiologie. Charakteristisch ist der Verlust zahlreicher großer Motorneurone in Rückenmark, Stammhirn und motorischem Kortex. Als pathogenetischer Faktor wird die Akkumulation der schweren Neurofilament-

Untereinheit (NF-H) im neuronalen Perikaryon diskutiert (ROWLAND und SHNEIDER, 2001, MENDONCA et al., 2005). Fraglich ist, ob Viren die Fähigkeit besitzen, derartige Veränderungen in Neurofilamenten zu verursachen.

Epidemiologische Studien zeigen, dass Virusinfektionen zu neurodegenerativen Erkrankungen des Menschen beitragen können. Ein entsprechendes Beispiel ist die Influenza-Pandemie im Jahre 1957. Kontrovers wird diskutiert, ob eine maternale Influenza-Infektion während der späten Schwangerschaft das Risiko für das Auftreten von Schizophrenie beim Kind erhöht (MEDNICK et al., 1988, O'CALLAGHAN et al., 1991).

In der hier durchgeführten Studie wurden neben Neuronen, den Hauptzielzellen des BDV, im Laufe der Infektion weitere Zelltypen infiziert. Oligodendrozyten, die bei adult-infizierten Ratten kaum betroffen sind (BILZER und STITZ, 1993), zeigten beispielsweise Veränderungen in Morphologie und Verteilung innerhalb des Gehirns. Die nachgewiesene Dysmyelinisierung ist möglicherweise eine Folge von Funktionsstörungen der Oligodendrozyten (SCHEPERS, 2009). In diesem Zusammenhang spielen auch Funktion und Wirkung der Mikroglia eine tragende Rolle, die in NBAE-Ratten-Gehirnen bislang nicht ausreichend untersucht wurden. Bekannt ist jedoch, dass die Aktivierung der Mikroglia in Verbindung mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine z. B. Purkinjezellen schädigen kann (OVANESOV et al., 2006, KAUR et al., 2012).

In der NBAE-Studie wurden bisher im Wesentlichen Tiere bis zu einem Alter von etwa sechs Monaten untersucht. Fokus dieser Arbeit sind neuropathologische Langzeitveränderungen bis zu einem Alter von zwei Jahren. Mittels semiquantitativer Untersuchungen wird verdeutlicht, wie sich verschiedene Zellpopulationen, darunter Purkinjezellen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Mikroglia, während des Alterungsprozesses sowie im Laufe der persistenten BDV-Infektion verhalten. Nach wie vor bleibt die genaue Bedeutung des Myelins als Bestandteil der weißen Substanz innerhalb der BDV-Wirt-Wechselbeziehung in Abwesenheit immunpathologischer Einflüsse ungeklärt. Es wird diskutiert, ob Entzündungsreaktionen während des Verlaufs der BD einen gewissen protektiven Effekt auf die weiße Substanz ausüben, der bei der Infektion immuninkompetenter Tiere ausbleibt. In diesem Zusammenhang stellt sich weiterhin die Frage nach Ursache und Wirkung von Axonopathie und Myelinopathie.

Diese Untersuchungen und Überlegungen sollen zum Verständnis der komplexen Zusammenhänge der BDV-assoziierten Neuropathogenese beitragen.

Der NBAE-Versuch wurde im Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Stitz durchgeführt.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Historische Aspekte der Borna Disease

„Das Pferd ist anfänglich traurig und versaget sein Futter; es läßt den Kopf und die Ohren hängen, hat Hitze und Schleim im Maul, trübe und wässrige Augen; wanket im Gehen hin und her, als ob es schwindlig wäre; [...] drückt den Kopf gegen die Mauer, [...] endlich fällt es in convulsive Bewegungen, woran es meistens das Leben lässet.“

So beschrieb von Sind 1767 in seinem Buch „Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt [...]“ im Kapitel „Von Krankheiten des Hauptes überhaupt“ erstmals die Symptome der „Kopfkrankheit“ bei Pferden (VON SIND, 1767). In anderen „Pferdeheilmbüchern“ wurde ebenfalls von ähnlichen Krankheitszeichen berichtet. Galiberti erwähnte bereits im Jahre 1660 derartige klinischen Auffälligkeiten (GALIBERTI, 1660).

Im 19. Jahrhundert war die Rede von einer „hitzen Kopfkrankheit“ oder „Dummkoller der Pferde“, die zwei Drittel des Pferdebestandes auf der Schwäbischen Alb im Südwesten Deutschlands sterben ließ (AUTENRIETH, 1823).

Wörz vermutete 1858, dass „die halb-acute Gehirn-Entzündung oder Kopf-Krankheit der Pferde“ vererblich sei, vorrangig im Frühling beobachtet werde und sich von Jahr zu Jahr in unterschiedlicher Stärke ereigne (WÖRZ, 1858).

In den Königreichen Bayern und Württemberg sprach man von „subacuter Gehirnentzündung“ (ZANGER, 1863, FRIEDBERGER und FRÖHNER, 1896).

In vielen Veröffentlichungen fanden sich Synonyme wie „Encephalitis et Myelitis enzootica equi“, „Encephalomyelitis enzootica“, „epidemische Genickstarre“, „Genickkrampf“, „Hirnwuth“, „Meningitis cerebrospinalis enzootica“, „Meningitis subacuta cerebrospinalis“, „Meningoencephalomyelitis simplex enzootica equorum“, „Nervenkrankheit“, „Polioencephalomyelitis non purulenta infectiosa“ und „Schlafsucht“.

Diese Gehirn- und Rückenmarksentzündung der Pferde trat im Jahre 1879 in der sächsischen Region um Auerbach, Plauen, Zwickau und im sächsischen oberen Vogtland auf (DÜRRWALD und LUDWIG, 1997).

Entsprechend der „Berichte über das Veterinärwesen im Königreich Sachsen“ gab es zusätzlich lokale Krankheitsfälle vor allem bei Kavalleriepferden in der „Amtshauptmannschaft Borna“, einer Region in der Nähe von Leipzig gelegen und als Endemiegebiet angesehen (WALTHER, 1899).

In der Berliner tierärztlichen Wochenzeitschrift berichteten Tierarzt Kohl und „Oberroßarzt“ Gensert von der Meningitis cerebrospinalis als „Borna'sche Krankheit“ (GENSERT, 1896, KOHL, 1896). Nach wissenschaftlicher Verwendung dieses Namens im 20. Jahrhundert

etablierte sich die englische Übersetzung: Borna Disease (DANNER und MAYR, 1973, LUDWIG et al., 1973).

Erste wissenschaftliche Erkenntnisse über Symptomatik und mögliche Ursachen erlangte man um das Jahr 1900 (SIEDAMGROTZKY und SCHLEGEL, 1896, DEXLER, 1900, JOEST und DEGEN, 1909a).

2.2. Epidemiologie

Die BD ist seit vielen Jahrzehnten als progressive Meningopolioenzephalomyelitis hauptsächlich bei Pferden und Schafen bestimmter endemischer Gebiete in Zentraleuropa bekannt (LUDWIG et al., 1985, GRABNER und FISCHER, 1991). Zu den ursprünglichen Endemiegebieten gehören Baden-Württemberg, Bayern, Hessen, Sachsen, Sachsen-Anhalt und Thüringen sowie das obere Rheintal zwischen dem Fürstentum Liechtenstein, Österreich und der Schweiz (ROTT und BECHT, 1995, RICHT et al., 1997, WEISSENBOCK et al., 1998b, CAPLAZI et al., 1999). Inzwischen weiß man, dass das geographische Vorkommen des BDV weitaus größer ist, als angenommen.

Außerhalb von Zentraleuropa gibt es Virus- bzw. Antikörper (AK)-Nachweise, u. a. in China (HAGIWARA et al., 2001), Finnland (KINNUNEN et al., 2007), Frankreich (GALABRU et al., 2000), Großbritannien (REEVES et al., 1998), Japan (HAGIWARA et al., 1996, OKAMOTO et al., 2002), im Iran (BAHMANI et al., 1996), in Israel (MALKINSON et al., 1995), Schweden (LUNDGREN et al., 1993), in der Türkei (HELPS et al., 2001, YILMAZ et al., 2002, YESILBAG et al., 2012) und in den USA (KAO et al., 1993).

Diese Angaben stammen allerdings aus Prävalenzstudien, die das Vorkommen des BDV bestätigen, nicht aber in jedem Falle die klinische Symptomatik.

Beobachtungen der BD außerhalb der endemischen Gebiete sind selten. Beschreibungen bei Pferden stammen aus Japan (HAGIWARA et al., 2000, TANIYAMA et al., 2001, WEISSENBOCK et al., 2002) und Schweden (BERG et al., 1999). Zudem wird über die BD bei domestizierten Katzen (NAKAMURA et al., 1999b) und einem Hund in Japan berichtet (OKAMOTO et al., 2002).

Das Wirtsspektrum ist ebenfalls weitaus breiter als vermutet. Fast alle Tierarten, inklusive Primaten, sind experimentell infizierbar (STITZ et al., 1981, LUDWIG et al., 1988, ROTT und BECHT, 1995). Unter den Säugetieren gelten neben Pferden und Schafen sowohl Hunde (WEISSENBOCK et al., 1998a), Kaninchen (METZLER et al., 1978), Katzen (LUNDGREN et al., 1993, BERG und BERG, 1998, REEVES et al., 1998), Rinder (CAPLAZI et al., 1994, HAGIWARA et al., 1996), Ziegen (CAPLAZI et al., 1999) als auch Wildtiere wie Füchse

(DAUPHIN et al., 2001) und Luchse (DEGIORGIS et al., 2000), außerdem Zootiere wie Affen, Alpakas, Faultiere, Flusspferde und Lamas (SCHÜPPEL et al., 1994, ROTT und BECHT, 1995, SCHÜPPEL et al., 1995, JACOBSEN et al., 2010) als empfänglich. Daneben wurde das BDV aus wildlebenden Vögeln isoliert (BERG et al., 2001).

In einer israelischen Straußenfarm gab es Fälle von BDV-induzierten Paralyse (MALKINSON et al., 1995). Vor einigen Jahren brachte man das Krankheitsbild der neurogenen Drüsenmagendilatation (Proventricular Dilatation Disease, PDD) bei Psittaziden mit einer anderen BDV-Variante, dem aviären Bornavirus (ABV) in Verbindung (HONKAVUORI et al., 2008). Nach wie vor gibt es Untersuchungen, die diese Annahme unterstützen (PIEPENBRING et al., 2012, HEFFELS-REDMANN et al., 2012, NEDOROST et al., 2012).

Welche Tiere das BDV latent ausscheiden und wie die Übertragung detailliert abläuft, ließ sich bislang nur unvollständig klären. Aufgrund der Virus-Ausscheidung über Nasensekret, Speichel, Urin und Faeces werden Füchse (DAUPHIN et al., 2001), Nagetiere (SIERRA-HONIGMANN et al., 1993, BERG et al., 1998), Spitzmäuse (HILBE et al., 2006, PUORGER et al., 2010, BOURG et al., 2013, NOBACH et al., 2014) sowie Wildvögel (BERG et al., 2001) als Reservoir des BDV in Betracht gezogen. Die saisonale Dynamik mit Häufung von klinischen Ausbrüchen im Frühling und Frühsommer lässt eine Transmission über Vektoren vermuten (ROTT und BECHT, 1995).

Als Übertragungsweg gilt die olfaktorische Route als sehr wahrscheinlich, da bei der experimentellen Infektion von Ratten die virale Ausbreitung über olfaktorische Neurone ins limbische System nachgewiesen wurde (CARBONE et al., 1987, MORALES et al., 1988).

Für eine Tröpfcheninfektion spricht zusätzlich der Nachweis von viraler RNA in nasalen und konjunktivalen Sekreten sowie im Speichel (RICHT et al., 1993).

In der initialen Phase der Infektion zeigen sich beim Pferd inflammatorische Reaktionen und Ödeme im Bulbus olfactorius (JOEST und SEMMLER, 1911, LUDWIG et al., 1988). Neben der horizontalen Transmission wurde vereinzelt beim Pferd (HAGIWARA et al., 2000) und experimentell bei der Maus (OKAMOTO et al., 2003) der vertikale Übertragungsweg beschrieben.

Seit Jahrzehnten gibt es Hinweise für BDV-Infektionen beim Menschen. Nach wie vor werden sowohl der zoonotische Aspekt als auch die Pathogenese des BDV im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Erkrankungen kontrovers diskutiert (AMSTERDAM et al., 1985, RICHT und ROTT, 2001, BILLICH et al., 2002, CHALMERS et al., 2005).

2.3. Das Borna-Disease-Virus

2.3.1. Allgemeine Eigenschaften

Als Auslöser für die BD gilt das BDV. Dieses behüllte, sphärische Virus enthält eine nicht-segmentierte Einzelstrang-RNA mit negativer Polarität und einem helikalen Nukleokapsid (CARBONE et al., 1987, DE LA TORRE et al., 1990, BRIESE et al., 1994, CUBITT et al., 1994, ZIMMERMANN et al., 1994, KOHNO et al., 1999, PEREZ et al., 2003). Es zeigt sich empfindlich gegenüber organischen Lösungen, Detergenzien, Hitze, UV-Strahlung und sauren pH-Werten (DUCHALA et al., 1989, KAADEN et al., 2002).

Hinsichtlich seines speziellen Charakters repräsentiert das BDV innerhalb der Ordnung Mononegavirales den Prototypen einer neuen Virusfamilie, der Bornaviridae (DE LA TORRE, 1994, PRINGLE, 1996, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997).

Tabelle 2-1: Ordnung der Mononegavirales

Familie/Unterfamilie	Gattung	Art
Bornaviridae	Bornavirus	Borna-Disease-Virus (BDV)
Filoviridae	Ebolavirus Marburg-Virus	Zaire-Ebolavirus (ZEBOV) Lake Victoria Marburgvirus
Paramyxoviridae Paramyxovirinae Pneumovirinae	Respirovirus Morbillivirus Rubulavirus Pneumovirus Metapneumovirus	BPIV-3, HPIV-1, SeV Masernvirus, Canine Distemper Virus Mumpsvirus BRSV, HRSV TRTV
Rhabdoviridae	Vesikulovirus Lyssavirus Ephemerovirus Novirhabdovirus Cytorhabdovirus Nukleorhabdovirus	VSIV Tollwutvirus BEFV IHNV der Salmoniden BNYV, LNYV PYDV

In Anlehnung an: International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)

In Bezug auf die Genomorganisation finden sich innerhalb dieser Ordnung ähnliche Eigenschaften bei den Filoviridae, Paramyxoviridae und Rhabdoviridae (MCCLURE et al., 1992, GOSZTONYI et al., 1993, KAADEN et al., 2002). Dem gegenüber ist das BDV-Genom mit einer Länge von etwa 8,9 kb kleiner als das der anderen Mitglieder dieser Ordnung. Ein weiterer Unterschied sind die intranukleäre Replikation und Transkription. Dabei nutzt das BDV RNA-Spleißmechanismen zur Regulation seiner Genomexpression (DE LA TORRE, 1994, SCHNEEMANN et al., 1995, CUBITT et al., 2001).

Vorrangig in den hippocampalen Ganglienzellen des Wirts lassen sich typische Einschlusskörperchen nachweisen, die bis heute als postmortales BD-Diagnostikum dienen (JOEST und DEGEN, 1909b). Die Eigenart des intranukleären Replizierens und Transkribierens weisen innerhalb der Mononegavirales nur noch Pflanzen-assoziierte Rhabdoviren auf (BRIESE et al., 1992, CUBITT et al., 1994, PYPER et al., 1998).

Des Weiteren ist die Transmission entlang von neuronalen Axonen als Gemeinsamkeit mit dem zu den Rhabdoviren gehörenden Tollwutvirus beispielhaft zu nennen (TSIANG, 1979, CARBONE et al., 1987).

2.3.2. Das BDV-Genom

Ein besonderes Charakteristikum des BDV ist eine hohe Genomkonservierung. Bei unterschiedlichen Virus-Isolaten kann es jedoch zu Differenzen in der phenotypischen Expression kommen (SCHNEIDER et al., 1994, STAEHELI et al., 2000). Angenommen wird, dass es weitere, noch nicht klassifizierte Subtypen gibt.

In Österreich wurde der Stamm No/98 aus einem Pferd isoliert. Dieser unterscheidet sich zu 15 % von den Referenzstämmen V und He/80 (NOWOTNY et al., 2000).

Aus einem Rind in Japan isolierte man den BDV-Stamm Bo/04w, der in infizierten Zellen die Expression des Phosphoproteins P effektiver als Referenzstämme regulieren soll (WATANABE et al., 2007).

Des Weiteren wird von einem humanen BDV-Stamm berichtet, der aus einem Patienten mit bipolarer Störung isoliert wurde und die Bezeichnung Hu-H1 trägt (LI et al., 2013).

Die RNA-Genomsequenz des BDV enthält sechs offene Leserahmen (ORF), die wiederum sechs unterschiedliche Proteine kodieren (DE LA TORRE, 1994, SCHNEEMANN et al., 1995, DE LA TORRE, 2002).

Nukleoprotein: Das Nukleoprotein N ist relevant für den nukleären Import und Export. Es besteht aus 370 Aminosäuren (aa) und kann zwei Isoformen (p38 und p40) aufweisen (SCHNEEMANN et al., 1994, SCHWEMMLE et al., 1998).

Phosphoprotein: Das Phosphoprotein P (p24) ist 201 aa lang und besitzt ein Molekulargewicht von 24 kDa. Es wirkt als Co-Faktor für die Transkription und Replikation (SCHWEMMLE et al., 1998, KOHNO et al., 1999).

Matrixprotein: Das 142 aa lange und 16 kDa schwere Matrixprotein M (p16) wird posttranslational zu gp18 glykosyliert. Es spielt eine Rolle bei der Membranstabilisierung und Kontaktaufnahme zwischen Virus und Wirtszelle (BRIESE et al., 1994, CUBITT et al., 1994, NEUMANN et al., 2009).

Glykoprotein: Das Glykoprotein G (gp94) besteht aus 503 aa und hat nach N-Glykosylierung ein Molekulargewicht von 94 kDa. Nach Spaltung in zwei Untereinheiten dienen GP-N der Rezeptorbindung und GP-C der Vermittlung der Fusion zwischen Wirtsmembran und Virus-Hülle (GONZALEZ-DUNIA et al., 1998, PEREZ et al., 2001).

Polymerase: Das größte Virusprotein mit einem Molekulargewicht von 190 kDa und einer Länge von mehr als 1700 aa ist die RNA-abhängige Polymerase L (p190). Sie ist möglicherweise relevant für die Virus-Wirtszell-Interaktion (BRIESE et al., 1994, CUBITT et al., 1994).

Protein X: Das Protein X (p10) wirkt als Negativ-Regulator der Polymerase X und ist damit wichtig für die Viruspersistenz (SCHWARDT et al., 2005).

Abbildung 2-1: BDV-Genom

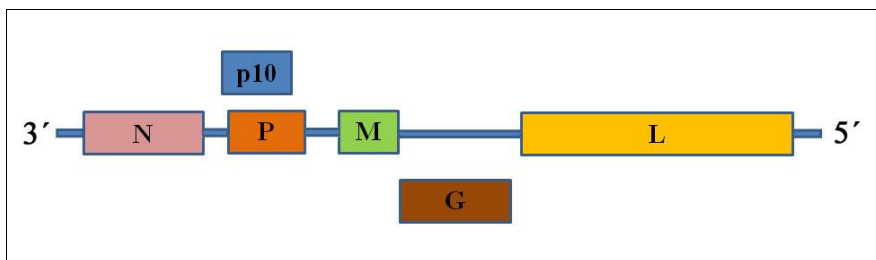


Abbildung modifiziert aus: DE LA TORRE, 2006

Die Abbildung zeigt die sechs sich teilweise überlappenden, offenen Leserahmen (ORF) im BDV-Genom.

G = Glykoprotein; L = RNA-abhängige RNA-Polymerase; M = Matrixprotein; N = Nukleoprotein; P = Phosphoprotein; p10 = Protein X, Nichtstrukturprotein p10

2.3.3. Persistenz

Aufgrund der Funktionen viraler Proteine und der Tatsache, dass das BDV per se nicht-zytolytisch ist, stellt die Persistenz eine Besonderheit der BDV-Infektion dar (LUDWIG et al., 1988).

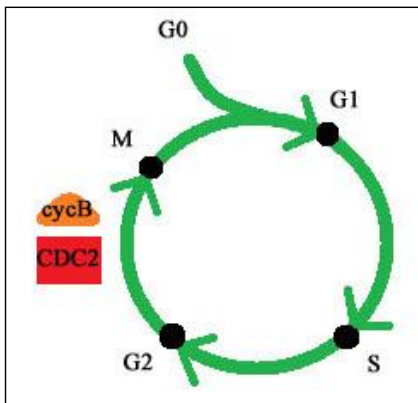
Als Negativ-Regulator der Polymerase wird dem Protein X eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben. In der initialen Phase der Infektion ist sein Nachweis nicht möglich. Nach vollständiger Infektion der Wirtszelle lässt sich schließlich im Zellkern ein Verhältnis der Proteine X, P und N von 1:6:40 nachweisen. Die Replikationsrate verringert sich, sobald die Polymerase bei einer 30%igen X-Konzentration gehemmt wird (SCHWARDT et al., 2005).

Während multipler Zellpassagen steuert das BDV die Verkürzung der 3'- und 5'-Enden um ein bis vier Nukleotide und moduliert damit die Promotor-Aktivität (ROSARIO et al., 2005, SCHNEIDER, 2005).

Ein weiterer Angriffspunkt ist der G2-Checkpunkt, der im Zellzyklus den Eintritt der Zelle in die Mitose nach Abschluss der DNA-Replikation kontrolliert (RUSSELL, 1998) (**Abb. 2-2**). Dabei reguliert die Cyclin-abhängige Kinase (CDK1 bzw. CDC2) die G2-Mitose-Transition (BODDY et al., 1998). Durch Interaktion des Nukleoproteins N mit dem CDC2-Cyclin-B1-Komplex wird die Wachstums-Phase G2 und damit der gesamte Zellzyklus verlängert (PLANZ et al., 2003).

Um zusätzlich vom Immunsystem unerkannt zu bleiben, wird die Glykoprotein G-Expression auf der Zellmembran der Wirtszelle reduziert. G ist im endoplasmatischen Retikulum bzw. Golgi-Apparat lokalisiert (EICKMANN et al., 2005).

Abbildung 2-2: Zellzyklus



Vereinfachte Darstellung des Zellzyklus mit funktioneller Position des CDC2-Cyclin-B1-Komplexes (G2-Checkpunkt).

G0 = Ruhe-Phase; G1 = erste Wachstums-Phase (Zellwachstum, Bildung von Organellen, Proteinbiosynthese, RNA-Synthese); G2 = zweite Wachstums-Phase (weiteres Wachstum, Prüfung der Replikation); M = Mitose (Zellteilung); S = Synthese (Replikation der Chromatiden bzw. DNA)

Abbildung modifiziert aus: DANIEL, 2003

2.4. BDV-Infektion

2.4.1. Natürliche BDV-Infektion beim Tier

Eine natürliche Infektion mit dem BDV induziert die BD. Diese ansteckende Erkrankung ist durch eine akute bis subakute, seltener chronische, nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis charakterisiert (ZWICK und SEIFRIED, 1925). Sie tritt hauptsächlich bei Pferden und Schafen auf (LUDWIG et al., 1985, GRABNER und FISCHER, 1991). Auch andere Spezies können betroffen sein (**Kap. 2.2.**).

Speziell bei Pferden verläuft die BD mit einer Inkubationszeit von etwa einem Monat eher subklinisch bei persistenter Infektion. Die initiale Phase ist durch unspezifische Symptome, wie Inappetenz und Fieber, gekennzeichnet. Bei fortgeschrittener Erkrankung zeigen die Tiere sowohl Verhaltensauffälligkeiten, wie gestörtes Fressverhalten und apathische Zustände, als auch koordinative und motorische Störungen, darunter Ataxie und Propriozeptionsstörungen, sowie Blindheit. Im Endstadium kann es zu Paralyse und Konvulsion kommen (LUDWIG et al., 1988, ROTT und BECHT, 1995).

Die Symptomatik wird generell durch immunologische, gegen Nervenzellen gerichtete Reaktionen hervorgerufen (BILZER und STITZ, 1996) (**Kap. 2.4.4.1.1.**). Histopathologisch ist eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis mit perivaskulären, rundzelligen Entzündungsinfiltraten typisch. Diese Infiltrate, welche u. U. ins ZNS-Parenchym migrieren können, bestehen weitestgehend aus Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen (BILZER et al., 1995, GOSZTONYI und LUDWIG, 1995, BILZER und STITZ, 1996). Das histologische Bild beim Pferd gleicht dem der adult-infizierten Ratte in der akuten und subakuten Infektionsphase (STITZ et al., 1993). Weitere Befunde sind Astrogliosen und azidophile intranukleäre Joest-Degen-Einschlusskörperchen in Neuronen, gelegentlich auch in Gliazellen. Diese entsprechen akkumulierten Virusproteinen (ROTT und BECHT, 1995).

Besonders die Neuronen des limbischen Systems und der Amygdala werden von dem neurotrophen BDV infiziert (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984, GOSZTONYI und LUDWIG, 1995).

Die BD beim Schaf ähnelt der des Pferdes in Klinik und Histopathologie. Sie ist jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt und verläuft häufig subklinisch und seltener tödlich (ROTT und BECHT, 1995).

Vermutlich steht auch die „Staggering Disease“ der Katze im Zusammenhang mit dem BDV. Auch dabei treten Verhaltensalterationen, Ataxie und fehlende Stellungsreaktionen auf. Histologisch besteht ebenfalls eine nicht-eitrige Meningoenzephalomyelitis (KRONEVI et al., 1974, LUNDGREN et al., 1993, REEVES et al., 1998, WENSMAN et al., 2013).

2.4.2. Differenzialdiagnosen

Beim Pferd sollten andere Enzephalitiden oder Erkrankungen, die mit ähnlicher Symptomatik einhergehen, differentialdiagnostisch von der BD unterschieden werden. Dazu zählen Krankheiten, die durch Bakterien, Viren, Toxine (z. B. hepatoenzephalisches Syndrom) oder sonstige Einflüsse verursacht werden.

Neurologische Auffälligkeiten treten ebenso bei posttraumatischen Zuständen von Gehirn und Rückenmark (BACH et al., 2014), bei Tetanus (GREEN et al., 1994), Botulismus (OSTROWSKI et al., 2012) und Tollwut (JOYCE und RUSSEL, 1981) sowie Infektionen mit Leptospiren (PEARCE et al., 2007), Listerien (SEELIGER, 1958) und dem Equinen Herpes Virus-1 (EHV-1) (PURSELL et al., 1979) auf.

Weitere Ursachen können raumfordernde Prozesse, wie Tumoren (HOLSHUH und HOWARD, 1982) oder Druse-bedingte metastasierte Abszesse (BOYLE, 2011), und Hydrozephalus (OEY et al., 2011) sein. Nicht zu vernachlässigen sind physikalische Einflüsse, d. h. Hitzschlag (VAN DAMSEN, 2012), und andere kreislaufbedingte Störungen.

Bei Motilitätsstörungen sollten zudem Überanstrengung, Hufrehe (HAMILTON-FLETCHER, 2004), hereditäre Ataxie (GERBER et al., 1995), Equine Infektiöse Anämie (EIA) (BOULANGER und AVERY, 1975) sowie Epilepsie (VAN DER REE und WIJNBERG, 2012) in Betracht gezogen werden.

2.4.3. BDV-Infektion beim Menschen

Da das BDV eine natürliche Affinität zu Neuronen im limbischen System besitzt (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984, GOSZTONYI und LUDWIG, 1995), können vegetative Funktionen, Gedächtnis- und Denkprozesse sowie Motivation und Emotion u. U. gestört werden. Das limbische System, eine phylogenetisch alte Gehirnstruktur, trägt eine wichtige Funktion in der Interaktion des Individuums mit seiner Umwelt. Aufgrund der zellulären Immunantwort auf das BDV werden infizierte Neuronen zerstört und somit die Psyche beeinträchtigt.

Ende der 1970er Jahre kam es bei experimentell infizierten Spitzhörnchen zu einer persistenten Infektion und folglich zu Verhaltensauffälligkeiten (SPRANKEL et al., 1978). Man beobachtete ebenso bei Rhesusaffen Verhaltensänderungen und neurologische Symptome als Folge der experimentellen Infektion mit dem BDV (STITZ et al., 1981). Derartige Störungen sind auch bei Menschen mit psychiatrischen Erkrankungen nachgewiesen. Dazu zählen u. a. Angstzustände, abnormes Sozialverhalten, Stereotypien sowie Hyperaktivität (BRIESE et al., 1999, PLETNIKOV et al., 2002).

Aufgrund des breiten Wirtsspektrums des BDV sowie möglicher Zusammenhänge zwischen humanen psychiatrischen Dysfunktionen und BDV-induzierten Verhaltensauffälligkeiten in Tiermodellen wurden seroepidemiologische Studien mittels Immunfluoreszenz-Analyse (IFA) durchgeführt.

Diverse Studien ließen den Verdacht einer Assoziation von BDV-Infektionen mit neuropsychiatrischen Erkrankungen des Menschen wie bipolaren Störungen und Schizophrenie zu. Basis dafür sind die im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen erhöhten BDV-spezifischen IgG-AK-Titer im Blut psychiatrischer Patienten (AMSTERDAM et al., 1985, ROTT et al., 1985). Zusätzliche serologische Untersuchungen, beispielsweise mittels Enzyme-linked Immunoabsorbant Assays (ELISA) oder Western Blot, führten zu ähnlichen Annahmen (BODE et al., 1988, BECHTER et al., 1992, SAUDER et al., 1996, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997, FUKUDA et al., 2001, HEINRICH und ADAMASZEK, 2010).

Der eventuelle Krankheitswert des BDV als Erreger humaner psychiatrischer Krankheiten gilt nach wie vor als umstritten (ROTT et al., 1985, BODE et al., 1988, CHALMERS et al., 2005, HORNIG et al., 2012). Einer der Gründe dafür ist das Fehlen eines validierten Systems zur Diagnose von BDV-Infektionen.

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen zur Detektion spezifischer AK und viraler RNA durchgeführt. Entsprechende serologische Tests weisen jedoch Divergenzen in Sensitivität und Spezifität auf. Tierische BDV-spezifische AK besitzen eine stärker ausgeprägte Affinität zu den entsprechenden Virus-Proteinen als humane AK. Daraus lässt sich eine unspezifische Antigen (AG)-AK-Bindung bei serologischen Tests mit humanem Serum schlussfolgern (ALLMANG et al., 2001). Trotz geringer AK-Affinität wird eine Spezifität für BDV bei psychiatrischen Patienten diskutiert (BILLICH et al., 2002).

Diverse Testverfahren zur Detektion von BDV-spezifischen AK, BDV-AG und -RNA stehen gegenwärtig zur Verfügung (**Tab. 2-2**).

Zu den Möglichkeiten der AK-Erkennung zählen z. B. Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA), ELISA, IFA und Western Blot.

Für ECLIA sowie Western Blot verwendet man mehrere AG, die bei vorliegender Seropositivität von AK im menschlichen Serum erkannt werden. Dafür nutzt man die BDV-Proteine N und P, die bei spontan infizierten Pferden detektiert wurden (FU et al., 1993, WALTRIP et al., 1995, SAUDER et al., 1996, YAMAGUCHI et al., 1999, RYBAKOWSKI et al., 2002).

Um das Risiko von Kreuzreaktionen zu minimieren und die Sensitivität zu optimieren, werden beim ELISA rekombinantes, gereinigtes BDV-Protein und monoklonale AK verwendet (FU et al., 1993, CHEN et al., 1999, YAMAGUCHI et al., 1999).

Die IFA eignet sich aufgrund von Kreuzreaktionen nicht zur Differenzierung von BDV-spezifischen AK und Auto-AK, welche häufig bei psychiatrischen Dysfunktionen auftreten (GANGULI et al., 1992, COUTINHO et al., 2014, HANLY, 2014).

BDV-Proteine können mit Hilfe von antigen-capture-ELISA und Durchflusszytometrie (FACS) nachgewiesen werden.

Zur Detektion der AG eignen sich u. a. antigen-capture-ELISA oder Sandwich-ELISA unter Anwendung von monoklonalen AK sowie polyklonalen Anti-Seren. Als nützlich erweist sich dabei die spezifische Bindung zweier AK an unterschiedliche Epitope eines AG. Bei der BDV-Infektion soll dieser Test spezifische, zirkulierende Immunkomplexe (CIC) und deren Interaktion mit Plasma-AG (p40/p24) sowie BDV-AK nachweisen (BODE et al., 2001).

Mittels FACS wurden AK gegen die viralen Proteine N und P aus monoklonalen Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei psychiatrischen Patienten nachgewiesen (BODE et al., 1994).

Aufgrund von Unstimmigkeiten zwischen dem Nachweis von BDV-RNA und viralen AG sowie fehlenden gesunden Kontrollen galt diese Untersuchung als kritikwürdig (GONZALEZ-DUNIA et al., 1997). Die Annahme einer Detektion von BDV-spezifischem AG in menschlichen Proben mittels antigen-capture-ELISA konnte darüber hinaus durch genauere Tests wie die qRT-PCR (siehe weiter unten) aufgrund von nachgewiesenen Kreuzreaktionen widerlegt werden (WOLFF et al., 2006).

Weitere Zweifel kamen bei der Infektion neonataler Ratten auf, bei der selten BDV-AG in PBMC zeitgleich mit dem RNA-Nachweis vorhanden waren (SIERRA-HONIGMANN et al., 1993, SAUDER und DE LA TORRE, 1998, FURRER et al., 2001).

Mitte der 90er Jahre wurde in psychiatrischen Patienten das Vorhandensein viraler RNA mit Hilfe der Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) belegt (BODE, 1995). Eine PCR-Variante ist die Real-time RT-PCR bzw. qRT-PCR, bei der eine reverse Transkriptase zur Umwandlung von BDV-RNA in DNA zum Einsatz kommt und eine Konzentrationsbestimmung aus Blut oder Gehirnmateriale in Echtzeit stattfindet (SCHINDLER et al., 2007, WENSMAN et al., 2007, POROMBKA et al., 2008).

Positive PCR-Resultate galten nicht selten als eine Folge von Labor-Kontaminationen. Davon abgesehen, fand man neue BDV-Varianten, die von üblichen Markern nicht detektiert wurden (SCHWEMMLE et al., 1999, LUDWIG und BODE, 2000, NOWOTNY et al., 2000, LI et al., 2013).

Ob schließlich eine Kausalität von BDV-Infektionen und psychiatrischen Erkrankungen beim Menschen besteht, kann nur durch die Entwicklung validierter Tests eruiert werden.

Tabelle 2-2: Methoden zum Nachweis des BDV

	Intra vitam	Post mortem
Antikörper	ECLIA ELISA IFA Western Blot	ELISA IFA Western Blot
Antigen	antigen-capture-ELISA FACS	Immunhistochemie (Gehirnschnitte) Western Blot (Gehirnmaterial)
RNA	RT-PCR (Blut, Nasalsekret)	in-situ-Hybridisierung (Gehirnschnitte) RT-PCR (Gehirnmaterial, PBMC)

Tabelle modifiziert aus: BILLICH, 2002

2.4.4. Tier-Modelle

Die erste experimentelle Infektion mit dem BDV fand in den 1920er Jahren an Kaninchen statt. Diese wurden zuvor mit dem Gehirnhomogenat eines an BD erkrankten Pferdes intrazerebral infiziert (ZWICK und SEIFRIED, 1925). Es folgte die Passagierung in Kaninchen und die Rückübertragung von ultrafiltriertem Gehirnmaterial auf ein ursprünglich gesundes Pferd. Dieses erkrankte anschließend an BD. Somit wurde die Ätiologie des BDV bestätigt (DÜRRWALD und LUDWIG, 1997).

Die folgenden Jahre brachten die Entwicklung verschiedener Virus-Stammlinien hervor. Aktuell finden vorrangig zwei BDV-Referenzstämme Verwendung. Der Stamm V wurde 1927 aus Kaninchen gewonnen, die mit dem Gehirnmaterial eines an BD erkrankten Pferdes erfolgreich infiziert worden waren (ZWICK et al., 1927). Der Stamm He/80 (Hessen 1980) wurde in Gießen aus einem an BD erkrankten Pferd isoliert (HERZOG und ROTT, 1980).

Zahlreiche Tierarten lassen sich experimentell mit dem BDV infizieren. Die erfolgreiche Infektion von Hamstern (ANZIL, 1972), Kaninchen (ZWICK und SEIFRIED, 1925), Mäusen (KAO et al., 1984), Ratten (NITZSCHKE, 1963), Rhesusaffen (CERVOS-NAVARRO et al., 1981, STITZ et al., 1981) und Spitzhörnchen (SPRANKEL et al., 1978) ist belegbar. Allerdings traten post infectionem nicht bei allen Tieren die typischen Symptome der BD auf. Inkubationszeit, Krankheitsverlauf und Sterblichkeit sind im Wesentlichen von der Tierart, dem Immunstatus des Wirtstieres, dem Alter bei der Infektion, der Infektionsdosis und dem Virusstamm abhängig (LUDWIG et al., 1988, ROTT und BECHT, 1995, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997, HALLENSLEBEN et al., 1998).

Die experimentelle Infektion von Versuchstieren mit dem BDV bietet neben den

kontrollierten Bedingungen den Vorteil des sehr guten Erhaltungszustandes der Gehirne und anderer Organe. Frei von Autolyse-Artefakten können sie direkt nach der Tötung der Tiere durch Perfusion oder Immersion fixiert werden.

2.4.4.1. Das Ratten-Modell

2.4.4.1.1. Die adult-infizierte Ratte

Dieses Tier-Modell ermöglicht eine Vielzahl Erkenntnisse über die immunpathologischen Zusammenhänge bei der BD. Lewis-Ratten sind dabei für das BDV besonders empfänglich (NITZSCHKE, 1963, NARAYAN et al., 1983a, NARAYAN et al., 1983b, HERZOG et al., 1984, HERZOG et al., 1991).

Bereits Ende der 1930er Jahre wurde die Korrelation der beobachteten Symptome mit der zellulären Immunantwort vermutet (ZWICK, 1939). Etwa zwei bis vier Wochen p. i. manifestiert sich eine ausgeprägte, nicht-eitrige Meningoenzephalitis. Je nach Eintrittsstelle des BDV kann die Inkubationszeit bis zu 90 Tage betragen (CARBONE et al., 1987).

Die Analogie zwischen der natürlichen BD und dem Infektionsverlauf von adult-infizierten Lewis-Ratten lässt die Erforschung der immunologischen bzw. T-Lymphozyten-medierten Pathogenese der BDV-Infektion zu (BILZER et al., 1995).

Grundsätzlich wird der biphasische Krankheitsverlauf in eine akute und chronische Phase eingeteilt (NARAYAN et al., 1983b). Als klinische Symptome in der ein bis drei Wochen andauernden akuten Phase sind Aggressionen, plötzliche Ataxien und Hyperreaktivität auf exogene Reize zu nennen (NARAYAN et al., 1983b, CARBONE et al., 1987, DITTRICH et al., 1989). Gleichzeitig treten speziell im limbischen System massive Infiltrationen mit inflammatorischen Zellen auf. In den perivaskulären Infiltraten sind vorrangig CD4⁺ T-Lymphozyten, sogenannte T-Helferzellen, außerdem natürliche Killerzellen (NK), ca. 20 bis 30 % Monozyten/Makrophagen sowie einige Plasmazellen nachzuweisen. Im neuronalen Parenchym sind dagegen die zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten anzutreffen (CARBONE et al., 1987, RICHT et al., 1989, DESCHL et al., 1990, STITZ et al., 1991, PLANZ et al., 1993, BILZER und STITZ, 1994, STITZ et al., 1995, GIES et al., 1998).

Nach der Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten durch T-Helferzellen kann unter Umständen ein massiver Verlust von Neuronen erfolgen, die zuvor BDV-AG mittels Haupthistokompatibilitätskomplex-I (MHC-I) präsentieren (PLANZ et al., 1993, BILZER und STITZ, 1994, NÖSKE et al., 1998). Bei bis zu 80 % der Tiere kann die BDV-Infektion tödlich verlaufen, während sie beim übrigen Teil lebenslang persistiert. Während des

Übergangs in die chronische Phase treten Visus-Verlust und lethargische Zustände in den Vordergrund (NARAYAN et al., 1983b, CARBONE et al., 1987).

In der chronischen Phase kommt es zur Reduktion der Entzündungsinfiltrate bei gleichbleibend hoher BDV-Konzentration im ZNS, während die Zahl der Plasmazellen steigt (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995, STITZ et al., 1995, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997). Außerdem können sich Nervenzell-Nekrosen im hippocampalen Gyrus dentatus und CA3-Bereich des Ammonshorns sowie im frontalen und parietalen Kortex manifestieren (NARAYAN et al., 1983b, SOBBE et al., 1997). Klinische Anzeichen sind zum einen Teilnahmslosigkeit und fehlendes Pflegeverhalten und zum anderen eine ausgeprägte Obesitas bei 10 bis 15 % der Tiere (NARAYAN et al., 1983a, LUDWIG et al., 1985, GOSZTONYI und LUDWIG, 1995, ROTT und BECHT, 1995, HERDEN et al., 2000).

Die Gründe für die Gewichtszunahme bis zu 300 % liegen vermutlich in erhöhten Glukose- und Fett-Werten im Blut, hyperplastischen Langerhans-Inseln im Pankreas sowie endokrinen Störungen durch entzündliche Infiltrate im Hypothalamus (GOSZTONYI und LUDWIG, 1995, ATKINSON, 2007, MITRA und CLARKE, 2010).

2.4.4.1.2. Die neonatal-infizierte Ratte

Werden neonatale Ratten mit dem BDV infiziert, sind im Gegensatz zur adult-infizierten Ratte bzw. klassischen BD immunpathologische Reaktionen aufgrund der temporär bestehenden Immuntoleranz hintergründig.

Diese Form der Infektion wird auch als persistente, tolerante Infektion Neugeborener (PTI-NB) bezeichnet (CARBONE et al., 1991, BAUTISTA et al., 1994, SAUDER und DE LA TORRE, 1999). Sie ermöglicht in Abwesenheit einer deutlichen Entzündungsreaktion die in-vivo-Untersuchung von Mechanismen und Konsequenzen der viralen Persistenz im ZNS sowie von viralen Strategien, die die neuronale Entwicklung modulieren (GONZALEZ-DUNIA et al., 2005). Dennoch sind retardiertes Verhalten, Kognitions- und Emotionsstörungen, Hyperreaktivität auf verschiedene Stimuli sowie Defizite in der neuro- und physiologischen Entwicklung zu verzeichnen (HIRANO et al., 1983, RUBIN et al., 1999, BAUTISTA et al., 1994, PLETNIKOV et al., 1999a, PLETNIKOV et al., 1999b, PLETNIKOV et al., 2002).

Bei klinischen Erscheinungen treten Parallelen zu neuropsychiatrischen Krankheiten des Menschen auf, beispielsweise zu Autismus-Spektrum-Störungen (HORNIG et al., 1999, PLETNIKOV et al., 1999b, HORNIG et al., 2001, LANCASTER et al., 2007) sowie Schizophrenie (DITTRICH et al., 1989, RUBIN et al., 1999, HORNIG et al., 2001).

Nach intranasaler oder intrazerebraler Inokulation persistiert das BDV im gesamten ZNS. Nach etwa sieben bis 14 Tagen manifestieren sich Degenerationen von Neuronen im Kortex (GABAerge Neuronen) und Hippocampus sowie Kleinhirnhypoplasien mit Verlust von Purkinjezellen (BAUTISTA et al., 1995, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997, EISENMAN et al., 1999, HORNIG et al., 1999, GONZALEZ-DUNIA et al., 2000). Zusätzlich kann es zur Vermehrung von Astrozyten und Mikroglia kommen. Die Aktivierung der Mikroglia ist vermutlich für eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich, die aufgrund ihrer destruktiven Wirkung zur Symptomatik beitragen (PLATA-SALAMAN et al., 1999, SAUDER und DE LA TORRE, 1999, WEISSENBOCK et al., 2000, OVANESOV et al., 2006, NISHINO et al., 2009).

Neuropathologische Veränderungen, die bisher nach aerogener Infektion beobachtet wurden, sind auf die direkten Einflüsse des BDV zurückzuführen. Die Folgen mechanischer Insulte durch intrazerebrale oder intranasale Inokulation können ausgeschlossen werden.

In der NBAE-Studie wurde BDV-Protein bereits am ersten Lebenstag im gesamten Gehirn in Neuronen und Gliazellen nachgewiesen. Die bisherigen Ergebnisse zeigten neben degenerierten Neuronen und einer verringerten Dichte an Purkinjezellen eine Vermehrung von Gliazellen. Etwa einen Monat p. i. erschienen gelegentlich transiente, perivaskuläre, mononukleäre Infiltrate (SOLLMANN, 2007, SCHEPERS, 2009, GEHRKE, 2011). Insgesamt ließen sich Alterationen in der Myelinisierung nachweisen. Myelinscheiden der Axone waren dünner, perlschnurartig aufgetrieben und diskontinuierlich (SCHEPERS, 2009). Weitere Veränderungen traten bei Neurofilamenten auf. Nicht-phosphorylierte Neurofilamente, die in ihrer physiologischen Reifung phosphorylieren, ließen sich lediglich als undeutliche, diskontinuierliche Strukturen erkennen. Phosphorylierte Neurofilamente waren kondensiert und aggregiert. Zusätzlich waren Dendriten und Axone unterbrochen und perlschnurartig aufgetrieben (GEHRKE, 2011).

2.4.4.2. Das Maus-Modell

Bis Ende der 1990er Jahre ging man bei Mäusen von einer fehlenden Suszeptibilität gegenüber dem BDV aus, da adult-infizierte Tiere weder klinische Symptome noch Enzephalitiden entwickelten (KAO et al., 1984, RUBIN et al., 1993). Mit Hilfe eines Maus-adaptierten BDV konnten schließlich neonatale Mäuse intrazerebral infiziert und Krankheitszeichen induziert werden (HALLENSLEBEN et al., 1998). Vier bis sechs Wochen p. i. treten Gewichtsverlust und letale Lähmungen zeitgleich mit ausgeprägter, perivaskulärer Meningoenzephalitis in Erscheinung. Verglichen mit der adult-infizierten Ratte, bleibt im

Maus-Modell ein starker Verlust von Neuronen aus. Allerdings stehen ebenfalls die CD8⁺ T-Lymphozyten als Mediator bei der immunvermittelten Pathogenese im Vordergrund (NARAYAN et al., 1983b, HALLENSLEBEN et al., 1998).

Im Gegensatz zum Wildtyp können Mäuse mit einem Gendefekt des β 2-Mikroglobulins (β 2M) keine Meningoenzephalitis entwickeln. Das β 2M stellt die kleinere, lösliche Protein-Untereinheit des MHC-Klasse-I-Moleküls dar. Die veränderte Molekül-Struktur ist folglich der Grund für die fehlende Erkennung des MHC-I durch CD8⁺ T-Lymphozyten (HALLENSLEBEN et al., 1998).

Die BD-Inzidenz variiert abhängig vom Maus-Stamm. In einer Studie entwickelten etwa 80 % der MRL (H-2(k))-Linie Symptome, dagegen waren es bei BALB/c-, BL/6- und C3H-Mäusen nur etwa 13 bis 47 %. Zu einer asymptomatischen, persistenten BDV-Infektion kam es beim B10.BR (H-2(k))-Stamm. Mittels Expressierung des BDV-Nukleoproteins p40, des Hauptziels der CD8⁺ T-Lymphozyten, durch ein rekombinantes Vakziniavirus konnte jedoch auch bei diesen Mäusen die Erkrankung ausgelöst werden (HAUSMANN et al., 1999).

2.4.4.3. Das Gerbil-Modell

Dass die Folgen einer BDV-Infektion u. a. Tierart-spezifisch und abhängig vom Infektionszeitpunkt sind, werden durch die beschriebenen Differenzen zwischen Gerbil und Ratte verdeutlicht (LEE et al., 2003).

Nach experimenteller Infektion von neonatalen Gerbilen, welche für das BDV sehr empfänglich sind, treten mehr oder weniger ausgeprägte, teilweise letale, neurologische Symptome auf, jedoch keine offensichtlichen neuroanatomischen Abnormalitäten oder zellulären Verluste trotz hoher Virus-Titer (NAKAMURA et al., 1999a, NAKAMURA et al., 2000, WATANABE et al., 2001, WATANABE et al., 2003). Störungen der neuronalen Funktionen sind wahrscheinlich auf eine erhöhte Expression des Zytokins IL-1 β zurückzuführen (WATANABE et al., 2003).

Sowohl in neonatal- als auch adult-infizierten Tieren können im Blut AK gegen das BDV-Phosphoprotein und das Protein X detektiert werden. Dagegen sind AK gegen das Nukleoprotein p40 nur selten oder gar nicht nachzuweisen. Dieses korreliert mit den geringen bzw. fehlenden inflammatorischen Reaktionen (WATANABE et al., 2001). Im Gegensatz dazu kann bei der Ratte eine Meningoenzephalitis nur in Anwesenheit einer Immunantwort gegen p40 induziert werden (PLANZ und STITZ, 1999).

2.5. Gliazellen

Um lebenswichtige Organfunktionen zu gewährleisten, stellt das ZNS ein Kontrollzentrum für Empfang, Verarbeitung, Integration und Weiterleitung von Signalen dar. Neben Neuronen übernehmen die nicht-neuronalen Zellen, Gliazellen (GZ), wichtige Aufgaben. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts bezeichnete sie Virchow als „Nervenkitt“. Der Begriff „Glia“ ist vom griechischen Wort „gliokytoi“ abgeleitet und bedeutet „Leim“ (VIRCHOW, 1846, VIRCHOW, 1854).

Die Einteilung erfolgt nach deren Größe in Mikroglia bzw. Hirtge-Glia (**Kap. 2.5.3.**) und Makroglia. Letztere werden zusätzlich in Astrozyten (**Kap. 2.5.1.**) und Oligodendrozyten (**Kap. 2.5.2.**) unterschieden (**Abb. 2-3**).

GZ galten lange Zeit als relativ passive Zellen mit der einzigen Aufgabe, neuronale Funktionen zu unterstützen. Ihre Mehrzahl ist nicht in der Lage, Aktionspotential zu generieren oder über elektrische Signale zu kommunizieren (HARRIS, 2011). Inzwischen ist aber bekannt, dass sie zahlreiche Hilfsfunktionen übernehmen.

Insbesondere Astrozyten spielen eine aktive Rolle für die Modulation der Signalweiterleitung sowie für synaptische Prozesse durch Aufnahme oder Sekretion von Neurotransmittern (ARAQUE et al., 1999, SANTELLO und VOLTERRA, 2009).

Daneben sind Oligodendrozyten für die elektrische Isolation der Axone (VIRCHOW, 1854, POLIAK und PELES, 2003) und Mikroglia für das intrinsische Immunsystem unerlässlich (KREUTZBERG, 1995, RAIVICH et al., 1999, KIERDORF und PRINZ, 2013).

Neben Verschaltungen der Neuronen untereinander, im humanen Gehirn bis zu 1300 Millionen Kontakte pro Kubikmillimeter (OBERHEIM et al., 2006), tragen Astrozyten durch spezielle Synapsen wesentlich zur enormen Komplexität des ZNS-Aufbaus bei.

Während im gesamten menschlichen Gehirn die Anzahl der GZ die der Neuronen etwa um das Neunfache übersteigt, unterscheidet sich das GZ-Neuronen-Verhältnis im präfrontalen Kortex des Menschen mit 1,65:1 von dem der Nagetiere mit 0,3:1 (SHERWOOD et al., 2006, HARRIS, 2011). Dieses Areal, auch „Supervisory Attentional System“ (SAS) genannt, reguliert emotionale Prozesse und steuert situationsadäquate Handlungen (CREUTZFELDT, 1983). Aus phylogenetischer Sicht wird dieses Verhältnis bei höheren Säugern als ein Vorteil in der Gehirnkplexität gewertet.

Das Auftreten von glialen Tumoren und reaktiven Proliferationen (Gliosen) belegt, dass GZ im Gegensatz zu Neuronen noch im adulten Alter teilungsfähig sind (HARRIS, 2011).

Als Reaktion auf traumatische, infektiöse, autoimmune, ischämische, toxische und degenerative Einflüsse proliferieren Glia-Vorläuferzellen. Sie ändern ihre Zelloberfläche und

Morphologie, während verstärkt spezifische zelluläre Marker exprimiert und Zytokine sekretiert werden (STREIT und KREUTZBERG, 1988, EDDLESTON und MUCKE, 1993, RAIVICH et al., 1999, ENG et al., 2000, CODELUPPI et al., 2014).

Abbildung 2-3: Einteilung der Gliazellen

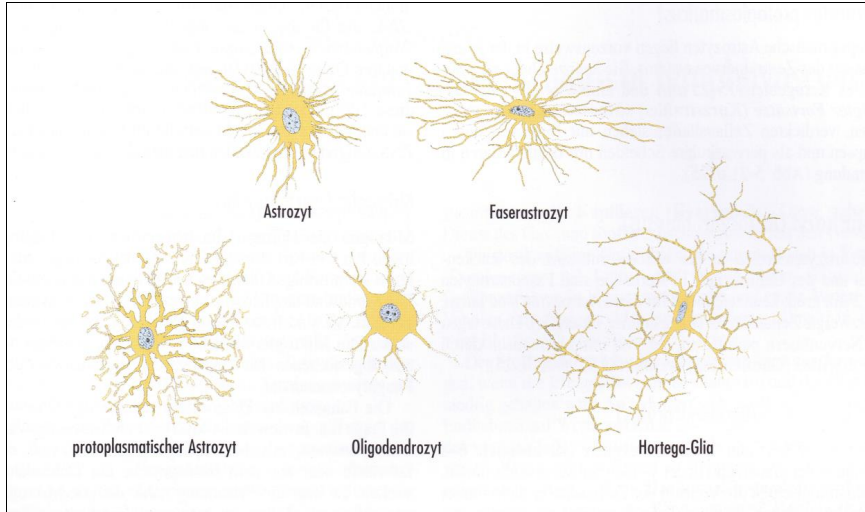


Abbildung aus: LIEBICH, 2004

2.5.1. Astrozyten

Astrozyten (AZ) tragen durch ihre zahlreichen, strahlenartigen Zellfortsätze (Filopodien), die der Kontaktaufnahme mit Neuronen bzw. deren Synapsen und Blutgefäßen dienen, zur zentralnervösen Komplexität bei. Sie bilden über Gap junctions Synzytien und durch dichte Zusammenlagerung die Membrana limitans glialis superficialis an der Pia mater und an Blutgefäßen die Membrana limitans glialis perivascularis (PEKONY und NILSSON, 2005). Aufgrund der engen Kopplung an Blutgefäße stellen sie einen wichtigen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke dar (JANZER und RAFF, 1987, TSACOPOULOS und MAGISTRETTI, 1996, KUCHLER-BOPP et al., 1999).

Die Größe des astrozytären Zellkörpers und die Ausbildung der Fortsätze wird durch die Aktivität benachbarter Neuronen moduliert und als „Infotropismus“ bezeichnet (KIMELBERG et al., 1992, SYKOVA et al., 1992).

Morphologisch unterscheidet man zwei Typen. In der weißen Substanz, welche v. a. aus Axonen besteht, befinden sich Faser- bzw. fibrilläre AZ („Langstrahler“) mit dünnen, langen,

häufig unverzweigten Fortsätzen. Protoplasmatische AZ („Kurzstrahler“) sind dagegen mit ihren dicken, kurzen, stark verzweigten Filopodien charakteristisch für die graue Substanz, in der besonders in Kerngebieten viele neuronale Zellkörper gelegen sind. Im menschlichen ZNS kann ein protoplasmatischer AZ etwa zwei Millionen Synapsen kontaktieren, bei Mäusen hingegen nur 90.000 (OBERHEIM et al., 2006).

Eine spezielle Einheit stellt die tripartite (dreigeteilte) Synapse dar (**Abb. 2-4**). Diese wird aus der präsynaptischen Endigung, der Postsynapse und den astrozytären Fortsätzen gebildet.

AZ und Neuronen exprimieren teilweise gleiche Rezeptoren. Nach der Ausschüttung von Neurotransmittern aus der präsynaptischen Endigung eines Neurons kommt es zur Aktivierung des astrozytären Rezeptors. Folge dessen ist ein Kalzium-Anstieg im AZ und die Freisetzung von verschiedenen aktiven Substanzen wie Glutamat und ATP, welche wiederum neuronale Aktivitäten modulieren (ARAQUE et al., 1999, FIELDS und STEVENS, 2000, ZHANG et al., 2004, PASCUAL et al., 2005, ALLEN und BARRES, 2009, SANTELLO und VOLTERRA, 2009).

Abbildung 2-4: Tripartite Synapse

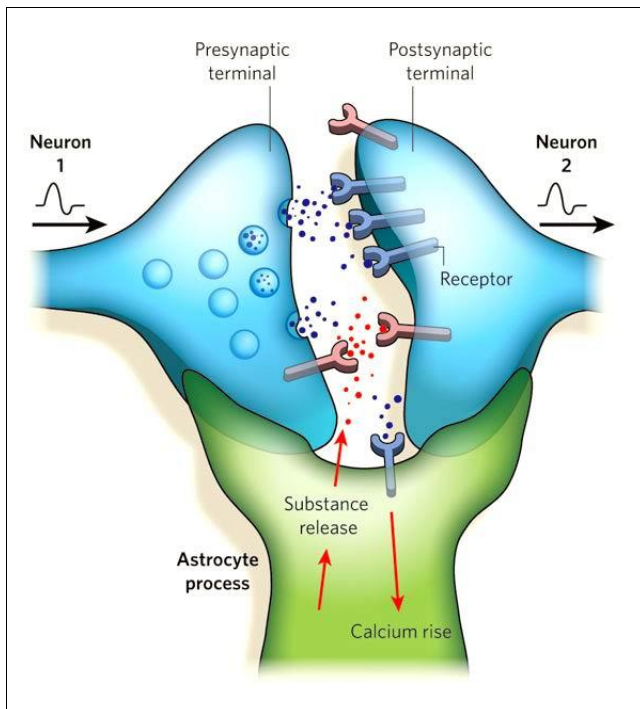


Abbildung aus: ALLEN und BARRES, 2009

AZ übernehmen im ZNS in der Interaktion mit Nervenzellen essentielle Aufgaben und sind sowohl am physiologischen als auch pathologischen und regenerativen Geschehen beteiligt.

Sie sind in metabolische Prozesse durch Versorgung der Neuronen mit Energie und Sauerstoff und durch Entsorgung von Abbauprodukten involviert. Durch Modulation von Einstrom und Ausfluss von Kalzium-, Natrium-, Kalium- und Chlorid-Ionen gewährleisten sie außerdem die neuronale Erregungsfortleitung (WALZ, 1989, FIELDS und STEVENS-GRAHAM, 2002).

Folge akuter Traumata oder neuronaler Degeneration ist eine Aktivierung der AZ mit Proliferation und Änderung der Genexpression. Die erhöhte Expression von Vimentin und Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) löst eine zelluläre Hypertrophie aus (BIGNAMI et al., 1972). Um Verletzungen temporär und lokal einzugrenzen, bilden AZ gliale Narben aus, die jedoch eine neuronale Regeneration verhindern (FAWCETT und ASHER, 1999, JURYNEC et al., 2003, WILHELMSSON et al., 2004).

Allerdings unterstützen AZ mit Hilfe von Fibronectin während der Entwicklung und im adulten Alter das Wachstum von Axonen (GAGE et al., 1988, HATTEN et al., 1991, KAWAJA und GAGE, 1991). Zusätzlich haben sie einen protektiven Effekt auf Neuronen und Oligodendrozyten vor Exzitotoxizität. Dabei führen Neurotransmitter wie Glutamat zu einer Reizüberflutung und folgend zur Apoptose der Nervenzellen (SWANSON et al., 2004).

Neben der schützenden Funktion können AZ auch destruierend wirken. Stickoxid beispielsweise trägt zur Signalweiterleitung durch Erregung der Präsynapse bei und kann neuronales Gewebe direkt oder sekundär durch Inflammation zerstören (GARTHWAITE et al., 2002, IKEDA und MURASE, 2004).

Wie sich die Aktivierung von AZ protektiv oder destruktiv auf das Gewebe auswirkt, hängt generell vom Insult ab (WILHELMSSON et al., 2004, MYER et al., 2006).

2.5.2. Oligodendrozyten

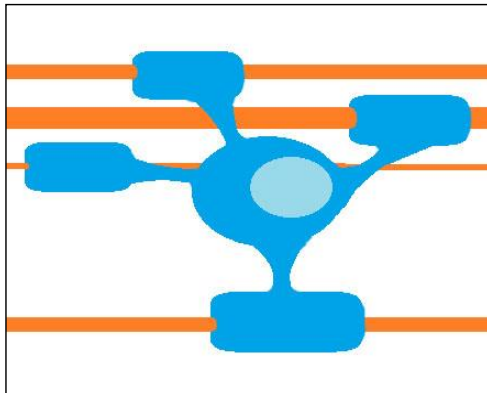
Neben Astrozyten stellen auch Oligodendrozyten (OZ) im ZNS bzw. Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem wichtige Interaktionspartner mit Neuronen dar (DEL RIO HORTEGA, 1928). Sie produzieren Myelin und können mehrere Segmente davon an bis zu 50 Axonen ausbilden (**Abb. 2-5**). Im Gegensatz dazu umhüllen Schwann-Zellen jeweils nur eine Nervenfasern (BUNGE, 1968).

Myelin ist eine um Axone geschichtete lipidreiche Plasmamembran mit einem geringen Anteil an Protein und Wasser. Es ermöglicht durch elektrische Isolation eine effiziente Impulsweiterleitung (VIRCHOW, 1854, NORTON, 1984). Ranvier'sche Schnürringe sind hierbei nicht-myelinisierte Abschnitte zwischen den Myelinscheiden und gewährleisten bei

der saltatorischen Erregungsleitung den Aufbau eines Aktionspotentials (RANVIER, 1878, FITZHUGH, 1962, BUNGE, 1968).

Vor der Entstehung reifer, Myelin-produzierender OZ proliferieren und differenzieren Stammzellen über monopolare Vorläuferzellen (Oligodendrocyte Precursor Cells, OPCs) zu bipolaren, hochmotilen OPCs, die durch chemotaktische Botenstoffe und Mitogene im ZNS an ihre endgültige Position migrieren. An dieser findet die Proliferation und Differenzierung zu multipolaren, nicht mehr zur Migration fähigen Zellen, den Pro-Oligodendroblasten, Prä-Oligodendrozyten und unreifen OZ, statt (BANSAL et al., 1992, PRINGLE et al., 1992, GARD und PFEIFFER, 1993, MILLER, 1996, BAUMANN und PHAM-DINH, 2001, TSAI und MILLER, 2002). Da einige OPCs nicht vollständig ausreifen, dienen sie im späteren Verlauf als Ressource für die Remyelinisierung (WOLSWIJK und NOBLE, 1989, MILLER, 2002). Die gesamte Entwicklung myelinisierender Zellen wird durch Neurotransmitter, wie ATP, über Kalzium-Signale in OPCs moduliert (FIELDS und STEVENS-GRAHAM, 2002, AGRESTI et al., 2005).

Abbildung 2-5: Myelinisierte Axone



Vereinfachte Darstellung eines Oligodendrozyten, der Myelinscheiden an mehreren neuronalen Axonen ausbildet.

Abbildung modifiziert aus: HORTSCH, 2010

Die Klassifizierung der reifen OZ in Subtypen basiert auf morphologischen und topografischen Eigenschaften. Typ I ist als häufigster Zelltyp im Frontalhirn, Kleinhirn und Rückenmark lokalisiert und besitzt einen kleinen, polygonalen Zellkörper mit zahlreichen, langen, dünnen, verzweigten Fortsätzen, die direkt mit Axonen verbunden sind. OZ des Typs II weisen weniger, aber dickere Filopodien auf und sind im Wesentlichen in der weißen Substanz zu finden. Im Kleinhirn, in der Medulla oblongata und im Rückenmark ist Typ III vertreten. Diese OZ besitzen zumeist zwei netzartig verzweigte Fortsätze. Der seltener

vorkommende Typ IV mit einem länglichen Soma und wenigen Filopodien befindet sich im Rückenmark in direkter Nähe der Axone und ähnelt den Schwann-Zellen (DEL RIO HORTEGA, 1928).

In der Ontogenese beginnt die Aktivität der OZ, die Myelinisierung, je nach Spezies prä- oder perinatal. Beim Menschen dauert sie vom späten fetalen Stadium bis zum 50. Lebensjahr an, während sie bei der Maus perinatal beginnt und bis zum 60. Lebensstag verläuft (DOBBING und SANDS, 1979, WIGGINS, 1982, RICE und BARONE, 2000, BARTZOKIS et al., 2001). Im ZNS schreitet die Myelinisierung, die durch exogene Reize maßgeblich beeinflusst wird, in kaudorostraler Richtung und entgegengesetzt im Rückenmark voran (SZELIGO und LEBLOND, 1977, SIREVAAG und GREENOUGH, 1987, KANFER et al., 1989).

Der funktionelle Zusammenhang zwischen Neurofilamenten, zytoskelettalen Bestandteilen, und OZ spiegelt sich in der Stabilität und Integrität von Axonen wider: Die Phosphorylierung und Expression von intraaxonalen Neurofilamenten, die das Dickenwachstum myelinisierter Axone beeinflussen, werden durch die Myelinisierung reguliert (STARR et al., 1996, GOTOW et al., 1999). Dieser Vorgang der Myelin-assoziierten Phosphorylierung ist vom Kontakt zwischen Neuronen und myelinisierenden Zellen sowie einem Kinase-Phosphatase-System abhängig (NIXON und SIHAG, 1991, DE WAEGH et al., 1992, GARCIA et al., 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Phosphorylierungsgrade, d. h. leicht, mittel und schwer, erfolgt die Einteilung von Neurofilamenten in drei Untergruppen (NF-L/„light“, NF-M/„medium“ und NF-H/„heavy“). Je stärker die Phosphorylierung der Neurofilamente und das axonale Kaliber sind, umso effizienter kann die Erregung weitergeleitet werden (SAKAGUCHI et al., 1993, MARTIN et al., 1999, KRIZ et al., 2000).

In Assoziation mit axonalen Dysfunktionen treten nicht-phosphorylierte Neurofilamente gehäuft bei der Multiplen Sklerose, einer progressiven, entzündlichen Demyelinisierung des Menschen, auf (ULRICH und LARDI, 1978, DAHL et al., 1989, PETZOLD et al., 2008, PETZOLD et al., 2011). Generell wirken sich Defizite in der Myelinisierung negativ auf kognitive Prozesse und andere zentralnervöse Funktionen aus. Dieser Zusammenhang wird u. a. bei Schizophrenie vermutet, einer psychischen Erkrankung des Menschen mit Störungen der Wahrnehmung, des Denkens und der Affektivität (FLYNN et al., 2003, CHAMBERS und PERRONE-BIZZOZERO, 2004, CHEW et al., 2013, SCHEEL et al., 2013, HUTTLOVA et al., 2014).

2.5.3. Mikroglia

Zu den kleinsten GZ zählen Mikroglia (MG) bzw. Hortega-Glia, nach ihrem Entdecker benannt. Sie stellen als Teil des intrinsischen Immunsystems residente Abwehrzellen im ZNS dar (DEL RIO HORTEGA, 1921, KREUTZBERG, 1995, RAIVICH et al., 1999).

MG entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen, seltener aus Neuroepithel. Sie migrieren während der embryonalen Entwicklung als Monozyten aus dem Blut ins Gehirn (WALZ, 1989, HESS et al., 2004).

Das morphologische Charakteristikum der MG ist ein kleiner, schmaler Zellkörper mit feinen, stark verzweigten und sehr motilen Fortsätzen, die zur Kontrolle der Umgebung genutzt werden (LAWSON et al., 1992, RAIVICH et al., 1994, KETTENMANN et al., 2011).

Zu ihren Aufgaben gehört z. B. der Schutz vor eindringenden Mikroorganismen durch immunologische Überwachung und sofortige Abwehrreaktion (ESEN und KIELIAN, 2006, HARRIS, 2011). Nach akuten, direkten Verletzungen von neuronalem Gewebe sind bei der Heilung mehr MG beteiligt als immigrierte Monozyten (DENKER et al., 2007). Ursächlich für die MG-Aktivierung können ebenfalls Infektionen, zerebrale Ischämie, neurodegenerative und autoimmune Erkrankungen sein (LASSMANN et al., 1994, ESEN und KIELIAN, 2006, DENG et al., 2011, LEWIS et al., 2014).

Nach einer veränderten Genexpression geschädigter Neurone werden benachbarte MG und AZ stimuliert (MCQUARRIE et al., 1978, KREUTZBERG et al., 1989, KREUTZBERG, 1995, RAIVICH et al., 1999, BRONSTEIN et al., 2013). Im posttraumatischen Zustand kommt es zu einer von Mitogenen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren modulierten MG-Proliferation (GIULIAN und INGEMAN, 1988, RAIVICH et al., 1994, KIERDORF und PRINZ, 2013).

Nach amöboider Fortbewegung zum Verletzungsherd verändern MG ihre Morphologie (LING, 1979, JORDAN und THOMAS, 1987, MORRISON und FILOSA, 2013, WALKER et al., 2014). Die Sekretion von Stickstoffmonoxid und pro-inflammatorischen Zytokinen zieht weitere MG und Entzündungszellen aus dem peripheren Blut an (RAIVICH et al., 1998, GARDEN und MOLLER, 2006, LONDON et al., 2013). Von MG freigesetzte, anti-inflammatorische Zytokine führen nach der Phagozytose von Zellfragmenten bzw. Fremdkörpermaterial sowie dem Rückgang des Geschehens zur selbst-induzierten Apoptose (STREIT, 2002, GARDEN und MOLLER, 2006).

Ebenso wie AZ können auch MG über MHC Fremd-Antigene präsentieren und interagieren so mit T-Lymphozyten (WILLIAMS et al., 1995, ALOISI et al., 1999, RE et al., 2002). Widersprüchlich ist jedoch, dass eine Interaktion nicht unbedingt zwischen MG, sondern

anderen Makrophagen des ZNS und T-Zellen ablaufen soll (FORD et al., 1995).

Für die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) als Modell für multiple Sklerose sind aktivierte und über MHC Antigen-präsentierende MG und infiltrierte Lymphozyten charakteristisch (LASSMANN et al., 1994, ALMOLDA et al., 2011).

Diskutiert wird, ob eine AZ-mediierte T-Zell-Proliferation zur Entstehung der EAE beiträgt und MG zur Apoptose von T-Lymphozyten und damit zur Reduktion des immunologischen Prozesses im ZNS führen (KLYUSHNENKOVA und VANGURI, 1997).

2.6. Virale Einflüsse auf Gliazellen

Zahlreiche, das ZNS infizierende Viren besitzen das Potential, mittels zytolytischer Eigenschaften und Modulation des zellulären Metabolismus oder von immunologischen Reaktionen neuronales Gewebe zu zerstören und somit ZNS-Dysfunktionen hervorzurufen.

Exemplarisch löst das Tollwutvirus (**Tab. 2-1**) nach der Infektion von Neuronen durch bestimmte Mechanismen deren Apoptose aus (FU und JACKSON, 2005). Da vorrangig hippocampale Nervenzellen betroffen sind, manifestieren sich Verhaltensänderungen und Aggressionen (HORGAN und MCKINNON, 1937).

Neben der Infektion von Neuronen spielen auch virale Einflüsse auf GZ eine entscheidende Rolle. Zentralnervöse Dysfunktionen zeigen sich bei Wiederkäuern, die im fetalen Stadium mit dem Akabane-Virus, einem dem Schmallenberg-Virus verwandten Bunyavirus, infiziert werden. Während Neuronen und Astrozyten als Hauptzielzellen gelten und folglich degenerieren, werden MG nicht infiziert (KITANI et al., 2000).

Andere Viren sind darüber hinaus in der Lage, besonders im Hippocampus MG zu aktivieren und so aufgrund der zytotoxischen Zytokin-Effekte auf Neuronen Kognitions- und Lerndefizite zu verursachen (ELMORE et al., 2014).

Derartige von MG ausgeschütteten Zytokine oder dadurch ausgelöste Immunreaktionen können direkt Myelin zerstören oder OZ schädigen, wie bei der Staupe beschrieben. Die Folge ist eine fehlerhafte Myelinisierung (VANDELDELDE et al., 1981, STEIN et al., 2004).

Beim Hund führt die Infektion mit dem Staupevirus (Canine Distemper Virus) (**Tab. 2-1**) zu einer Meningoenzephalitis-assoziierten Dysmyelinisierung (FANKHAUSER, 1982). Dabei werden mehr AZ als OZ infiziert (VANDELDELDE et al., 1985, MUTINELLI et al., 1989, PEARCE-KELLING et al., 1990). Dennoch kommt es zur Beeinträchtigung von OZ mit veränderter Morphologie, metabolischen Dysfunktionen sowie reduzierter Bildung von Myelin (SCHOBESBERGER et al., 2002, GRABER et al., 1995, ZURBRIGGEN et al., 1993).

Als weiteres Beispiel für Virus-induzierte Neuroglia-Störungen ist die Maus-Hepatitis-Virus-(MHV-) Enzephalomyelitis zu nennen. Dieses Modell beschreibt die Demyelinisierung grundsätzlich als Folge von OG-Schädigung (BARAC-LATAS et al., 1997). In der akuten Krankheitsphase können jedoch auch MG vom MHV infiziert und aktiviert werden. Zusätzlich kommt es im chronischen Stadium zur Phagozytose von Myelin und folglich zu einer chronischen, entzündlichen Entmarkung (CHATTERJEE et al., 2013). Auch AZ sind in die Pathogenese der MHV-Infektion involviert und werden als Virus-Reservoir betrachtet. Ihre Infektionsrate erhöht sich im Verlauf von asymptomatischen zu paralytischen Zuständen (PERLMAN und RIES, 1987).

AZ sind ebenso Zielzellen des Epstein-Barr-Virus (EBV), eines humanpathogenen Herpes-Virus. Sie gelten als Komponente der EBV-Pathogenese im Gehirn (MENET et al., 1999). Des Weiteren wird die EBV-Infektion mit der Pathogenese der Multiplen Sklerose in Zusammenhang gebracht (BAGERT, 2009, POPOVA et al., 2014).

Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass aufgrund der ausgeprägten Komplexität des Gehirns virale Infektionen von GZ und Neuronen weitreichende Auswirkungen auf unterschiedliche ZNS-Funktionen zur Folge haben können.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Versuchstiere

Grundlage aller Untersuchungen dieser Studie waren Lewis-Ratten aus der Versuchstierzucht des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit in Tübingen.

3.1.2. Virus

Die fünfte Rattengehirn-Passage des BDV-Strangs He/80 fand zur Infektion der Versuchstiere Verwendung. Dieser wurde 1980 in Gießen (Hessen) aus dem Gehirn eines spontan an BD erkrankten Pferdes isoliert sowie zweimal durch Kaninchen-Gehirn, durch Zellkulturen (embryonale Kaninchen-Gehirnzellen; MDCK-Zellen) und zweimal durch Gehirne neonataler Ratten passagiert (HERZOG und ROTT, 1980). Nach Homogenisierung folgte die Herstellung einer 10%igen Hirnsuspension mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS).

3.1.3. Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
BDV-Antigen (Nukleoprotein p38) [Mouse-anti-BDV p38/40 protein 38/17C1]	1:1000	Prof. Dr. L. Stitz, FLI
Saures Gliafaserprotein (GFAP) [Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein]	1:2000	Dako 00076531
Oligodendrozyten (Olig2) [Anti-Human Olig2 Rabbit IgG]	1:50	IBL Co., Ltd 0B-607
Mikroglia/Makrophagen (Iba1) [Anti-Iba-1 Polyclonal Rabbit]	1:400	Wako Chemicals 019-19741

3.1.4. Lösungen, Chemikalien und Puffer

3.1.4.1. Alkoholreihe

Chemische Verbindung	Hersteller
Xylol	Xylol reinst. (Isomergemisch) [VWR 28975360]
100%iger Alkohol	Ethanol 99,5 % (V/V) mit 1 % Petrolether vergällt [Merck 1009832511]
96%iger Alkohol	Ethanol 96 % (V/V) mit 1 % Petrolether vergällt [Merck 1009832511]
70%iger Alkohol	Ethanol 70 % (V/V) mit 1 % Petrolether vergällt [Merck 1009832511]
Aqua dest.	hier: VE-Wasser (vollentsalzt)

3.1.4.2. Standardfärbung

Lösung	Chemikalien/Hersteller
Hämalaun	Mayers Hämalaunlösung [Merck 1.09249.2500]
Eosin	Eosin G 1 % [Certistain [®] , Merck 1.15935.0100]
70%iger HCl-Alkohol	50 ml Salzsäure [Merck 1.09970.0001] in 2 l 70%igem Alkohol

3.1.4.3. Spezialfärbungen

Lösung	Chemikalien/Hersteller
1%ige KV-Lösung	0,1 g Kresylechtviolett [Certistain [®] , Merck 15947] in 100 ml Aqua dest. und 1 ml 10%iger Essigsäure (1 ml Eisessig [Merck 1.00063.1000] in 9 ml Aqua dest.)
1%ige Essigsäure	1 ml Eisessig [Merck 1.00063.1000] in 99 ml Aqua dest.
Luxol-Fast-Blue-Lösung	0,1 g Luxolechtblau MBS [Chroma 1B389] in 100 ml 96%igem Alkohol und 0,5 ml 10%iger Essigsäure
0,05%ige Lithiumcarbonat-Lösung	0,05 g Lithiumcarbonat [Merck 5680] in 100 ml Aqua dest.

3.1.4.4. Immunhistochemische Färbungen

Lösung/Puffer	Chemikalien/Hersteller
Citratpuffer	Dako Target Retrieval Solution 10X Concentrate 10072000 1:10 in Aqua dest. (Milli-Q)
TBST-20X (Tween-Waschpuffer)	Tris Buffered Saline with Tween 20 [DCS Innovative Diagnostik-Systeme WL583C2500]
Ultravision Hydrogen Peroxide Block	Thermo Scientific® 02Q130729
Primary Antibody Dilution Buffer	Dako REAL™ Antibody Diluent 20000831
Primary Antibody Enhancer	Thermo Scientific® LPB121107
HRP Polymer	Thermo Scientific® LPH121108
DAB-Lösung	3,3'-Diaminobenzidin (frisch angesetzt: 20 µl DAB Plus Chromogen 50X HCX [Thermo Scientific® HCX120801A] in 1 ml DAB Plus Substrate [Thermo Scientific® HSX120801A])
Hämalaun für Immunhistochemie (IHC)	25 ml Mayers Hämalaunlösung [Merck 1.09249.2500] in 225 ml Aqua dest. (Milli-Q)

3.1.4.5. Eindeckmittel

Eindeckmittel	Chemikalien/Hersteller
Eukitt®	O. Kindler GmbH & Co 5347510

3.1.5. Gebrauchsmaterial und Geräte

Material/Gerät	Hersteller
Ausgießapparat	Shandon, Histocentre 2
Ausgießformen aus Stahlblech	TissueTek
Brutschrank 57 °C	Memmert, Modell 400
Dampfgarer	Braun, MultiGourmet
Deckglas (24 x 50 mm)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Einbettautomat	Shandon, Citadel 1000
Einbettkapsel aus Kunststoff	R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik
Foto-Kamera	Leica DFC480R2
Licht-Mikroskop	Leica DM5000B
Objektträger (76 x 26 mm, geschnitten)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Objektträger (76 x 26 mm, geschliffen)	Starfrost [®] , Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH
Paraffinstreckbad	Pfm WB1000
Paraffinpastillen	Paraffinpastillen; Erstarrungspunkt 56 - 58 °C [Merck]
Pipetten	Gilson (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, jeweils verstellbar)
Schlitten-Mikrotom	Reichert-Jung, Histoslide 2000

3.2. Methoden

3.2.1. Infektion

Die Infektion der Versuchstiere erfolgte am Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. L. Stitz. Dabei wurden Lewis-Ratten innerhalb von 24 Stunden, zumeist weniger als 12 Stunden p. p. für die Dauer von zehn Minuten dem Aerosol einer Virussuspension in einer Begasungskammer ausgesetzt. Lewis-Ratten zeigen im Gegensatz zu anderen Rattenstämmen eine höhere Suszeptibilität gegenüber dem BDV (HERZOG et al., 1991). Der Ausgangstitier der Viruspräparation betrug 5×10^6 focus forming units (ffu) pro ml. Zur Generierung des Aerosols diente ein Vernebler (Pari-Nebulizer®, Pari Respiratory Equipment, Inc.), der Mikropartikel von höchstens 10 µm Durchmesser erzeugt (60 % der Gesamtpartikel sind kleiner als 2,5 µm, 52 % der Gesamtpartikel sind kleiner als 1,2 µm). Aufgrund der idealen Partikelgröße wurde die Virussuspension bis in tracheobronchiale und alveoläre Atemwege inokuliert.

Nach der Infektion blieben die neonatal-Aerosol-infizierten Ratten bis zur Pubertät mit ihren Wurfgeschwistern bei der Mutter. Danach erfolgten die Trennung nach Geschlechtern sowie die Dokumentation klinischer Symptome.

3.2.2. Probenentnahme

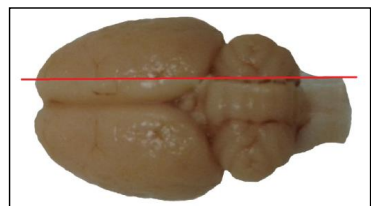
Nach definierten Zeiträumen folgte der Tötung der Ratten unter tiefer Ethernarkose durch Exartikulation des Atlantookzipitalgelenks das Absetzen des Kopfes. Das Gehirn wurde dem Schädel entnommen und in 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert.

3.2.3. Aufarbeitung der Gehirne

3.2.3.1. Paraffin-Einbettung

Die formalinfixierten Gehirne wurden mithilfe einer Skalpellklinge ca. 3 mm rechts parasagittal in Höhe der Hippocampus-Region durchtrennt (entspricht ungefähr der Angabe nach PAXINOS und WATSON, 1998: Lateral 3.40 mm, Figure 86) und die kleinere, rechte Hälfte in einer Kunststoff-Einbettungskapsel positioniert. Im Anschluss erfolgte die maschinelle Entwässerung und Paraffindurchtränkung im Einbettautomaten.

Abbildung 3-1: Schnittebene am Gehirn einer NBAE-Ratte



3.2.3.2. Ausgießen und Aufblocken

Das Ausgießen der Präparate fand manuell am Ausgießapparat statt. Die mit Paraffin durchtränkten Präparate wurden mit der nach unten gerichteten Schnittfläche in die bereits mit etwas flüssigem Paraffin gefüllten Ausgießformen aus Stahlblech gesetzt. Es folgte das Auflegen einer Kunststoff-Einbettkapsel und das Auffüllen mit flüssigem Paraffin. Nach dem Erkalten des Paraffins auf einer gekühlten Metallplatte schlossen sich die Entnahme der Blöcke aus der Gießform und die Lagerung bei Raumtemperatur (RT) an.

3.2.3.3. Paraffinschnitte

Nach einer Kühlung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für ca. fünf Minuten wurden am Schlitten-Mikrotom von jedem Paraffin-Block jeweils ca. $3\text{ }\mu\text{m}$ starke Serienschnitte in Höhe der Hippocampus - Formation angefertigt. Als Grundlage diente zunächst ein raumtemperiertes, anschließend zum Strecken ein $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes Wasserbad (Aqua dest.).

Für Standardfärbungen wurden die Paraffinschnitte auf geschnittene Objektträger (OT), für immunhistochemische auf geschliffene OT aufgezogen und zum Abtropfen mindestens 15 Minuten im Wärmeschrank bei $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.2.4. Vor- und Nachbereitung der Färbungen

3.2.4.1. Entparaffinieren

Der Ablauf des Entparaffinierens mittels absteigender Alkoholreihe erwies sich bei allen Standard-, Spezial- und immunhistochemischen Färbungen als identisch.

Absteigende Alkoholreihe, Durchführung bei RT:

Xylol	12 min
Xylol	12 min
100%iger Alkohol	5 min
100%iger Alkohol	5 min
96%iger Alkohol	5 min
70%iger Alkohol	5 min
Aqua dest.	bis zur weiteren Behandlung

3.2.4.2. Entwässern

Nach Ablauf der Färbegänge wurde das Entwässern der Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe bei allen Standard-, Spezial- und immunhistochemischen Färbungen in gleicher Weise durchgeführt.

Aufsteigende Alkoholreihe, Durchführung bei RT:

70%iger Alkohol	10 sec
96%iger Alkohol	10 sec
100%iger Alkohol	10 sec
Xylol	bis zur weiteren Behandlung

3.2.4.3. Eindecken

Nach allen Färbungen kam es zur manuellen Eindeckung jedes OT mit einem Deckglas und Eukitt®.

3.2.5. Standardfärbung (Hämatoxylin-Eosin-/HE-Färbung)

Um eine Übersicht über das Gehirngewebe zu erhalten, eignet sich besonders die HE-Färbung aufgrund ihrer schnellen und einfachen Durchführung. Diverse Zellstrukturen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu Farbstoffen hervorgehoben werden. Da Zellkerne negativ geladene Phosphatgruppen im Nukleinsäurematerial enthalten, lagern sich positiv geladene Komplexverbindungen des basischen Hämatoxylins an. Durch Leitungswasser färben sich die Kerne anschließend blauviolett. Zytoplasma enthält positiv geladene Bestandteile, wie Proteine, an die Eosin wegen seiner negativen Ladung bindet und sie rosa bzw. eosinophil färbt.

HE-Färbung, Durchführung bei RT:

Absteigende Alkoholreihe	
Hämalaun	5 min
Spülen in Leitungswasser	kurz
Differenzieren in 70%igem HCl-Alkohol	kurz
Bläuen in Leitungswasser	4 min
Eosin	30 sec
Spülen in Leitungswasser	kurz
Aufsteigende Alkoholreihe	
Eindecken mit Eukitt [®]	

3.2.6. Spezialfärbungen

3.2.6.1. Kresylviolett-/KV-/Nissl-Färbung

Die KV-Färbung ermöglicht das Beurteilen von Neuronen und das Schätzen der Zelldichte. Der Farbstoff Kresylviolett bindet sich dabei an basophile Strukturen, d. h. Zellkerne und Nissl-Schollen erscheinen dunkelblau bis blauviolett. Gliazellen und neuronales Zytoplasma färben sich lediglich blassblau, Zellfortsätze bleiben gänzlich ungefärbt.

KV-Färbung, Durchführung bei RT:

Absteigende Alkoholreihe	
Spülen in 1%iger Essigsäure	20 sec
1%ige KV-Lösung	5 min
Spülen in 1%iger Essigsäure	20 sec
Aufsteigende Alkoholreihe (ohne 70%igen Alkohol)	
Eindecken mit Eukitt [®]	

3.2.6.2. Luxol-Fast-Blue-/LFB-Färbung**(Kombinierte Zell- und Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera)**

Die LFB-Färbung dient der Darstellung von Myelinscheiden und dem Nachweis von Demyelinisierung im ZNS. Der basische Farbstoff in saurer, alkoholischer Lösung zeigt eine starke Affinität zu Phospholipiden in den Myelinscheiden. Nach der Überfärbung mit dem tiefblauen Luxol-Fast-Blue erfolgt die Differenzierung mit der basischen, wässrigen Lithiumcarbonat-Lösung, um die graue und weiße Substanz zu unterscheiden. Zur Gegenfärbung und Vertiefung der Myelinfärbung eignet sich z. B. Kresylviolett. Markscheiden erscheinen türkisblau und Zellkerne blauviolett.

LFB-Färbung, Durchführung bei RT:

Absteigende Alkoholreihe (ohne 70%igen Alkohol und Aqua dest.)	
LFB-Lösung	4 h (bei 60 °C)
Spülen in 96%igen Alkohol	kurz
Spülen in Aqua dest.	kurz
0,05%ige Lithiumcarbonat-Lösung	1 min
Differenzieren in 70%igem Alkohol	kurz (bis graue und weiße Substanz abgrenzbar sind, ggf. zurück in Lithiumcarbonat-Lösung)
1%ige Essigsäure	1 min
1%ige KV-Lösung	5 min
Spülen in 1%iger Essigsäure	20 sec
Aufsteigende Alkoholreihe (ohne 70%igen Alkohol)	
Eindecken mit Eukitt®	

3.2.7. Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen bieten die Möglichkeit des qualitativen und quantitativen Nachweises bestimmter Antigen-Strukturen und deren Lokalisation sowie Dissemination im Gewebe. Dabei stellen Antikörper, Enzyme und Chromogene grundlegende Bausteine dar.

Als Grundlage der Durchführung diente ein gebrauchsfertiges polyvalentes Reagenzien-Kit UltraVision LP Large Volume Detection System, HRP Polymer (Ready-To-Use) der Firma Thermo Scientific[®]. Diese immunhistochemische Methode stellt ein indirektes Nachweisverfahren dar.

Dabei kommt es mittels Primary Antibody Enhancer und einem Polymer-System der zweiten Generation zur Amplifizierung des Antikörper-Signals. Zur Erlangung optimaler Ergebnisse wurde eine Verdünnungsstufe mit größtmöglicher, spezifischer Färbeintensität bei kleinstmöglicher Hintergrundfärbung gewählt, je nach Angaben des Herstellers. Im Falle des nicht-kommerziellen Antikörpers gegen das BDV-Nukleoprotein wurden nach Titration ein Proteingehalt von 1,2 mg/ml und eine Verdünnung von 1:1000 ermittelt.

Den einzelnen Protokollen ist zu entnehmen, ob die Proben, abhängig vom verwendeten Antikörper, vorbehandelt wurden.

3.2.7.1. BDV-Nukleoprotein (p38)

Mittels des in diesem Falle verwendeten Antikörpers kann das BDV-Nukleoprotein p38, vom offenen Leserahmen ORF I codiert, dargestellt werden. Bereits in frühen Infektionsstadien ist p38 im ZNS nachweisbar. Die Gehirne aller Tiere wurden auf Anwesenheit des p38 als Indikator für die BDV-Infektion hin untersucht.

BDV-Antigen (p38), Durchführung bei RT:

Absteigende Alkoholreihe	
Spülen mit TBST-20X	kurz
Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen in feuchter Kammer mit 100 µl Hydrogen Peroxide Block beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Antikörper-Lösung (Mouse-anti-BDV p38/40 protein 38/17C1; 1:1000 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent) beschichten	45 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Primary Antibody Enhancer beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl HRP Polymer beschichten	15 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
Mit 100µl frisch angesetzter DAB-Lösung beschichten	3 - 5 min
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Gegenfärben mit Hämalaun für IHC	5 min
Bläuen in Leitungswasser	3 min
Aufsteigende Alkoholreihe	
Eindecken mit Eukitt®	

3.2.7.2. Saures Gliafaserprotein (Glial Fibrillary Acidic Protein/GFAP)

Das saure Gliafaserprotein gehört zu den Intermediärfilamenten. Es wird besonders im Zytoplasma sowohl reifer, reaktiver Astroglia als auch in Ependymzellen des ZNS exprimiert. In Astrozyten bildet das 50 kDa große, filamentöse Protein einen Bestandteil des Zytoskeletts (BIGNAMI et al., 1972, UYEDA et al., 1972). Man geht davon aus, dass GFAP für die Morphologie und Motilität der Astrozyten sowie die Myelinisierung und Integrität der Blut-Hirn-Schranke eine entscheidende Rolle spielt.

Astrozyten (GFAP), Durchführung bei RT:

Absteigende Alkoholreihe	
Spülen mit TBST-20X	kurz
Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen in feuchter Kammer mit 100 µl Hydrogen Peroxide Block beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Antikörper-Lösung (Polyclonal Rabbit Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein 1:2000 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent) beschichten	45 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Primary Antibody Enhancer beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl HRP Polymer beschichten	15 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
Mit 100µl frisch angesetzter DAB-Lösung beschichten	3 - 5 min
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Gegenfärben mit Hämalaun für IHC	5 min
Bläuen in Leitungswasser	3 min
Aufsteigende Alkoholreihe	
Eindecken mit Eukitt®	

3.2.7.3. Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor (Olig2)

Der Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor ist ein basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktor und wird durch das Gen Olig2 kodiert. In der bHLH-Familie existieren darüber hinaus Olig1 und Olig3. Die Expression von Olig2 findet vor allem im ZNS statt, in dem es in verschiedenen Entwicklungsstadien einerseits als neurogener, andererseits als anti-neurogener Faktor wirken kann. Olig2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Oligodendrozyten und Astrozyten sowie von Motoneuronen. Es reduziert indirekt die GFAP-Expression und damit die Astrozytenproliferation (SETOGUCHI und KONDO, 2004).

Oligodendrozyten (Olig2), Durchführung bei RT:

Absteigende Alkoholreihe	
Zur Demaskierung mit Citratpuffer im Dampfgarer vorbehandeln	20 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen in feuchter Kammer mit 100 µl Hydrogen Peroxide Block beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Antikörper-Lösung (Anti-Human Olig2 Rabbit IgG 1:50 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent) beschichten	45 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Primary Antibody Enhancer beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl HRP Polymer beschichten	15 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
Mit 100µl frisch angesetzter DAB-Lösung beschichten	3 - 5 min
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Gegenfärben mit Hämalaun für IHC	5 min
Bläuen in Leitungswasser	3 min
Aufsteigende Alkoholreihe	
Eindecken mit Eukitt®	

3.2.7.4. Ionized Calcium-binding Adapter Molecule 1 (Iba1)

Iba1, auch als Allograft Inflammatory Factor-1 (AIF-1) bekannt, wird durch das gleichnamige Gen kodiert. Im Gehirn wird das Iba1-Gen besonders im Mikroglia-Zytoplasma exprimiert. Iba1 spielt vermutlich bei der entzündungsbedingten Aktivierung und Funktion (Phagozytose) von Makrophagen/Mikroglia eine Rolle. Die Iba1-Expression in Mikroglia wird u. a. in Folge von Nervenschädigung hochreguliert (ITO et al., 1998).

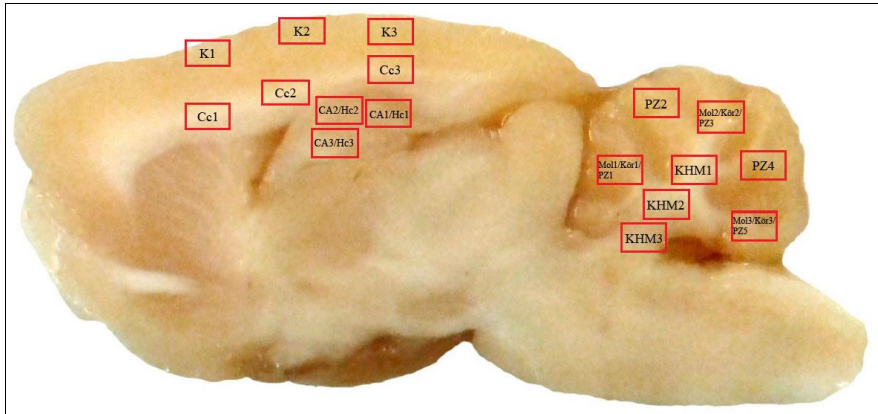
Mikroglia/Makrophagen (Iba1), Durchführung bei RT:

Absteigende Alkoholreihe	
Zur Demaskierung mit Citratpuffer im Dampfgerar vorbehandeln	20 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
Zur Inaktivierung endogener Peroxidasen in feuchter Kammer mit 100 µl Hydrogen Peroxide Block beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Antikörper-Lösung (Anti-Iba-1 Polyclonal Rabbit 1:400 verdünnt mit Dako REAL™ Antibody Diluent) beschichten	45 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl Primary Antibody Enhancer beschichten	10 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
In feuchter Kammer mit 100 µl HRP Polymer beschichten	15 min
Spülen mit TBST-20X	kurz
Mit 100µl frisch angesetzter DAB-Lösung beschichten	3 - 5 min
Spülen mit Aqua dest.	kurz
Gegenfärben mit Hämalaun für IHC	5 min
Bläuen in Leitungswasser	3 min
Aufsteigende Alkoholreihe	
Eindecken mit Eukitt®	

3.2.8. Zelluläre Quantifizierungen

In Abhängigkeit der zu untersuchenden Zellen und der Färbung kamen bei 400-facher Vergrößerung verschiedene Zähl-Methoden zum Einsatz. Ein Hauptgesichtsfeld (HPF, high-power field) entsprach bei der Auszählung einer Fläche von $0,16 \text{ mm}^2$. Pro Färbung wurde ein Schnitt ausgewertet. Im Kortex (Lamina I bis III bzw. IV), Corpus callosum, Hippocampus und in den Kleinhirnschichten galten jene Bereiche als repräsentativ, die die zu untersuchenden Zellen bezüglich Morphologie bzw. immunhistologischer Signalwirkung präzise erkennen ließen.

Abbildung 3-2: Untersuchte Bereiche im Gehirn einer NBAE-Ratte



Schnittfläche ca. 3 mm parasagittal (entspricht ungefähr der Angabe nach PAXINOS und WATSON, 1998: Lateral 3.40 mm, Figure 86); CA = Cornu ammonis (Ammonshorn); Cc = Corpus callosum; Hc = Hippocampus (Bereich neben Ammonshorn); K = Kortex; KHM = Kleinhirnmark; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; PZ = Purkinjezellschicht

Hippocampus: Im Bereich des Ammonshorns wurden die einzelnen CA-Abschnitte 1 bis 3 und der Gyrus dentatus in jeweils einem repräsentativen HPF auf degenerierte Neuronen hin untersucht und deren prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl der Neuronen des Ammonshorns pro HPF festgestellt.

Purkinjezellen: Nach der Auszählung von PZ in jeweils fünf repräsentativen HPF fand daraus die Bildung des Medians statt.

BDV-infizierte Zellen: In Gehirnarealen mit ausgeprägter Infektion wurden in jeweils drei repräsentativen HPF $p38^+$ Zellen numerisch ermittelt. Daraufhin erfolgte mithilfe des Medians die Errechnung ihres prozentualen Anteils an der Gesamtzellzahl aller erkennbaren Zellen (unabhängig vom Zelltyp) pro HPF. Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse jeder Altersgruppe kam der arithmetische Mittelwert der errechneten prozentualen Anteile zum Einsatz.

Gliazellen: Die Ermittlung von Gliazellen fand in jeweils drei repräsentativen HPF im Kortex, Hippocampus und Kleinhirnmak (Astrozyten und Mikroglia) bzw. im Corpus callosum und Kleinhirnmak (Oligodendrozyten) statt. Pro Tier und Altersgruppe wurde daraus der Median gebildet.

Berücksichtigung fanden ausschließlich Astrozyten und Mikroglia mit klar erkennbarem Zellkörper und Ausläufern sowie Oligodendrozyten mit deutlich gefärbtem Zellkern.

4. ERGEBNISSE

Im NBAE-Modell wurden neonatale Lewis-Ratten mit dem BDV über ein Aerosol infiziert. Zu diesem Zeitpunkt war das Immunsystem nicht ausgereift und somit nicht reaktionsfähig bzw. eine Immuntoleranz gegenüber dem BDV induziert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass histopathologische Veränderungen nahezu ausschließlich durch virale Einflüsse direkt oder indirekt hervorgerufen wurden. Folgen einer Immunreaktion wie bei der klassischen BD traten somit in den Hintergrund.

Um eine optimale Darstellung der neuropathologischen Langzeitveränderungen bis zu zwei Jahren zu erreichen, wurden die Tiere in fünf verschiedene Altersgruppen unterteilt und gesunde Kontrolltiere in der unten aufgeführten Tabelle grün unterlegt (**Tab. 4-1**).

Die Angaben zu Alter, Geschlecht und Klinik stellte Herr Prof. Dr. L. Stitz, Leiter des Instituts für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen, bereit.

Um zu eruieren, inwiefern das BDV Einfluss auf zentralnervöse Strukturen ausübte, lagen der semiquantitative Verlauf der Entwicklung von PZ und GZ (Astro-, Oligodendro- und Mikroglia) sowie die Beurteilung der weißen Substanz und der Neuronen im Hippocampus im Fokus der histopathologischen Untersuchungen.

Tabelle 4-1: Versuchstiere

Tier	Alter (d)	Geschlecht
4 bis 6 Wochen		
Lewis NL-4	30	m
BDV neg 4Wo	28	m
6. NL Lewis	42	k. A.
4. NBAE T6	28	k. A.
6. NBAE T7	42	k. A.
19 NBAE.1	28	m
19 NBAE.2	28	m
19 NBAE.3	28	w
4 bis 6 Monate		
Lewis NL 1	190	m
Lewis NL 2	190	m
Lewis NL 3	190	m
Lewis NL 4	190	m
22. NL Lewis	154	k. A.
I BDV NBAE 1 (Nr. 4)	110	k. A.
I BDV NBAE 2 (Nr. 6)	110	k. A.
I BDV NBAE 3 (Nr. 9)	110	k. A.
I BDV NBAE (Nr. 11)	110	k. A.
II BDV NBAE 1 (Nr. 7)	110	k. A.
II BDV NBAE 2 (Nr. 10)	110	k. A.
II BDV NBAE 3 (Nr. 13)	110	k. A.
II BDV NBAE 4 (Nr.14)	110	k. A.
III BDV NBAE 1 (Nr. 5)	110	k. A.
III BDV NBAE 2 (Nr. 3)	110	k. A.
III BDV NBAE 3 (Nr. 12)	110	k. A.
IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)	110	k. A.
BDV NBAE 4 (Nr. 8)	110	k. A.

Tabelle 4-1: (Fortsetzung)

Tier	Alter (d)	Geschlecht
12 bis 15 Monate		
Lewis Kontrolle NL ♀ 1	367	w
Lewis Kontrolle NL ♀ 2	367	w
Lewis Kontrolle NL ♀ 3	367	w
Lewis Kontrolle NL ♂ 1	367	m
Lewis Kontrolle NL ♂ 2	367	m
Lewis Kontrolle NL ♂ 3	367	m
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 1	367	w
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 2	367	w
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 5	367	w
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 1	367	m
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 2	367	m
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 3	367	m
14 NBAE 1	430	m
off VIII NBAE	470	w
19 Monate		
12 NBAE 1	570	m
12 NBAE 2	570	m
13 NBAE 7	580	w
13 NBAE 8	580	w
21 bis 26 Monate		
Lewis 53	680	k. A.
Lewis 61	680	k. A.
Lewis 65	680	k. A.
11 NBAE 8	635	m
IX NBAE 4	735	w
18 NBAE 1	790	w
18 NBAE 2	790	m
18 NBAE 5	790	w
18 NBAE 6	790	w
18 NBAE 8	790	w

BDV = Borna-Disease-Virus; d = Tage; k. A. = keine Angabe; m/♂ = männlich; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen

Klinik: Die klinische Auswertung aller gesunden Kontrolltiere verlief ohne besonderen Befund. Insgesamt waren die NBAE-Tiere ebenfalls klinisch unauffällig. Einzelne ältere Tiere zeigten physische Veränderungen wie stumpfes oder aufgeplustertes Fell, geschwollene Gliedmaßen, leicht erhöhtes Körpergewicht oder mäßigen Körperfettanteil und leichte Kopfschiefhaltung. Lediglich eine NBAE-Ratte erschien desorientiert.

4.1. Standardfärbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung diente dazu, einen Überblick über die histopathologischen Veränderungen zu erhalten. Der Fokus lag auf der Zelldichte von PZ (**Kap. 4.2.1.**), Substanzverlust und entzündlichen Infiltraten.

Kontrolltiere: Die gesunden Kontrolltiere wiesen bis auf vier Ausnahmen keine Alterationen auf. Ein Tier aus der Altersgruppe „12 bis 15 Monate“ (*Lewis Kontrolle NL ♀ 3*) und die drei zweijährigen Kontrolltiere (*Lewis 53, Lewis 61, Lewis 65*) zeigten altersabhängige, geringgradige Vakuolisierungen in der weißen Substanz, besonders im Kleinhirnmark, und einen partiellen Verlust von PZ.

4 bis 6 Wochen: Etwa einen Monat nach der neonatalen, aerogenen Infektion mit dem BDV waren histopathologische Befunde in Form von gering ausgeprägten, perivaskulären, mononukleären Infiltraten zu verzeichnen (*6. NBAE T7, 19 NBAE.1; 19 NBAE.2, 19 NBAE.3*) (**Abb. 4-1**). Bei einem Tier fielen eine leichte Verminderung der PZ-Dichte und eine Vakuolisierung im Kleinhirnmark auf (*6. NBAE T7*).

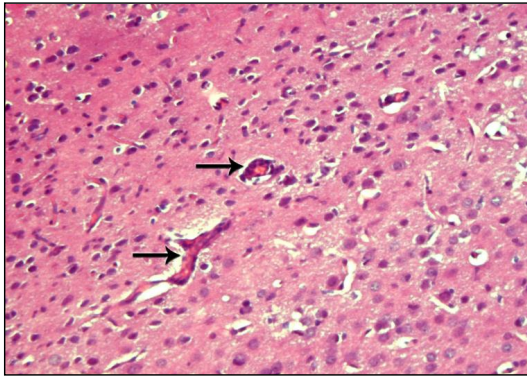
4 bis 6 Monate: In dieser Gruppe war bei nahezu allen Ratten die PZ-Dichte verringert (*I BDV NBAE 2 (Nr. 6), I BDV NBAE 3 (Nr. 9), I BDV NBAE (Nr. 11), II BDV NBAE 1 (Nr. 7), II BDV NBAE 2 (Nr. 10), II BDV NBAE 3 (Nr. 13), II BDV NBAE 4 (Nr.14), III BDV NBAE 1 (Nr. 5), III BDV NBAE 3 (Nr. 12), BDV NBAE 4 (Nr. 8)*). Eine fokale bis diffuse Vermehrung der Gliazellen gab es bei fünf Tieren (*I BDV NBAE 1 (Nr. 4), II BDV NBAE 3 (Nr. 13), III BDV NBAE 2 (Nr. 3), III BDV NBAE 3 (Nr. 12), IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)*). Des Weiteren war bei einem Tier eine Verschmälerung des Kortex und der Kleinhirnschichten auffällig (*II BDV NBAE 4 (Nr.14)*) (**Abb. 4-2**).

12 bis 15 Monate: Bei allen Einjährigen reduzierte sich die PZ-Dichte. Außerdem fiel bei vier BDV-infizierten Ratten eine Verschmälerung der Kleinhirnschichten auf (*BDV Lew Carrier NBAE ♀ 2, BDV Lew Carrier NBAE ♀ 5, BDV Lew Carrier NBAE ♂ 2, BDV Lew Carrier NBAE ♂ 3*). Als weitere Befunde stellten sich Gliosen (*BDV Lew Carrier NBAE ♀ 1, BDV Lew Carrier NBAE ♂ 3*) und ein vakuolenartiger Substanzverlust in der weißen Substanz heraus (*BDV Lew Carrier NBAE ♀ 2, off VIII NBAE*).

19 Monate: In dieser Gruppe verringerte sich die PZ-Zahl. Die weiße Substanz zeigte bei zwei Tieren eine vakuolenartige Veränderung (*12 NBAE 2, 13 NBAE 7*) (**Abb. 4-3**). Bei einem Tier waren multifokal Nekroseherde zu verzeichnen (*12 NBAE 1*) (**Abb. 4-4**).

21 bis 26 Monate: Der Verlust von PZ war in dieser Gruppe ausgeprägt. Außerdem fielen die starke Vermehrung von Gliazellen und ein vakuolentiger Substanzverlust auf. Zusätzlich zeigte ein Tier einen Hydrocephalus internus bei verringerter Kortexbreite (*18 NBAE 2*) (**Abb. 4-5**).

Abbildung 4-1



„4 bis 6 Wochen“ (*19 NBAE.1*):
perivaskuläre, mononukleäre
Infiltrate (Pfeile)
(HE, 200-fache Vergrößerung)

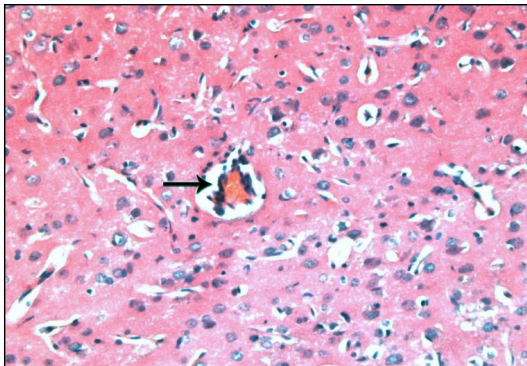
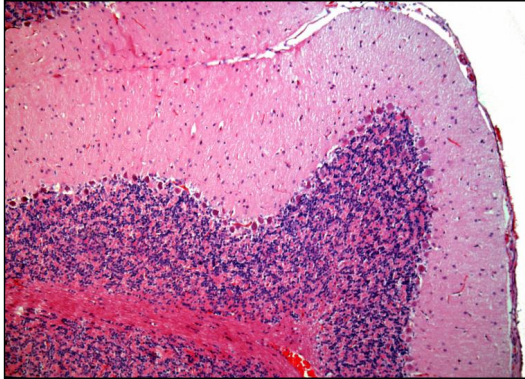
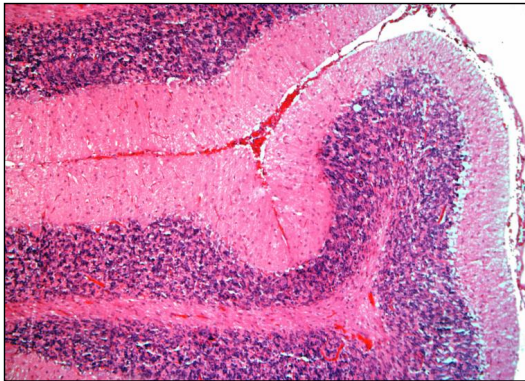


Abbildung 4-2

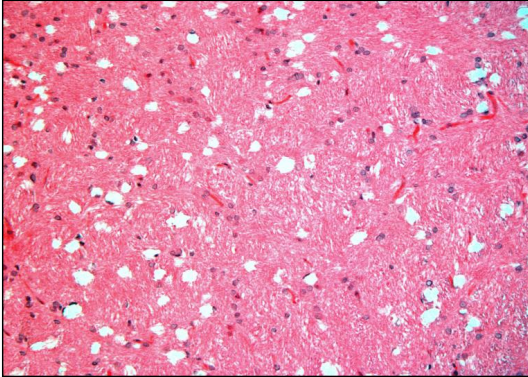


„4 bis 6 Monate“ (*Lewis NL 2*):
Kleinhirnschichten einer gesunden
Ratte mit physiologischer Breite
(HE, 200-fache Vergrößerung)



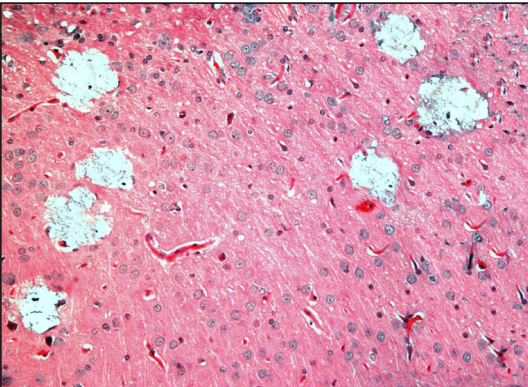
„4 bis 6 Monate“
(*II BDV NBAE 4 (Nr. 14)*):
BDV-infizierte Ratte mit
verschmälerten Kleinhirnschichten
(HE, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-3



„19 Monate“ (12 NBAE 2):
vakuolenartiger Substanzverlust
bei BDV-Infektion
(HE, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-4



„19 Monate“ (12 NBAE 1):
Nekroseherde bei einem
BDV-infizierten Tier
(HE, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-5



„21 bis 26 Monate“ (18 NBAE 2):
erweiterter Ventrikel (V) und
verschmälerter Kortex (K)
(HE, 50-fache Vergrößerung)

4.2. Spezialfärbungen

4.2.1. Neuronen (KV-Färbung)

Das NBAE-Modell zeigt Veränderungen, die vorrangig durch das BDV per se und nicht durch mechanische Einflüsse verursacht werden. Im Gegensatz dazu können andere BDV-Ratten-Modelle Folgen der Läsionen durch die intrazerebrale Virus-Inokulation die Ergebnisse (potentiell) verfälschen bzw. beeinflussen.

Hippocampus: Im Bereich des Ammonshorns im Hippocampus in den einzelnen CA-Abschnitten 1 bis 3 und im Gyrus dentatus fand eine semiquantitative Auswertung degenerierter Neuronen statt (zelluläre Quantifizierung: **Kap. 3.2.8.**; Zähl-Ergebnisse: **Kap. 9., Tab. 9-1**).

Abbildung 4-6: Querschnitt eines Rattengehirns in Höhe des Hippocampus

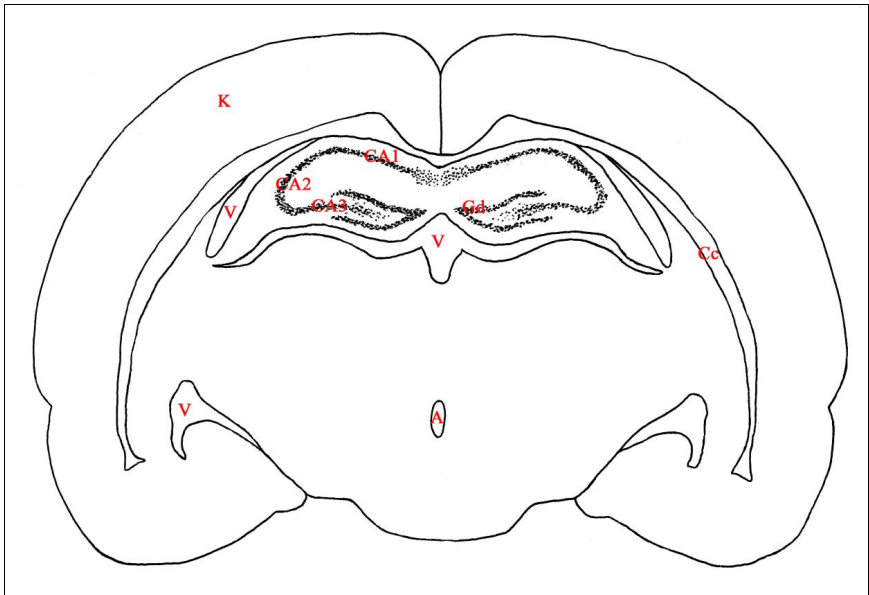


Abbildung modifiziert aus: PELLEGRINO und CUSHMAN, 1967

A = Aquaeductus mesencephali; CA = Cornu ammonis (Ammonshorn); Cc = Corpus callosum; Gd = Gyrus dentatus; K = Kortex; V = Ventrikel

Tabelle 4-2: Ergebnisse der KV-Färbung im Hippocampus

Lokalisation	CA1	CA2	CA3
Tier			
4 bis 6 Wochen			
Lewis NL-4	-	-	-
BDV neg 4Wo	-	-	-
6. NL Lewis	-	-	-
4. NBAE T6	-	-	-
6. NBAE T7	-	-	-
19 NBAE.1	-	-	-
19 NBAE.2	-	-	-
19 NBAE.3	-	-	-
4 bis 6 Monate			
Lewis NL 1	-	3,8	13,0
Lewis NL 2	-	-	-
Lewis NL 3	-	-	9,1
Lewis NL 4	-	-	-
22. NL Lewis	-	-	-
I BDV NBAE 1 (Nr. 4)	-	-	-
I BDV NBAE 2 (Nr. 6)	-	-	69,2
I BDV NBAE 3 (Nr. 9)	-	-	-
I BDV NBAE (Nr. 11)	-	-	13,0
II BDV NBAE 1 (Nr. 7)	13,0	-	-
II BDV NBAE 2 (Nr. 10)	20,0	-	-
II BDV NBAE 3 (Nr. 13)	-	-	4,8
II BDV NBAE 4 (Nr. 14)	-	-	-
III BDV NBAE 1 (Nr. 5)	-	-	-
III BDV NBAE 2 (Nr. 3)	21,1	-	-
III BDV NBAE 3 (Nr. 12)	-	20,0	16,7
IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)	16,7	4,8	-
BDV NBAE 4 (Nr. 8)	-	-	9,1

Tabelle 4-2: (Fortsetzung)

Lokalisation	CA1	CA2	CA3
Tier			
12 bis 15 Monate			
Lewis Kontrolle NL ♀ 1	-	-	-
Lewis Kontrolle NL ♀ 2	-	-	4,8
Lewis Kontrolle NL ♀ 3	-	-	-
Lewis Kontrolle NL ♂ 1	-	-	-
Lewis Kontrolle NL ♂ 2	-	n. a.	-
Lewis Kontrolle NL ♂ 3	-	n. a.	-
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 1	14,3	-	-
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 2	-	-	-
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 5	9,1	-	n. a.
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 1	11,8	-	11,1
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 2	-	-	-
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 3	-	-	-
14 NBAE 1	20,0	-	-
off VIII NBAE	28,6	-	-
19 Monate			
12 NBAE 1	9,1	31,8	54,5
12 NBAE 2	-	-	48,3
13 NBAE 7	33,3	-	33,3
13 NBAE 8	-	-	23,1
21 bis 26 Monate			
Lewis 53	3,2	-	-
Lewis 61	28,6	3,8	9,1
Lewis 65	-	-	-
11 NBAE 8	11,8	-	63,6
IX NBAE 4	72,7	-	-
18 NBAE 1	-	-	-
18 NBAE 2	44,4	-	71,4
18 NBAE 5	33,3	-	-
18 NBAE 6	-	4,8	3,8
18 NBAE 8	-	-	9,1

Angaben in Prozent; BDV = Borna-Disease-Virus; CA = Cornu ammonis (Ammonshorn); m/♂ = männlich; n. a. = nicht auswertbar; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen; - = keine Veränderung; gelb = < 10 % verändert; orange = 10 – 50 % verändert; rot = > 50 % verändert

Kontrolltiere: Bis auf fünf Ratten mit geringem bis mittlerem Degenerationsanteil zeigten die gesunden Kontrolltiere keine veränderten Neuronen im Ammonshorn und Gyrus dentatus (**Abb. 4-7**).

Aus **Tab. 4-2** ist zu entnehmen, dass mit zunehmendem Alter der infizierten Tiere insgesamt ein Anstieg der prozentualen Anteile von deformierten Neuronen vermehrt im CA1 und CA3 auftrat.

Soweit auf den Schnittebenen vorhanden, waren die Zellen des Gyrus dentatus in jeder Altersgruppe dicht gelagert und gut erkennbar mit klarem Zellkern.

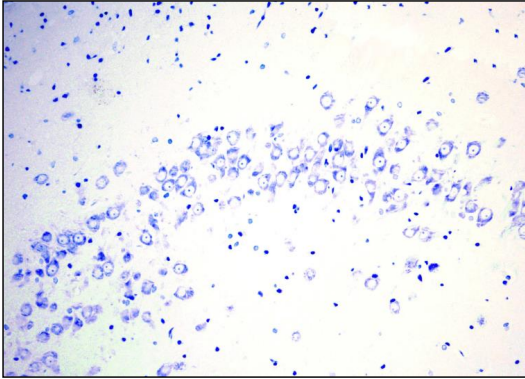
4 bis 6 Monate: In der Gruppe „4 bis 6 Monate“ zeigten sich im Bereich CA1 bei vier von 13 Tieren im Durchschnitt 17,7 % degenerierte Zellen sowie in CA3 bei einem Tier ein sehr hoher Anteil von 69,2 %. Weniger als ein Fünftel war bei zwei weiteren Tieren in CA3 bzw. sowohl im CA2 als auch im CA3 degeneriert.

12 bis 15 Monate: Die Hälfte der einjährigen Ratten hatten im Bereich CA1 und ein Tier zusätzlich in CA3 einen ähnlich großen Anteil wie die der Gruppe „4 bis 6 Monate“ (16,7 %).

19 Monate: Bei allen 19 Monate alten Tieren waren im Durchschnitt 39,8 % der Neuronen im Abschnitt CA3 degeneriert. CA1 und CA2 waren zusätzlich jeweils bei zwei Ratten zu etwa einem Drittel betroffen.

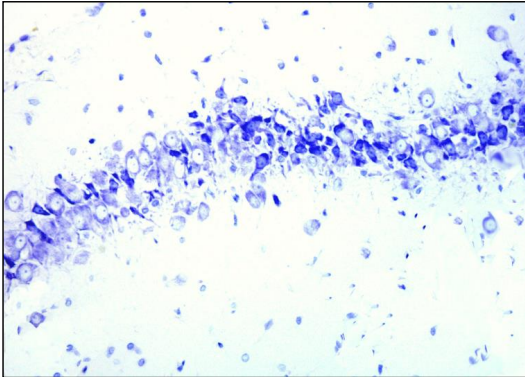
21 bis 26 Monate: Drei von sieben Tieren dieser Gruppe zeigten in CA1 bzw. CA3 einen prozentualen Anteil deformierter Neuronen von über 60 % (**Abb. 4-8**). Bei einem weiteren Tier war ein Drittel im Bereich CA1 degeneriert.

Abbildung 4-7



„21 bis 26 Monate“ (*Lewis 65*):
gesundes Kontrolltier mit intakten
Neuronen im Ammonshorn
(regelmäßige, rundliche Form und
deutliche Darstellung von Nukleus
und Nukleolus)
(KV, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-8



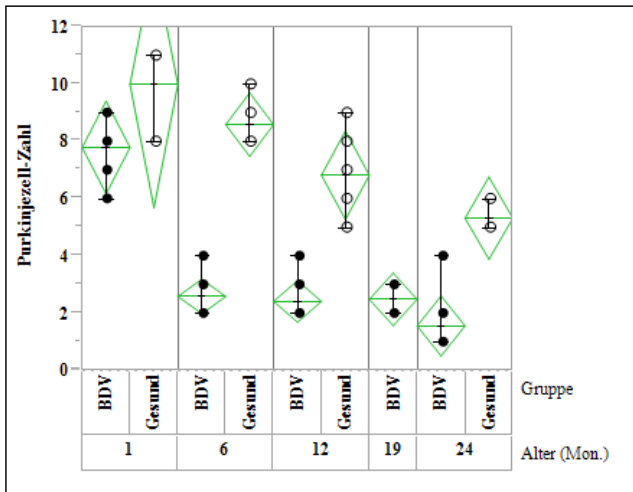
„21 bis 26 Monate“ (*18 NBAE 2*):
BDV-infizierte Ratte mit
degenerierten Neuronen
(unregelmäßige, eckig deformierte
Zellgrenzen und unklar erkennbare
Zellstrukturen bei verwaschener
Färbung)
(KV, 200-fache Vergrößerung)

Purkinjellen: Bisher kam es häufig am Ratten-Modell mit neonataler BDV-Infektion zur Beschreibung einer Verringerung der PZ-Dichte (EISENMAN et al., 1999). Mithilfe der KV-Färbung war die Beurteilung möglich, wie viele PZ durch die BDV-Infektion im Vergleich zum physiologischen Verlust im Verlauf von bis zu zwei Jahren untergehen (zelluläre Quantifizierung: **Kap. 3.2.8.**; Zähl-Ergebnisse: **Kap. 9., Tab. 9-2.**)

Um den physiologischen und den BDV-bedingten Verlust der PZ prozentual zu ermitteln, diente der Median der gesunden Tiere aus Gruppe „4 bis 6 Wochen“ als Bezugswert, ausgehend davon, dass im ersten Lebensmonat eine etwa 100%ige PZ-Anzahl vorhanden ist (ALTMAN, 1972).

Zur Bewertung der Einflussstärke des BDV wurde des Weiteren pro Altersgruppe die Differenz von physiologischem und BDV-bedingtem Verlust gebildet. Aufgrund fehlender Kontrolltiere konnte die Altersgruppe „19 Monate“ bei dieser Auswertung nicht berücksichtigt werden.

Abbildung 4-9: Anzahl der Purkinjellen



BDV = Borna-Disease-Virus-infiziert; Mon. = Monate; PZ = Purkinjezelle; 1 = „4 bis 6 Wochen“; 6 = „4 bis 6 Monate“; 12 = „12 bis 15 Monate“; 19 = „19 Monate“; 24 = „21 bis 26 Monate“

Abbildung 4-10: Verlust der Purkinjenzellen

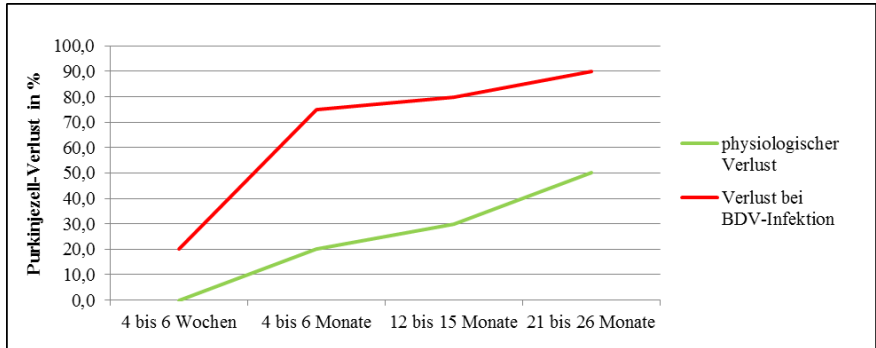
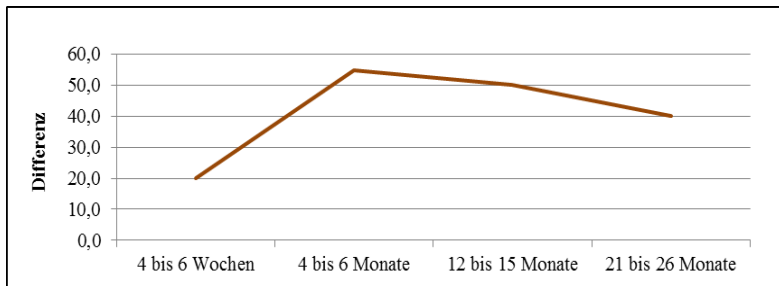


Abbildung 4-11: Differenz von physiologischem und BDV-bedingtem Verlust

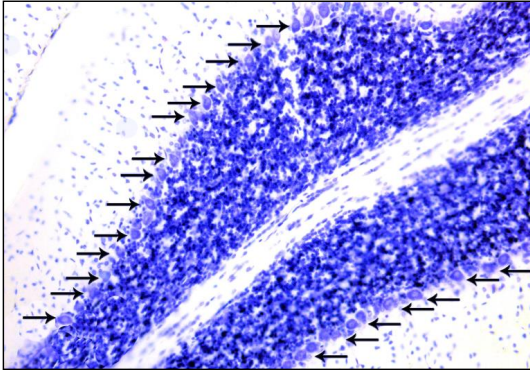


Der physiologische Verlust von PZ stellte sich nahezu linear dar. Beim Anstieg des gesamten PZ-Verlusts blieb bei den NBAE-Ratten in den Gruppen „4 bis 6 Monate“ und „12 bis 15 Monate“ die PZ-Anzahl relativ konstant (**Abb. 4-9** und **Abb. 4-10**).

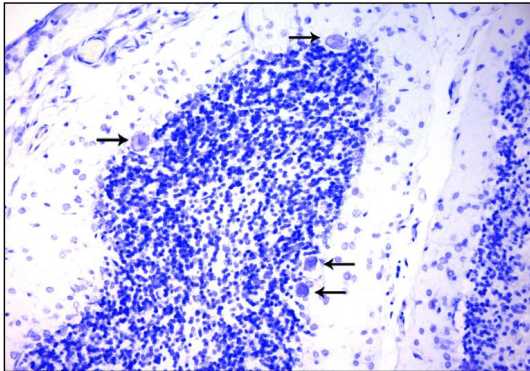
Die Differenz zwischen dem physiologischen PZ-Verlust und dem Verlust durch das BDV zeigte einen Peak in der Gruppe „4 bis 6 Monate“ (**Abb. 4-11**). Diese Tatsache ist möglicherweise als Degenerationsgrad zu deuten, d. h. im Vergleich zu physiologischen Alterungsprozessen kommt es durch das BDV zu einer Verstärkung der Veränderungen.

In **Abb. 4-12** ist der ausgeprägte PZ-Verlust bei einem zwei Jahre alten NBAE-Tier im Vergleich zu einem einmonatigen Kontrolltier deutlich dargestellt.

Abbildung 4-12



„4 bis 6 Wochen“ (6. NL Lewis):
gesundes Kontrolltier mit
physiologischer Purkinjezell-
Dichte (Pfeile)
(KV, 200-fache Vergrößerung)



„21 bis 26 Monate“ (18 NBAE 6):
verringerte Purkinjezell-Zahl
(Pfeile) bei BDV-Infektion
(KV, 200-fache Vergrößerung)

4.2.2. Neuronen und Markscheiden (LFB-Färbung)

Die LFB-Färbung ist eine kombinierte Zell- und Markscheidenfärbung und ermöglicht die Beurteilung des Erscheinungsbildes der Nervenfasern mit ihren Markscheiden und das der Nervenzellen.

Kontrolltiere: Die Gehirne der nicht-infizierten Lewis-Ratten waren bis zu einem Alter von einem Jahr weitestgehend frei von Veränderungen. Nur in einigen Fällen war ein geringer Verlust von Neuronen im Kortex und im Cornu ammonis des Hippocampus zu verzeichnen (*Lewis NL 1, Lewis NL 3, Lewis Kontrolle NL ♀ 2, Lewis 53, Lewis 61*). Weitere Alterungszeichen in Form von einer aufgelockerten Struktur der Nervenfasern wiesen die ein- und zweijährigen gesunden Tiere auf.

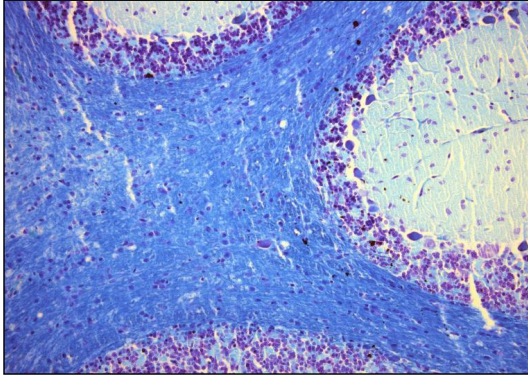
4 bis 6 Wochen: Die einmonatigen Tiere zeigten neben der Bildung von Vakuolen im Kleinhirnmark fokale degenerierte Nervenzellen.

4 bis 6 Monate: In dieser Gruppe waren einige degenerierte Neuronen im hippocampalen Cornu ammonis bei neun Tieren auffällig (*I BDV NBAE 2 (Nr. 6), I BDV NBAE (Nr. 11), II BDV NBAE 1 (Nr. 7), II BDV NBAE 2 (Nr. 10), II BDV NBAE 3 (Nr. 13), III BDV NBAE 2 (Nr. 3), III BDV NBAE 3 (Nr. 12), IV BDV NBAE 1 (Nr. 1), BDV NBAE 4 (Nr. 8)*). Eine weitere Veränderung stellte sich in der aufgelockerten Faserstruktur im Kleinhirnmark und der reduzierten Faserdichte mit erhöhter Zellzahl im gesamten Gehirn heraus (**Abb. 4-13**).

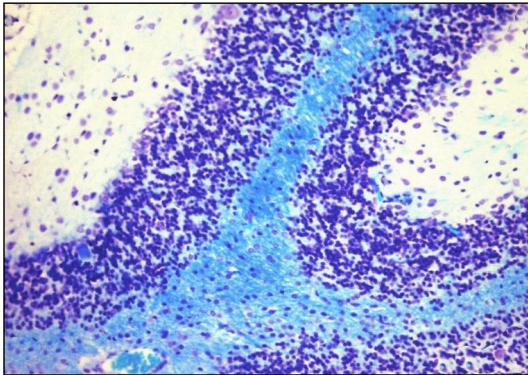
12 bis 15 Monate: Bei diesen Tieren standen die verringerte Faserdichte und die erhöhte Zellzahl im Vordergrund, deutlich erkennbar im Kortex (**Abb. 4-14**). Die einzelnen Fasern wirkten aufgelockert und unstrukturiert. Im gesamten Gehirn fielen fokale degenerierte Neuronen auf, insbesondere im CA-Bereich bei fünf Ratten (*BDV Lew Carrier NBAE ♀ 1, BDV Lew Carrier NBAE ♀ 5, BDV Lew Carrier NBAE ♂ 1, 14 NBAE 1, off VIII NBAE*).

19 Monate und 21 bis 26 Monate: In beiden Altersgruppen war die Faserdichte bei erhöhter Zellzahl merklich verringert. Besonders im Kleinhirnmark fand sich ein vakuolenartiger Substanzverlust (**Abb. 4-15**). Im Kortex und CA-Bereich stellten sich Neuronen irregulär geformt und verschwommen, als Zeichen von Degeneration, dar. Bei fünf Tieren waren perlschnurartige Auflockerungen in der Axon- bzw. Myelinstruktur zu erkennen (*12 NBAE 1, 13 NBAE 7, 13 NBAE 8, 11 NBAE 8, 18 NBAE 6*) (**Abb. 4-16**).

Abbildung 4-13

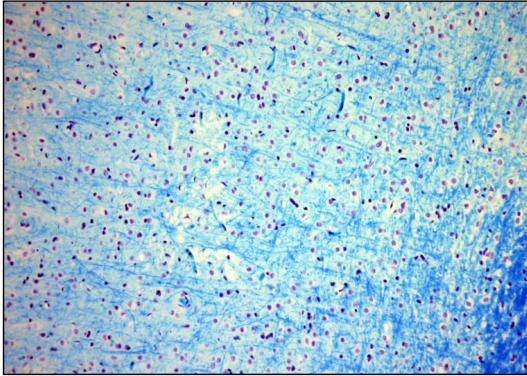


„4 bis 6 Wochen“ (*BDV neg 4Wo*):
Kleinhirnhirnhaut einer gesunden
Ratte
(LFB, 200-fache Vergrößerung)

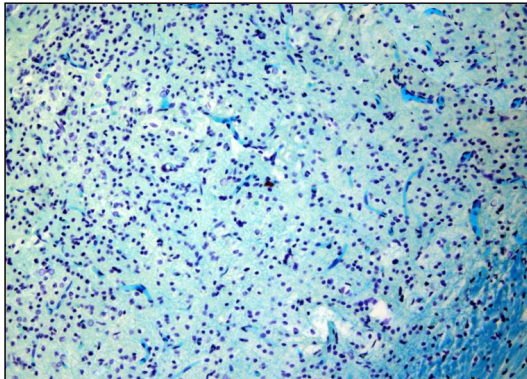


„4 bis 6 Monate“
(*IBDV NBAE 3 (Nr. 9)*):
aufgelockerte Nervenfasern- bzw.
Marscheidenstruktur im
Kleinhirnhirnhaut bei BDV-Infektion
(LFB, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-14

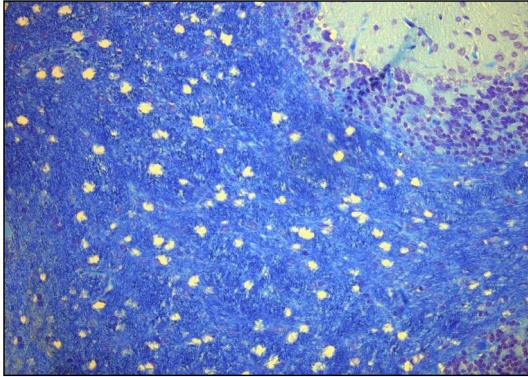


„12 bis 15 Monate“
(*Lewis Kontrolle NL ♂ 1*):
Kortex einer gesunden Ratte
(LFB, 200-fache Vergrößerung)



„12 bis 15 Monate“
(*BDV Lew Carrier NBAE ♂ 1*):
Kortex mit undeutlicher
Nervenfasern- bzw.
Marscheidenstruktur und erhöhter
Zelldichte bei BDV-Infektion
(LFB, 200-fache Vergrößerung)

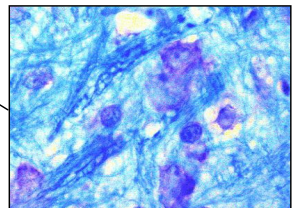
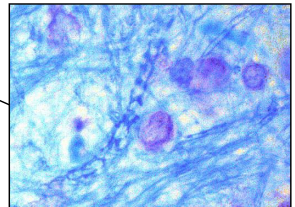
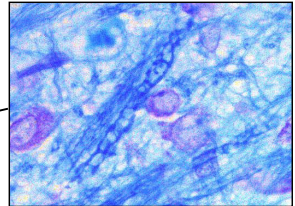
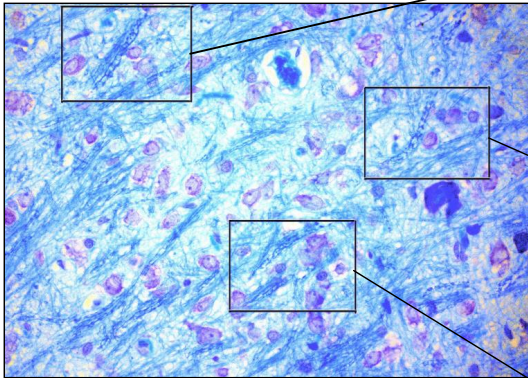
Abbildung 4-15



„19 Monate“ (13 NBAE 7):
vakuolenartiger Substanzverlust im
Kleinhirnmarm einer
BDV-infizierten Ratte
(LFB, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-16

„19 Monate“ (13 NBAE 7):
perlschnurartige Veränderung der Nervenfasern
(LFB, 400-fache Vergrößerung)



4.3. Immunhistochemische Färbungen

4.3.1. BDV-Antigen (p38)

Die hier durchgeführte immunhistochemische Färbung diente dem Nachweis des BDV-Nukleoproteins p38 und der Darstellung der Infektionsausbreitung.

Auf die qualitative Untersuchung des gesamten Gehirns, d. h. der Nachweis der erfolgreichen Infektion, folgte die semiquantitative Begutachtung ausgewählter Gehirnareale. Dazu zählen Kortex, Hippocampus sowie Kleinhirn (zelluläre Quantifizierung: **Kap. 3.2.8.**; Zähl-Ergebnisse: **Kap. 9., Tab. 9-3**).

Tabelle 4-3: Infektionsausbreitung des BDV-Nukleoproteins p38

Lokalisation	K	Hc	CA	KHM	Kör	PZ	Mol
Altersgruppe							
4 bis 6 Wochen	25,7	16,1	64,5	23,0	6,7	52,3	16,3
4 bis 6 Monate	42,7	16,2	68,9	5,0	2,3	43,7	18,3
12 bis 15 Monate	28,3	15,8	63,2	20,7	3,0	38,6	11,9
19 Monate	48,0	21,7	74,0	15,5	9,7	8,3	22,2
21 bis 26 Monate	53,5	33,3	68,4	8,8	9,9	11,9	14,9

Angaben in Prozent; CA = Ammonshorn und Gyrus dentatus (große Neuronen); Hc = Hippocampus (Bereich neben CA); K = Kortex; KHM = Kleinhirnmark; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; n. a. = nicht auswertbar; PZ = Purkinjezellschicht

Abbildung 4-17: Parasagittaler Längsschnitt eines Rattengehirns

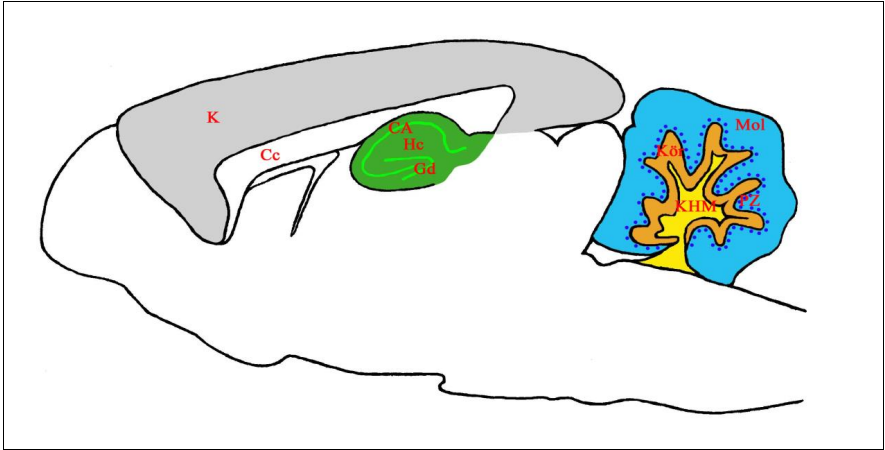
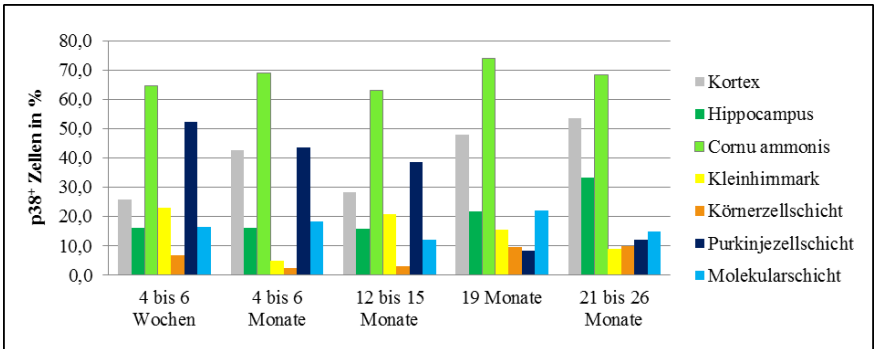


Abbildung modifiziert aus: PAXINOS und WATSON, 1998

Die farblich markierten Bereiche stellen die untersuchten Gehirnareale dar.

CA = Cornu ammonis (Ammonshorn); Cc = Corpus callosum; Gd = Gyrus dentatus; Hc = Hippocampus (Bereich neben CA); K = Kortex; KHM = Kleinhirnrinde; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; PZ = Purkinjezellschicht

Abbildung 4-18: Infektionsrate des BDV-Nukleoproteins p38



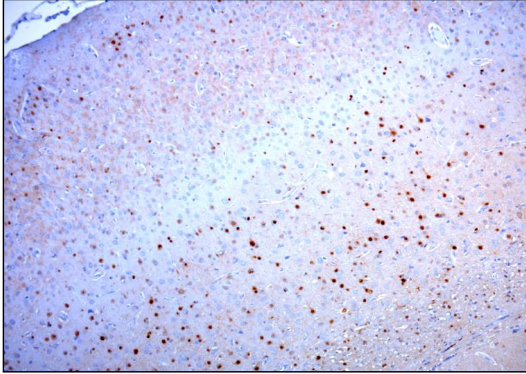
In der immunhistochemischen Färbung zeigte sich, dass das gesamte Gehirn aller NBAE-Tiere BDV-infiziert war. Auffällig war die starke BDV-Infektion der kortikalen äußeren und inneren Körnerschicht (**Abb. 4-19**) sowie des CA-Bereichs des Hippocampus (**Abb. 4-20**) und der PZ (**Abb. 4-21**). Infizierte Zellen wiesen ein deutliches Signal im Zellkern bzw. Nukleolus auf. Insgesamt gab es im Cornu ammonis die höchste Zahl von p38⁺ Zellen.

Die Infektionsrate der Neuronen im Hippocampus stieg in der Gruppe „19 Monate“ leicht an und war bei den Zweijährigen aufgrund degenerierter Zellen wieder reduziert. Der infizierte Anteil erhöhte sich bei verringerter Gesamtzellzahl. Später reduzierte sich dieser, da weniger BDV-positive Zellen vorhanden waren. Zellen, in denen kein BDV detektiert werden konnte, waren größtenteils deutlich degeneriert und somit nicht fähig, BDV-Protein zu exprimieren (**Abb. 4-22**).

Ähnlich verhielt es sich im Kleinhirn. In den Gruppen „19 Monate“ und „21 bis 26 Monate“ war die Infektionsrate im Vergleich zu jüngeren Tieren geringer, da sich noch vorhandene PZ als degeneriert erwiesen (**Abb. 4-23**). Als Ersatz war vermehrt Bergmann-Glia nachweisbar, die in der p38-Immunhistochemie positiv erschien (*12 NBAE 2, 13 NBAE 7, 11 NBAE 8, IX NBAE 4, 18 NBAE 2*). Zusätzlich zeigten sich im Kleinhirnmark bei fünf Tieren die großen Neurone als infiziert (*off VIII NBAE, 13 NBAE 7, 11 NBAE 8, 18 NBAE 1, 18 NBAE 5*).

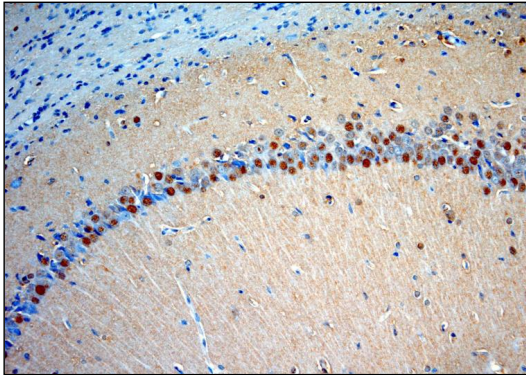
In der Grafik zeigen sich im Bereich des Kortex ebenfalls Schwankungen. Als mögliche Ursache gilt ebenfalls eine verringerte Gesamtzellzahl. Zum anderen ist die Größe des beobachteten Areals zu berücksichtigen. Das bedeutet, dass die Auszählung im Gegensatz zu kleineren, stärker eingrenzbaaren Arealen nicht einheitlich war.

Abbildung 4-19



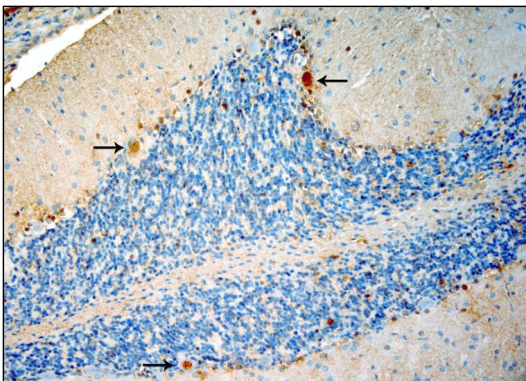
„19 Monate“ (*13 NBAE 7*):
Kortex mit deutlichen,
BDV-infizierten Zellen
(p38, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-20



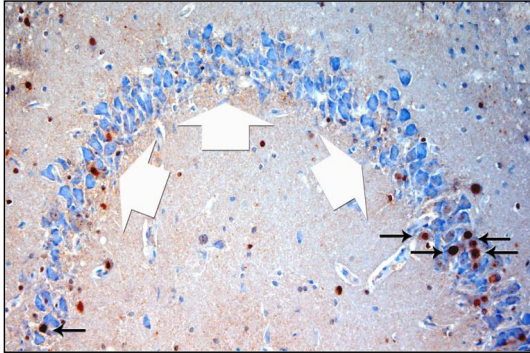
„4 bis 6 Monate“
(*III BDV NBAE 2 (Nr. 3)*):
intakte Neuronen im Ammonshorn
mit deutlichem BDV-Signal
(p38, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-21



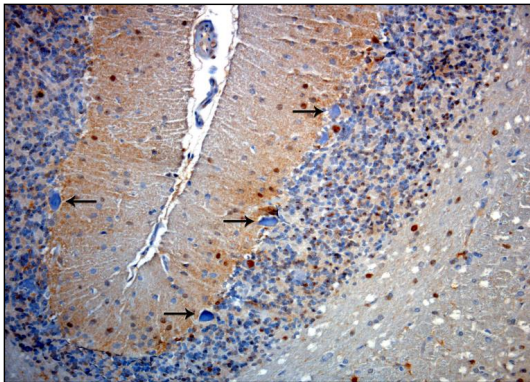
„4 bis 6 Monate“
(*IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)*):
p38⁺ Purkinjezellen (Pfeile) im
Kleinhirn
(p38, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-22



„21 bis 26 Monate“ (*IX NBAE 4*):
 degenerierte Neuronen (weiße
 Pfeile) im Ammonshorn, nur
 einzelne Zellen sind p38⁺
 (schwarze Pfeile)
 (p38, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-23



„21 bis 26 Monate“ (*IX NBAE 4*):
 degenerierte Purkinjezellen ohne
 BDV-Signal (Pfeile)
 (p38, 200-fache Vergrößerung)

4.3.2. Astrozyten (GFAP)

Zur semiquantitativen Bestimmung wurden Astrozyten im Kortex, Hippocampus (Bereich neben dem Ammonshorn) und Kleinhirnmark ermittelt (zelluläre Quantifizierung: **Kap. 3.2.8.**; Zähl-Ergebnisse: **Kap. 9., Tab. 9-4**).

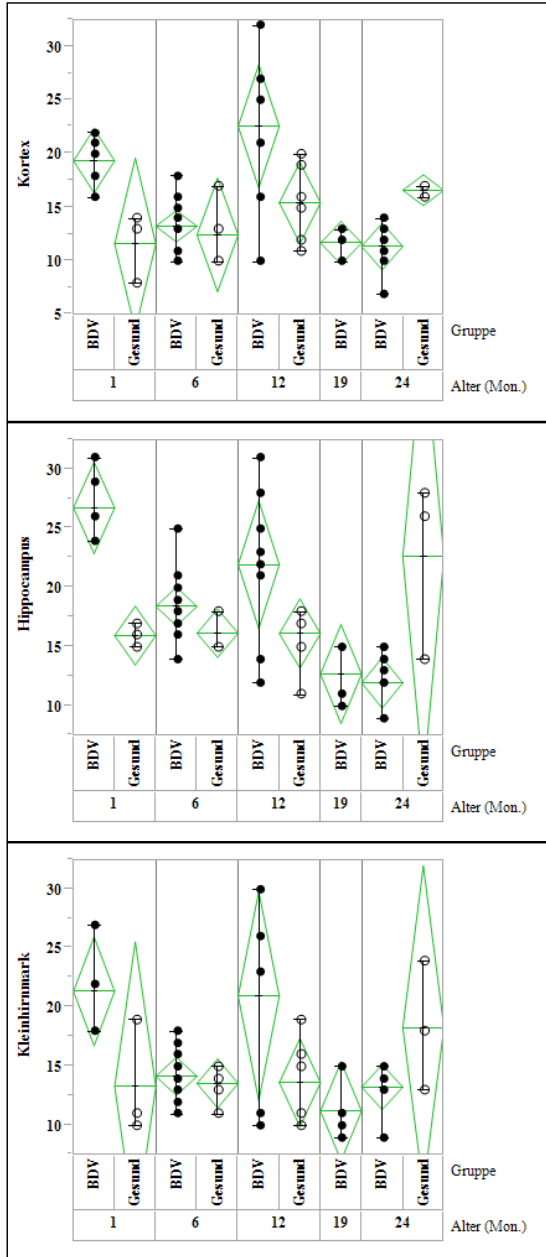
Die aufgeführten Grafiken (**Abb. 4-24**) lassen bei den zweijährigen, gesunden Kontrollen einen Anstieg der Astrozyten-Zahl erkennen. Im Alter ist physiologischerweise neben einer Mikrogliose auch eine Astrogliose möglich (XIE et al., 2013).

Im Vergleich war die Anzahl bei den NBAE-Tieren partiell höher und am stärksten im Hippocampus ausgeprägt. In der Gruppe „12 bis 15 Monate“ zeigte sich ein deutlicher Peak und in den älteren Gruppen ein Abfall unter das Ausgangsniveau.

Generell fiel auf, dass die Färbung im Kortex am schwächsten und im Hippocampus am stärksten ausgeprägt war (**Abb. 4-25** und **Abb. 4-26**).

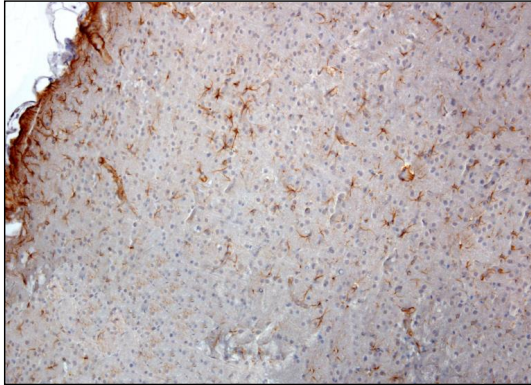
Zur Überprüfung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Astrozyten-Zahl der gesunden und der NBAE-Ratten besteht, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (**Kap. 9., Tab. 9-7**).

Abbildung 4-24: Verlauf der Astrozyten-Zahl

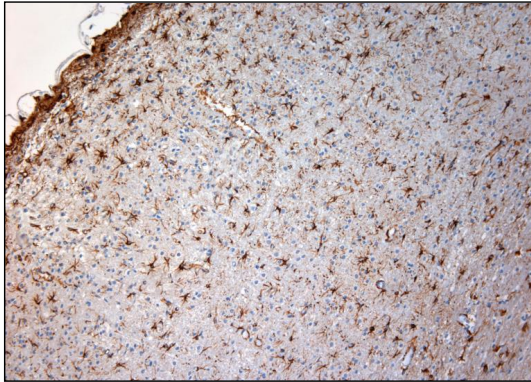


BDV = Borna-Disease-Virus-infiziert; Mon. = Monate; 1 = „4 bis 6 Wochen“; 6 = „4 bis 6 Monate“; 12 = „12 bis 15 Monate“; 19 = „19 Monate“; 24 = „21 bis 26 Monate“

Abbildung 4-25

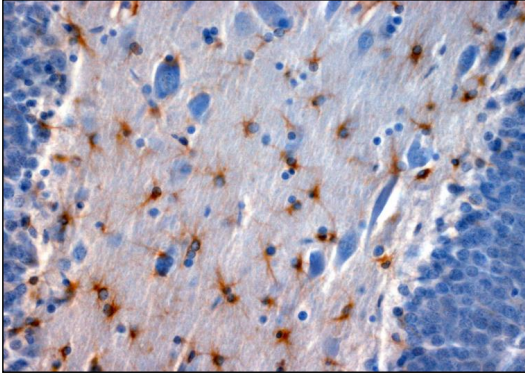


„12 bis 15 Monate“
(*Lewis Kontrolle NL ♀ 3*):
physiologische Dichte von
Astrozyten im Kortex einer
gesunden Ratte
(GFAP, 200-fache Vergrößerung)

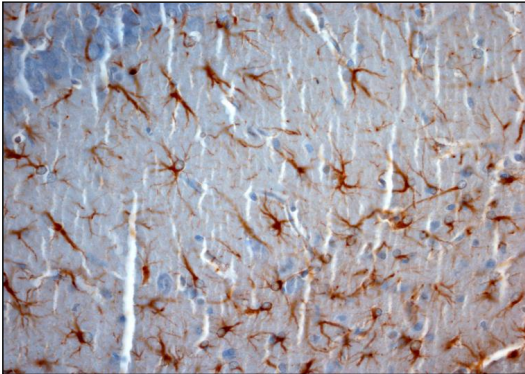


„12 bis 15 Monate“
(*BDV Lew Carrier NBAE ♀ 2*):
erhöhte Astrozyten-Zahl im
Kortex bei BDV-Infektion
(GFAP, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-26



„4 bis 6 Wochen“ (6. *NL Lewis*):
physiologische Dichte von
Astrozyten im Hippocampus einer
gesunden Ratte
(GFAP, 400-fache Vergrößerung)



„4 bis 6 Wochen“ (4. *NBAE T6*):
erhöhte Dichte von Astrozyten im
Hippocampus einer
BDV-infizierten Ratte
(GFAP, 400-fache Vergrößerung)

4.3.3. Oligodendrozyten (Olig2)

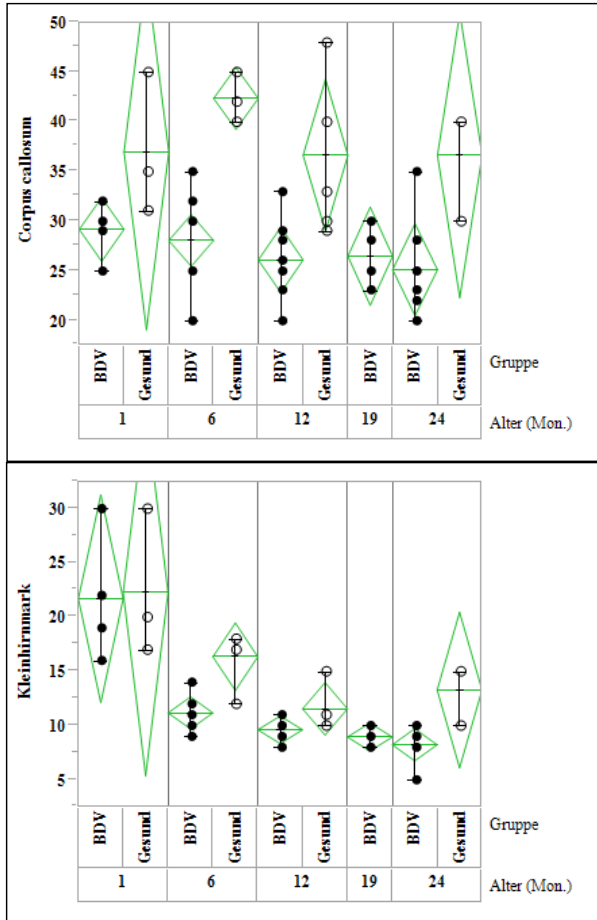
Die Olig2-Färbung wurde durchgeführt, um einen Überblick über die semiquantitativen Veränderungen der Oligodendroglia im Corpus callosum und Kleinhirnmarch im Verlauf von zwei Jahren zu erhalten (zelluläre Quantifizierung: **Kap. 3.2.8.**; Zähl-Ergebnisse: **Kap. 9., Tab. 9-5.**).

Im Corpus callosum ließen sich bei den NBAE-Ratten insgesamt deutlich weniger Olig2⁺ Zellen nachweisen als bei gesunden Tieren. In beiden Fällen blieb jedoch die Oligodendrozyten-Zahl relativ konstant. Zusätzlich fiel in der histologischen Untersuchung eine Verschmälerung des Corpus callosum auf (**Abb. 4-28.**).

Im Kleinhirnmarch war zu Beginn der Messung die Zellzahl bei gesunden und infizierten Tieren gleich. Sie sank bei den älteren Gruppen auf ein niedrigeres, konstantes Level ab, bei den NBAE-Tieren allerdings niedriger als bei den Kontrollen. Möglicherweise besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen dem ausgeprägten Verlust von Oligodendrozyten und dem der PZ sowie der Myelinisierung (**Kap. 5.2.**).

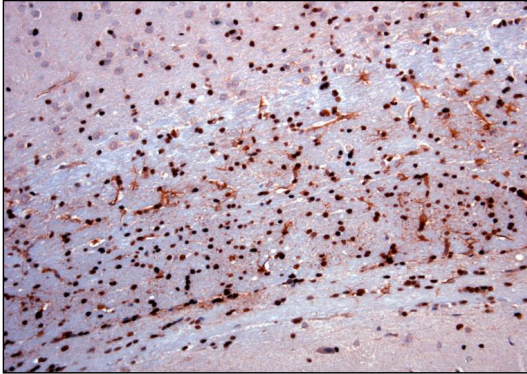
Zur Überprüfung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Oligodendrozyten-Zahl der gesunden und der NBAE-Ratten besteht, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (**Kap. 9., Tab. 9-7.**).

Abbildung 4-27: Verlauf der Oligodendrozyten-Zahl

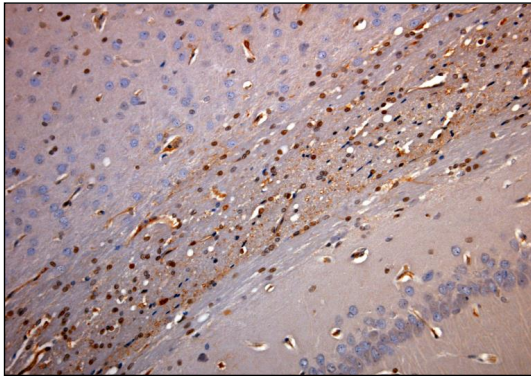


BDV = Borna-Disease-Virus-infiziert; Mon. = Monate; 1 = „4 bis 6 Wochen“; 6 = „4 bis 6 Monate“; 12 = „12 bis 15 Monate“; 19 = „19 Monate“; 24 = „21 bis 26 Monate“

Abbildung 4-28

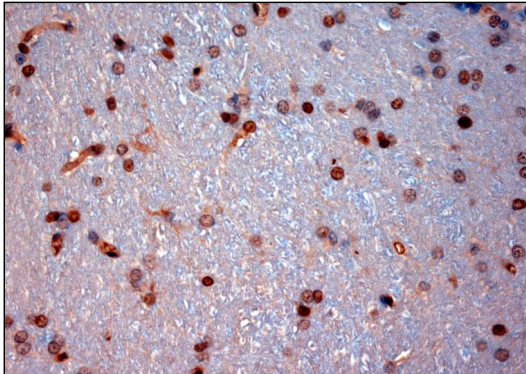


„21 bis 26 Monate“ (*Lewis 6I*):
physiologische Anzahl von
Oligodendrozyten im Corpus
callosum eines gesunden
Kontrolltieres
(Olig2, 200-fache Vergrößerung)

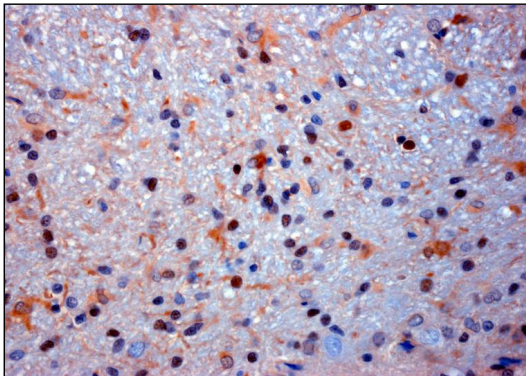


„21 bis 26 Monate“ (*18 NBAE 6*):
Verschmälerung des Corpus
callosum mit verringerter
Oligodendrozyten-Zahl bei einem
BDV-infizierten Tier
(Olig2, 200-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-29



„4 bis 6 Monate“ (*Lewis NL 4*):
Oligodendrozyten-Zahl im
Kleinhirnmak einer gesunden
Ratte
(Olig2, 400-fache Vergrößerung)



„4 bis 6 Monate“
(*II BDV NBAE 2 (Nr. 10)*):
verringerte Anzahl von Olig2⁺
Zellen im Kleinhirnmak bei
BDV-Infektion
(Olig2, 400-fache Vergrößerung)

4.3.4. Mikroglia/Makrophagen (Iba1)

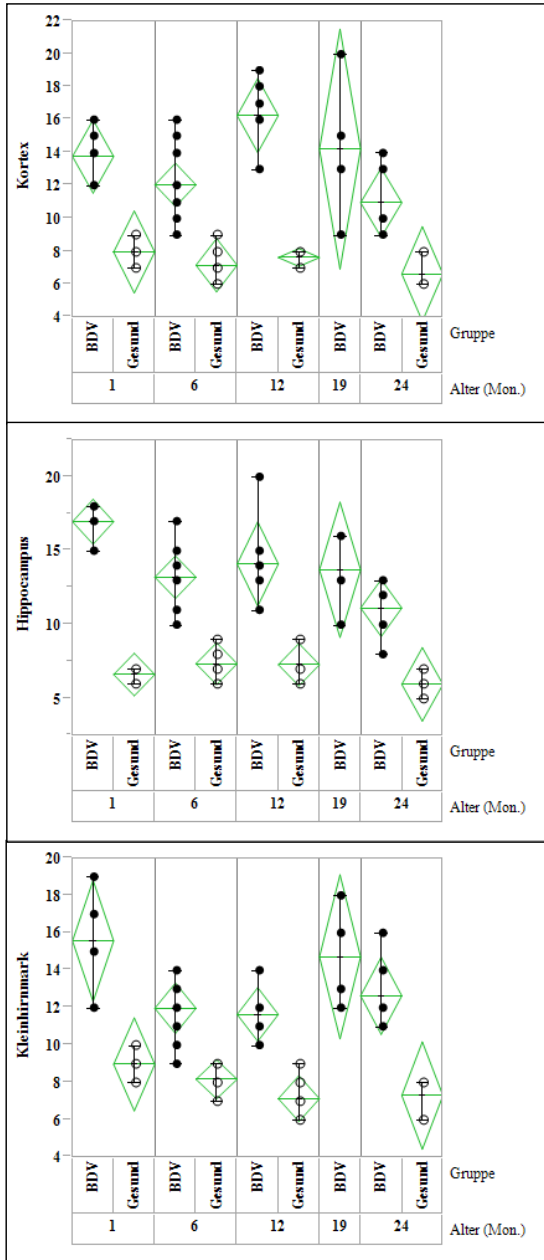
Zur semiquantitativen Bestimmung der Entwicklung der Mikroglia-Population wurden im Kortex, Hippocampus (Bereich neben dem Ammonshorn) und Kleinhirnmark Mikroglia gezählt (zelluläre Quantifizierung: **Kap. 3.2.8.**; Zähl-Ergebnisse: **Kap. 9., Tab. 9-6**).

Gesunde und infizierte Ratten unterschieden sich dahingehend, dass letztgenannte einen höheren Anteil Iba1⁺ Zellen aufwiesen.

Generell fanden sich in der Auswertung der Mikroglia-Zahlen Schwankungen in allen Altersgruppen, wobei die Zahl sowohl bei NBAE-Tieren als auch bei den Kontrollen in der Gruppe „21 bis 26 Monate“ im Kortex und Hippocampus sank (**Abb. 4-30**).

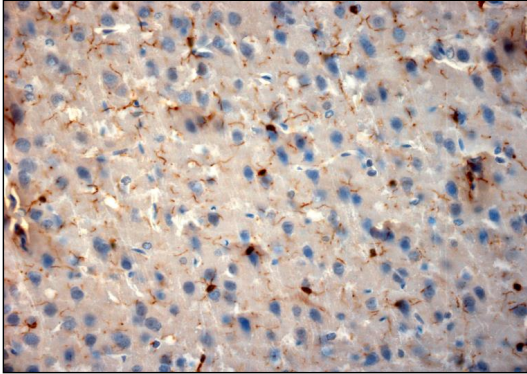
Zur Überprüfung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen der Mikroglia-Zahl der gesunden und der NBAE-Ratten besteht, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt (**Kap. 9., Tab. 9-7**).

Abbildung 4-30: Verlauf der Mikroglia-Zahl

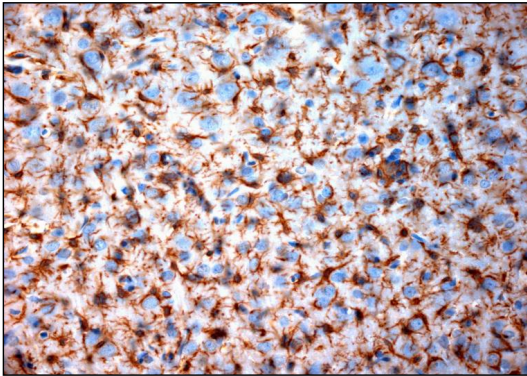


BDV = Borna-Disease-Virus-infiziert; Mon. = Monate; 1 = „4 bis 6 Wochen“; 6 = „4 bis 6 Monate“; 12 = „12 bis 15 Monate“; 19 = „19 Monate“; 24 = „21 bis 26 Monate“

Abbildung 4-31

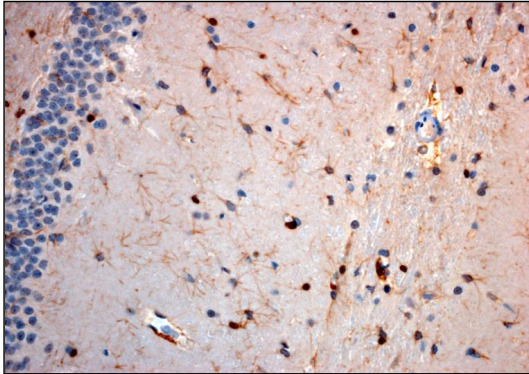


„4 bis 6 Wochen“ (*Lewis NL-4*):
Kortex mit physiologischer
Mikroglia-Dichte
(Iba1, 400-fache Vergrößerung)

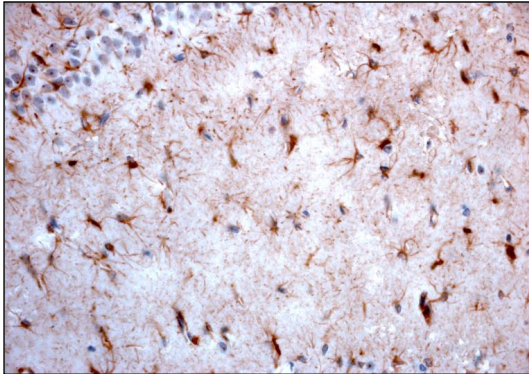


„4 bis 6 Wochen“ (6. *NBAE T7*):
stark erhöhter Anteil Iba1⁺ Zellen
im Kortex bei BDV-Infektion
(Iba1, 400-fache Vergrößerung)

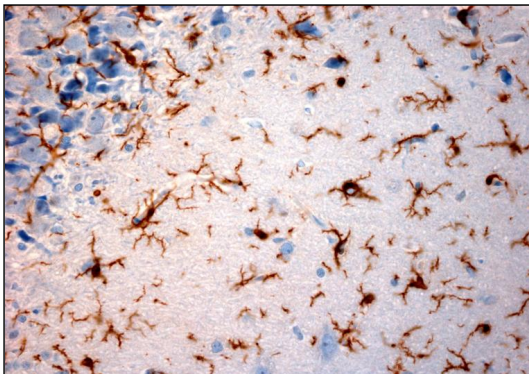
Abbildung 4-32



„12 bis 15 Monate“
(*Lewis Kontrolle NL ♀ 3*):
Mikroglia-Zahl im Hippocampus
einer gesunden Ratte
(Iba1, 400-fache Vergrößerung)

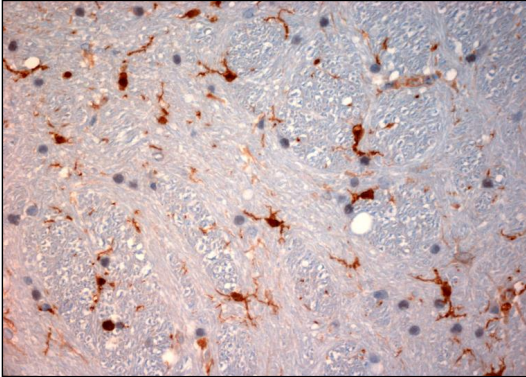


„12 bis 15 Monate“
(*BDV Lew Carrier NBAE ♀ 5*):
BDV-infiziertes Tier mit leicht
erhöhter Mikroglia-Anzahl im
Hippocampus
(Iba1, 400-fache Vergrößerung)

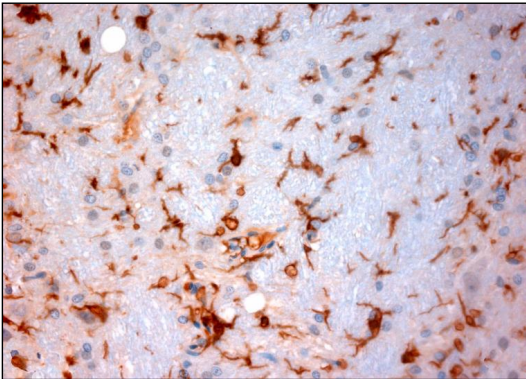


„19 Monate“ (*13 NBAE 8*):
stark erhöhte Mikroglia-Dichte im
Hippocampus bei BDV-Infektion
(Iba1, 400-fache Vergrößerung)

Abbildung 4-33



„21 bis 26 Monate“ (*Lewis 53*):
gesunde Ratte mit physiologischer
Mikroglia-Anzahl im
Kleinhirnmak
(Iba1, 400-fache Vergrößerung)



„21 bis 26 Monate“ (*18 NBAE 8*):
erhöhter Anteil Iba1⁺ Zellen im
Kleinhirnmak einer
BDV-infizierten Ratte
(Iba1, 400-fache Vergrößerung)

5. DISKUSSION

Um das Verständnis von Virus-assoziierten, neuropathogenen Mechanismen zu erweitern, wurden neonatale Lewis-Ratten mit dem BDV über ein Aerosol infiziert. Da die Tiere zum Zeitpunkt der Infektion immuntolerant waren, resultierte eine persistente Infektion ohne gleichzeitige Immunreaktion. Lediglich bei einzelnen NBAE-Ratten traten in den frühen Infektionsphasen gering ausgeprägte, perivaskuläre, lymphozytäre Infiltrate von unspezifischem Charakter auf, die vermutlich vorrangig aus CD4⁺ T-Effektorzellen bestehen. Diese sind wahrscheinlich auf die anlockende Wirkung der Mikroglia auf Entzündungszellen aus dem peripheren Blut zurückzuführen (RAIVICH et al., 1998, GARDEN und MOLLER, 2006, LONDON et al., 2013) (**Kap. 2.5.3.**).

Die histopathologischen Untersuchungen bezogen sich vorrangig auf bestimmte Hirnareale, wie Hippocampus, Kleinhirn und Kortex, sowie auf die quantitative Erueierung der Purkinje- und Gliazellen. Der Fokus lag dabei auf den Langzeitveränderungen bis zu einem Alter von zwei Jahren und dem Vergleich zwischen alterungs- und infektionsbedingten Veränderungen. Zur Optimierung der Auswertung wurden die Ratten in fünf Altersgruppen („4 bis 6 Wochen“, „4 bis 6 Monate“, „12 bis 15 Monate“, „19 Monate“ und „21 bis 26 Monate“) eingeteilt.

5.1. Neuronale Degeneration im Hippocampus und Kleinhirn

5.1.1. Infektionsausbreitung im ZNS

In den bisherigen Arbeiten im Rahmen dieser Studie wurde bereits wenige Tage nach der neonatalen Aerosol-Infektion BDV-Protein p38 in den Neuronen und Gliazellen nachgewiesen (SOLLMANN, 2007, SCHEPERS, 2009, GEHRKE, 2011).

In dieser Doktorarbeit konnte mithilfe der immunhistochemischen Untersuchungen virales Protein im gesamten ZNS bis zu einem Alter von zwei Jahren nahezu ohne immunologische Reaktionen detektiert werden. Dieses Ergebnis belegt die Persistenz des BDV.

Dem BDV wird eine intraaxonale Transmission aufgrund von Studien mit intranasaler Inokulation nachgesagt (CARBONE et al., 1987). Eine BDV-Infektion über Läsionen in der Maulschleimhaut wird zusätzlich in Betracht gezogen (BILZER et al., 1996). Diese Region wird von Fasern des Nervus trigeminus innerviert, der dem Stammhirn entspringt. So ist das Virus in der Lage, retrograd zu wandern und folglich Hippocampus und Purkinjezellen zu infizieren.

Da das BDV in dieser Studie über ein Aerosol aufgenommen wurde und alle Areale infiziert waren, liegt eine rostrakaudale Infektionsroute innerhalb des Gehirns nahe.

Über den Bulbus olfactorius gelangt das BDV in den Hippocampus (CARBONE et al., 1987). Diese beiden Strukturen sind aufgrund der phylogenetischen Entwicklung eng miteinander verbunden. Da vom Hippocampus aus u. a. Moosfasern zu den Körnerzellen und Purkinjezellen im Kleinhirn führen (HAMLYN, 1961), infiziert das BDV auf diesem Weg möglicherweise entsprechende Zellen. Auch bei anderen neurotrophen Viren, wie dem Staupevirus, wird vom Eindringen über die olfaktorischen Nervenfasern in zentrale Gehirnareale berichtet (RUDD et al., 2006).

Nicht auszuschließen ist die Hypothese einer humoralen Wanderung über den Liquor. Nach Aufnahme des BDV über die Nasenschleimhaut könnte es über die Fila olfactoria und den Bulbus olfactorius in den Liquor-Raum übertreten und von dort aus über Kortex und Kleinhirn zentrale Gehirn-Areale infizieren. Für diese Annahme existieren bisher jedoch keine Hinweise in der Literatur.

Es ist hervorzuheben, dass bei der neonatalen BDV-Infektion die postnatale Entwicklung des Monoamin-Systems beeinträchtigt wird und als Ursache für Verhaltensänderungen gelten kann. Besonders postnatal reifende ZNS-Bereiche wie Kortex, Kleinhirn und Hippocampus scheinen anfällig für virale Effekte zu sein (PLETNIKOV et al., 2000). In den Untersuchungen dieser drei Strukturen war der Anteil infizierter Zellen innerhalb der zwei Jahre nahezu gleichbleibend.

Als Folgen neuronaler Degeneration im Hippocampus treten beim Menschen z. B. Gedächtnisstörungen auf (PENFIELD und MILNER, 1958), die in der hier durchgeführten Studie bei den NBAE-Ratten klinisch nicht untersucht wurden.

Die Infektionsrate der hippocampalen Neuronen stieg bei den 19 Monate alten Tieren leicht an und war bei den zweijährigen dagegen niedriger. Die Ursache erklärt sich durch den Anteil degenerierter Zellen. Der infizierte Anteil erhöhte sich bei verringerter Gesamtzellzahl. Später reduzierte er sich, da weniger BDV-positive Zellen vorhanden waren. Zellen, in denen kein BDV detektiert werden konnte, waren größtenteils deutlich degeneriert. Bei vorausgehender Infektion war wahrscheinlich aufgrund der gestörten Zellfunktion die Expression des BDV-Proteins folglich nicht mehr möglich.

Ähnlich verhielt es sich bei den Purkinjezellen. In den Gruppen „19 Monate“ und „21 bis 26 Monate“ war die Infektionsrate im Vergleich zu jüngeren Tieren geringer, da sich noch vorhandene Purkinjezellen als degeneriert darstellten.

Da das Kleinhirn die Motorik koordiniert, waren die Folgen der Purkinjezell-Verluste deutlich in Bewegungsstörungen zu erkennen. Anzunehmen ist, dass NBAE-Tiere vorrangig solche Dysfunktionen zeigen, da Purkinjezellen mit ihren hochspezifischen Aufgaben relativ fragil sind. Je komplexer eine Zelle ist, umso störungsanfälliger wird sie.

Virale Auswirkungen im Hippocampus in Form von zellulären Untergängen waren in den NBAE-Ratten insgesamt geringer ausgeprägt als im Kleinhirn. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der phylogenetisch ältere Hippocampus eine „robustere“ Struktur zu sein scheint.

Im Kortex blieb im Verlauf von zwei Jahren der Anteil infizierter Zellen relativ konstant. Eine konkrete Untersuchung der Kognition fand im Rahmen dieser Studie nicht statt.

5.1.2. Virale Strategie und biologischer Sinn

Neben zahlreichen teils ungeklärten Prozessen wie Epidemiologie und Infektionsweg ist die interessante Frage nach der viralen Strategie und damit der „Sinnhaftigkeit“ der BDV-Infektion aus biologischer Sicht zu klären. Geht man von einem biologischen Sinn aus, der im Allgemeinen auf Überleben und Arterhaltung begründet ist, stellt sich die Frage nach dem Grund einer ausgeprägten Infektion spezieller zentralnervöser Areale wie Hippocampus und Kleinhirn.

Während das limbische System u. a. für Triebverhalten und Emotionen bzw. der Hippocampus für Gedächtnisfunktionen eine bedeutende Rolle tragen, werden dem Kleinhirn u. a. Aufgaben der Bewegungskoordination zugeordnet.

Es ist anzunehmen, dass z. B. das Tollwutvirus sein Überleben sichert, indem es im Hippocampus Verhaltensänderungen in Form von Aggressionen und Beißverhalten auslöst und auf diese Weise übertragen wird. Diskussionswürdig erscheint die Fragestellung, wie sich diese Hypothese auf die BDV-Infektion übertragen lässt. Interessanterweise existieren Gemeinsamkeiten im Genom beider Viren (GOSZTONYI et al., 1993).

In der NBAE-Studie zeigte sich, dass das BDV in einigen Fällen lediglich zur Bewegungseinschränkung führte, während Hinweise auf ein gestörtes Sozialverhalten nicht eindeutig zu finden waren.

Als Folge einer natürlichen BDV-Infektion kommt es insbesondere beim Pferd zu einer ausgeprägten, nicht-eitrigen Meningoenzephalomyelitis, während beim Schaf häufiger latente und subklinische Infektionen auftreten (ZWICK und SEIFRIED, 1925, LUDWIG et al., 1985, GRABNER und FISCHER, 1991).

Dabei ist hervorzuheben, dass es sich in beiden Fällen um Herdentiere handelt und die BDV-Übertragung wahrscheinlich aerogen bzw. über ein Reservoir stattfindet (HILBE et al., 2006, BOURG et al., 2013, DÜRRWALD et al., 2014). Erwähnt werden sollte in diesem Zusammenhang auch, dass NBAE-Ratten wie alle neonatal-infizierten Tiere aufgrund des

toleranten Immunstatus eine kontinuierliche Virusausscheidung zeigen (HERZOG et al., 1984, CARBONE et al., 1993).

Vor diesem Hintergrund ist denkbar, dass eine zu Bewegungseinschränkungen führende, latente Infektion auch eine aerogene Übertragung des BDV innerhalb einer Tiergruppe erleichtert. Das Virus gewährleistet dabei die „Fitness“ des Wirts und schränkt ohne Einfluss des Immunsystems lediglich seine Motilität ein.

Aus „viraler Sicht“ steht eine selektive Infektion von Neuronen in Hippocampus und Kleinhirn für die Bewegungshemmung im Vordergrund. Die nicht-zytolytischen Eigenschaften des BDV sind dabei hervorzuheben. Das Virus verursacht demnach keine Zytolyse, sondern eine Modulation des zellulären Metabolismus. Ein veränderter Stoffwechsel führt im Laufe der persistenten Infektion zwar auch zu zellulären Degenerationen, jedoch zeigt sich ein geringeres Ausmaß aufgrund der Verteilung über einen längeren Zeitraum. So tritt erst in späten Infektionsphasen eine mäßig ausgeprägte Symptomatik in Erscheinung.

Einen Nachteil für das Überleben des BDV stellt dagegen die Pathogenese der klassischen BD dar, die aufgrund der starken Immunreaktion als eine immunologische Dysfunktion auftritt. Bei vielen spontan infizierten Tieren, insbesondere Schafen, wird häufig ein subklinischer Verlauf der BD beobachtet. Diese Tiere zeigen lediglich schwache Immunreaktionen und sind in ihrer Motilität eingeschränkt (BILZER und STITZ, mündliche Mitteilung), was die virale Übertragung erleichtert (siehe oben).

In der Literatur wird darüber hinaus von gestörtem Sozialverhalten BDV-infizierter Ratten berichtet. Anstelle von aktiven Interaktionen folgen sie ihrem Partner auf stereotype Weise (LANCASTER et al., 2007). Dies bedeutet, dass eine Isolation von der Gruppe verhindert wird und so die Möglichkeit der Übertragung aufrechterhalten bleibt.

Während der physiologische Purkinjenzell-Verlust in den Untersuchungen nahezu linear anstieg, kam es bei BDV-infizierten Ratten ebenfalls zu einem zunehmenden Verlust, der in den Altersgruppen „4 bis 6 Monate“ und „12 bis 15 Monate“ relativ gleichbleibend war.

Der physiologische und BDV-bedingte Verlust wurden als Einflussgrößen verglichen. Innerhalb der einzelnen Gruppen ließ sich bei den vier bis sechs Monate alten Tieren ein höherer, viraler Degenerationsgrad aufweisen. Folglich ist diese erhöhte Differenz zwischen den beiden Einflussgrößen so zu deuten, dass das BDV in dieser Gruppe bezüglich der Purkinjenzell-Degeneration besonders „aktiv“ war. Der natürliche, stärker ausgeprägte Bewegungsdrang bei jungen Tieren im Vergleich zu älteren lässt einen kausalen Zusammenhang erkennen. Das BDV erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, aerogen übertragen zu werden.

5.2. Was war zuerst da: die Axonopathie oder die Myelinopathie?

5.2.1. Interaktion von Neuronen und Oligodendrozyten bei BDV-Infektion

Nach der BDV-Infektion immunkompetenter Tiere kommt es bei Neuronen und Astrozyten zur Expression von MHC-I und damit zu deren Zerstörung durch CD8⁺ T-Lymphozyten (PLANZ et al., 1993, BILZER und STITZ, 1994).

Da bei Ratten mit klassischer BD die Infektion von Oligodendrozyten im Gegensatz zu immuntoleranten Tieren eine untergeordnete Rolle spielt (BILZER und STITZ, 1993), liegt durch lymphozytäre Infiltrate die Möglichkeit eines protektiven Effekts auf die weiße Substanz und indirekt auf Neuronen nahe. Für die Immunpathogenese der BD bedeutet dies, dass die fehlende Reaktion auf die weiße Substanz bzw. auf Oligodendrozyten den fortwährenden Schutz nicht-infizierter, noch intakter Neuronen und deren Axone im chronischen Verlauf der Krankheit ermöglicht.

Interessanterweise waren Oligodendrozyten im NBAE-Modell BDV-infiziert und ihr Metabolismus bzw. ihre Funktion scheinbar BDV-moduliert. Im Gegensatz zu Astrozyten und Mikroglia kam es im Verlauf von zwei Jahren nicht zu einer Proliferation von Oligodendrozyten. Bereits zu Beginn der Infektion war deren Anzahl im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren verringert, was sich bis zum Ende der Messung fortsetzte.

In den Untersuchungen zeigte sich im gesamten Gehirn einerseits der Verlust von Myelin, andererseits eine Auflösung sowie perlschnurartige Veränderungen der axonalen Struktur.

Ein deutlicher funktioneller Zusammenhang war im Kleinhirnmark erkennbar. Mit steigendem Verlust der Purkinjezellen erhöhte sich in der weißen Substanz der Anteil vakuolenartiger Strukturen als Zeichen von Myelin-Verlust. Somit korreliert offenbar die Anzahl der Axone mit der Myelin-Dichte.

Dabei stellt sich die Frage, ob Neuronen als Folge der ungeschützten Axone degenerieren, da Oligodendrozyten virusbedingt ihre Funktion einstellen (Dysmyelinisierung). Eine reaktive Demyelinisierung aufgrund von fehlenden Axonen und Neuronen-Verlust ist ebenso möglich. Betrachtet man Neuronen als einzige Hauptzielzellen des BDV, so ist eine induzierte Apoptose Folge von BDV-modulierten, zellulären Vorgängen (HORNIG et al., 1999).

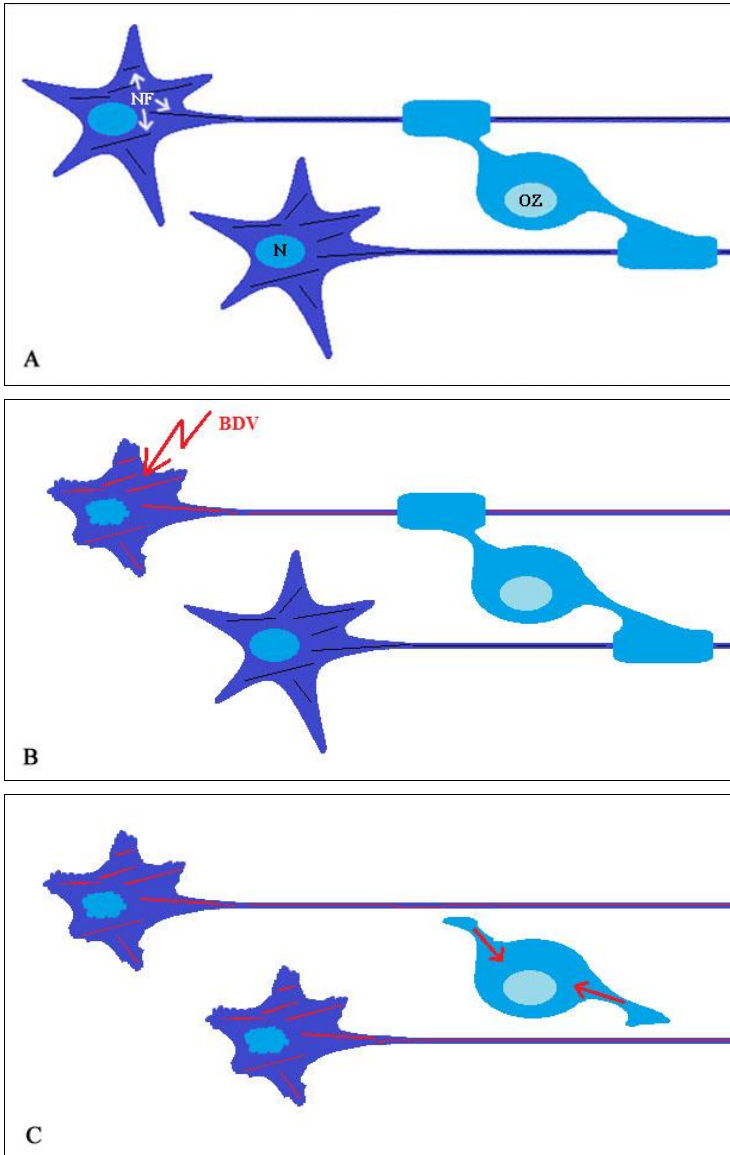
Bei der Infektion mit dem Tollwutvirus manifestieren sich z. B. hochgradige, klinische Erscheinungen als Folge von Virus-induzierten, neuronalen Dysfunktionen und apoptotischen Mechanismen (FU und JACKSON, 2005). Dieses Virus steht weiterhin im Verdacht, die Integrität des Zytoskeletts negativ zu beeinflussen (LI et al., 2005).

Das BDV konkurriert mit dem Proteinkinase C-abhängigen Signalweg in Neuronen (PRAT et al., 2009). Aufgrund dieser Interferenz beeinflusst es die neuronale Plastizität, d. h. die Phosphorylierung und damit die Signaltransduktion.

Ausgelöst durch fehlende Axone und/oder veränderte Signale zwischen Neuronen bzw. deren Neurofilamenten und Oligodendrozyten, lässt sich eine reaktive Hypoplasie von Oligodendrozyten mit herabgesetzter Myelinisierung schlussfolgern. Möglicherweise kann die verringerte Myelinisierung wiederum weitere neuronale Verluste nach sich ziehen. Diese Neuronen degenerieren folglich entweder durch fehlenden Myelin-Schutz oder durch zusätzliche, bereits bestehende BDV-„Belastung“ (**Abb. 5**).

In Abwesenheit einer immunologischen, neurotoxischen Reaktion wurden in diesem NBAE-Modell auch vermehrt Oligodendrozyten infiziert. Neuronen könnten somit sekundär beeinträchtigt werden. Aus der verminderten Myelinisierung lässt sich daher eine Modulation der Oligodendrozyten ableiten. Folglich könnte von einer direkten BDV-Wirkung auf oligodendrogliale Funktionen ausgegangen werden.

Abbildung 5: Mögliche Neuronen-Oligodendrozyten-Interaktion bei BDV-Infektion



BDV = Borna-Disease-Virus; N = Neuron, NF = Neurofilamente; OZ = Oligodendrozyt

A: Neuronen mit intakten Neurofilamenten und myelinisierendem Oligodendrozyt

B: BDV beeinflusst Phosphorylierung der Neurofilamente (primäre Axonopathie)

C: Reaktive Demyelinisierung und Degeneration weiterer Neurone (sekundäre Axonopathie)

5.2.2. Oligodendrogliale Störungen als Ursache neurodegenerativer Krankheiten

Funktionsstörungen von Oligodendrozyten stehen im Verdacht, zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beim Menschen beizutragen. Sie scheinen ein verursachender Faktor im frühen Stadium von M. Alzheimer, der häufigsten Form von Demenz, und bei der autosomal-dominanten Erberkrankung Chorea Huntington zu sein (BANKSTON et al., 2013).

Im Falle der Staupevirus-Infektion geht der Dysmyelinisierung eine primäre Axonopathie mit früh einsetzenden, progressiven Schäden des axonalen Skeletts und Transports sowie partieller Regeneration voraus (LEMPP et al., 2014).

Als Beispiel für eine primäre Myelinopathie ist die MHV-Enzephalomyelitis zu nennen. Hierbei werden Oligodendrozyten aufgrund der Infektion nekrotisch. Bei Oligodendrozyten ohne erkennbares Virus-Signal wird Apoptose induziert. Folge dieser oligodendroglialen Untergänge sind demyelinisierte Läsionen, welche trotz Remyelinisierung mit neuronalem Verlust einhergehen (BARAC-LATAS et al., 1997).

Ob es sich bei der NBAE-Infektion mit dem BDV letztendlich um eine primäre Axonopathie mit sekundärer Myelinopathie oder um den entgegengesetzten Fall handelt, lässt sich nicht eindeutig klären. Gleichwohl ist ein additiver Effekt denkbar. Da sowohl Neuronen als auch Oligodendrozyten infiziert sind, könnten durch eine Virus-Modulation neuronale Apoptose und Oligodendrozyten-Dysfunktion gleichzeitig, theoretisch unabhängig voneinander in Erscheinung treten. Da jedoch ein funktioneller Zusammenhang zwischen Oligodendrozyten und Neurofilamenten besteht und deren Phosphorylierung durch die Myelinisierung reguliert wird (STARR et al., 1996, GOTOW et al., 1999), können beide Vorgänge nicht isoliert voneinander betrachtet werden.

Darüber hinaus sollten dabei die Folgen der Wirkung anderer Gliazellen auf Oligodendrozyten und Neuronen nicht außer Acht gelassen werden. Alterungsbedingt existiert die Evidenz einer Korrelation von Demyelinisierung und Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia (XIE et al., 2013).

Vorstellbar ist in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, dass das BDV eine Trigger-Funktion ausübt und so die neurodegenerativen Veränderungen im Alter aufrechterhält bzw. verstärkt.

5.3. Korrelation von Gliosen und BDV-Persistenz

Generell führt die Schädigung von Nervenzellen zur Aktivierung und Proliferation von Mikroglia und Astrozyten (MCQUARRIE et al., 1978, KREUTZBERG et al., 1989, RAIVICH et al., 1999, BRONSTEIN et al., 2013). Die Dichte dieser Zellpopulationen blieb bei den NBAE-Tieren entweder lebenslang bestehen oder erhöhte sich im Alter.

Nach einer neonatalen BDV-Infektion treten häufig Kognitions- und Lerndefizite als Konsequenz neuronaler Störungen im Hippocampus in Erscheinung. Ursächlich ist dabei nicht nur die persistente, virale Infektion der Nervenzellen sondern auch die Folge einer Virus-induzierten Aktivierung von Mikroglia zu nennen (ELMORE et al., 2014). Möglicherweise hat diese u. a. einen hemmenden Effekt auf die Neurogenese (EKDAHL et al., 2003).

Die in den vorliegenden Untersuchungen gezeigte, anhaltende Mikrogliose kann als Zeichen mobiler Resorption ohne signifikante T-Zell-Reaktion, also als nicht-immunpathogenes Phänomen, interpretiert werden.

Häufig werden akute Gehirntraumata, entzündliche Demyelinisierung, neurodegenerative Erkrankungen und virale Infektionen von einer ausgeprägten Astrogliose begleitet (ENG und GHIRNIKAR, 1994). Jene blieb im NBAE-Modell aufgrund der BDV-Infektion besonders in den ersten drei Altersgruppen bestehen. Des Weiteren war ein Maximum bei den einjährigen NBAE-Ratten zu verzeichnen, welches als ein Zeichen von Regeneration der neuronalen Strukturen gedeutet werden kann. Ein Grund dieser Annahme ist die Unterstützung von Astrozyten beim Wachstum von Axonen sowohl in der Entwicklung als auch im adulten Alter (GAGE et al., 1988, HATTEN et al., 1991, KAWAJA und GAGE, 1991).

Resümierend lässt sich schlussfolgern, dass die BDV-Persistenz und die daraus resultierende, fortwährende Degeneration von Neuronen zur mobilen Resorption durch Mikroglia und zur ausgeprägten Reaktion von Astrozyten führen.

Dabei ist eine virusbedingte Neuron-Glia-Wechselwirkung zu beachten, da reaktive Astrozyten in der Lage sind, die Aktivierung der Mikroglia durch BDV-infizierte Neurone zu vermitteln (OVANESOV et al., 2008). Interessanterweise scheint die BDV-Infektion von Neuronen und Astrozyten ausschlaggebender auf die Mikroglia-Aktivierung zu sein als der direkte Kontakt mit dem Virus oder mit degenerierten Nervenzellen (OVANESOV et al., 2006).

Ungeklärt bleibt, ob in dem NBAE-Modell die Sekretion glialer Substanzen protektiv oder destruktiv auf das Gewebe wirkt. Eine Destruktion würde weitere Schäden hervorrufen und so auf einem gewissen Niveau die Progression der Neurodegeneration mit resultierender Glia-Stimulation wie in einem *Circulus vitiosus* aufrechterhalten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Welche Spuren hinterlässt ein Virus in Abwesenheit von Immunreaktionen, die die Pathogenese im Gehirn beeinflussen würden?

Diesbezüglich befasst sich die vorliegende Dissertation mit den Langzeitveränderungen im Gehirn von Lewis-Ratten aus der NBAE-Studie (newborn aerosol infected). Innerhalb weniger Stunden nach der Geburt erfolgte eine Aerosol-Infektion mit dem Borna-Disease-Virus (BDV).

Das RNA-Virus ist das verantwortliche Agens für die Borna Disease (BD), seit vielen Jahrzehnten als progressive Meningopolioenzephalomyelitis im Wesentlichen bei Pferden und Schafen bestimmter endemischer Gebiete in Zentraleuropa bekannt (LUDWIG et al., 1985, GRABNER und FISCHER, 1991). Zusätzlich steht es im Verdacht, zu neuropsychiatrischen Erkrankungen des Menschen beizutragen.

Das BDV zeichnet sich vor allem durch eine starke Affinität zu Neuronen aus, insbesondere zu denen der Hippocampus-Formation (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984, GOSZTONYI und LUDWIG, 1995, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997).

Während bei der klassischen BD T-Lymphozyten für ausgeprägte, neurologische Symptome verantwortlich sind (PLANZ et al., 1993, BILZER et al., 1995), traten im NBAE-Modell nahezu keine immunologischen Reaktionen auf. Die geringgradige, transiente Infiltration mononukleärer Zellen einzelner NBAE-Tiere ist wahrscheinlich anhand der mikroglialen Sekretion chemotaktischer Substanzen zu erklären. Aufgrund des immuntoleranten Status der neonatalen Ratten während der Infektion konnten die histopathologischen Befunde neben wenigen alterungsbedingten Veränderungen größtenteils auf das BDV per se zurückgeführt werden.

Zur Untersuchung des Gehirngewebes fanden Standard-, Spezial- und immunhistochemische Färbungen statt. Im Fokus standen der semiquantitative Verlauf von Purkinje- und Gliazellen sowie die Beurteilung der weißen Substanz und der Neuronen im Hippocampus.

Die Ergebnisse zeigten, dass jeder Gehirnbereich aller NBAE-Tiere persistent mit dem BDV infiziert war, sehr ausgeprägt im Hippocampus, Kleinhirn und Kortex.

Verglichen mit gesunden Kontrolltieren, waren in den Langzeituntersuchungen eine vermehrte, neuronale Degeneration im Hippocampus sowie ein ansteigender Verlust von Purkinjezellen zu beobachten. Zwischen dem physiologischen und dem BDV-bedingten Purkinjezell-Verlust erwies sich die Differenz, welche als Degenerationsgrad zu deuten ist, in der Altersgruppe „4 bis 6 Monate“ als am größten. In diesem Alter war das Virus demnach besonders „aktiv“.

Da das BDV vermutlich aerogen übertragen wird, hat die Infektion der hippocampalen Neuronen und der Purkinjezellen große Bedeutung für das Überleben des Virus. In diesen Gehirnarealen werden u. a. Verhalten und Motorik gesteuert. Die Hemmung der Bewegung eines (jungen) Tieres erleichtert auf diesem Weg die aerogene Transmission innerhalb einer Herde.

Neben einer verminderten Oligodendrozyten-Zahl und einer daraus resultierenden Verschmälerung des Corpus callosum fiel des Weiteren in der weißen Substanz der NBAE-Ratten eine verringerte Faserdichte auf. Axone bzw. Myelinscheiden stellten sich undeutlich und teils perlschnurartig verändert dar. Vorrangig ließ das Kleinhirnmark einen vakuolenartigen Substanzverlust erkennen. Dieser steht im kausalen Zusammenhang mit dem hochgradigen Purkinjezell-Verlust.

Ungeklärt bleibt, ob es sich bei der NBAE-Pathogenese um eine primäre Axonopathie mit reaktiver Myelinopathie oder um den entgegengesetzten Fall handelt. Durch die virale Modulation ist eine neuronale Apoptose mit gleichzeitiger Oligodendrozyten-Dysfunktion denkbar. Der funktionelle Zusammenhang zwischen den Oligodendrozyten, der Myelinisierung und der Phosphorylierung von Neurofilamenten in Neuronen bzw. Axonen lässt eine isolierte Betrachtung dieser Vorgänge nicht zu.

Darüber hinaus sollten die Folgen der Wirkung anderer Gliazellen auf Neuronen und Oligodendrozyten beachtet werden. Alterungsbedingt ist eine Korrelation von Demyelinisierung sowie Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia möglich (XIE et al., 2013). Die Untersuchungen wiesen eine anhaltende Proliferation dieser Zellpopulationen auf. Die Gruppe „12 bis 15 Monate“ ließ in Bezug auf die Astrozyten-Zahl einen Peak erkennen, der als ein Zeichen von Regeneration zu interpretieren ist.

Die Sekretion diverser, glialer Substanzen kann sowohl einen protektiven als auch destruktiv Effekt auf das Gewebe haben. Eine Destruktion würde weitere Schäden hervorrufen und so im gewissen Maße die Progression der Neurodegeneration mit resultierender Glia-Stimulation wie in einem Circulus vitiosus aufrechterhalten.

Möglicherweise fungiert das persistente, nicht-zytolytische BDV in diesem Zusammenhang als Auslöser für neurodegenerative Veränderungen im Alter.

7. SUMMARY

What kind of footprints would be left by a virus, if there is no immune reaction to influence the pathogenesis in the brain?

In this regard, this work investigates long-term changes in the central nervous system of Lewis rats infected as neonates within a few hours after birth with an aerosol of Borna disease virus (BDV).

BDV as an RNA virus is the causative agent for Borna disease (BD) known as a progressive endemic meningoencephalomyelitis previously in horses and sheep (LUDWIG et al., 1985, GRABNER und FISCHER, 1991). Additionally, it is suspected of being involved in human neuropsychiatric diseases.

BDV is characterized by distinct affinity to neurons, especially of the hippocampus formation (GOSZTONYI und LUDWIG, 1984, GOSZTONYI und LUDWIG, 1995, GONZALEZ-DUNIA et al., 1997).

While classic BD shows severe neurological signs due to T-lymphocyte reactions (PLANZ et al., 1993, BILZER et al., 1995), there was only a weak immune reaction in the NBAE model. Minimally intense transient infiltration of mononuclear cells in single NBAE animals can be explained by microglial secretion of chemotactic substances. Based on the immune-tolerant status of newborn rats during the infection, histopathological findings can mainly be attributed to BDV per se in addition to few age-related changes.

In order to investigate brain tissue, standard, special, and immunohistochemical staining was used. The focus was on the semiquantitative analysis of Purkinje cells and glia cells as well as the evaluation of alterations within the white matter and hippocampal neurons.

The findings revealed persistent BDV infection of any brain area in each NBAE rat pronounced in the hippocampus, cerebellum, and cortex.

Compared to healthy controls, there were long-term changes such as increased neuronal degeneration in the hippocampus and progressive loss of Purkinje cells.

The difference between physiological and BDV-dependent Purkinje cell loss reached its peak in group "4 bis 6 Monate" (four to six months). This can be interpreted as a kind of degeneration stage, i.e. BDV was at its most active level at this age.

It is assumed that this virus is transmitted via airborne infection. Hence for the survival of BDV, infecting the hippocampus and Purkinje cells is important, because behavior and motoric skills are controlled by these regions. The airborne transmission might be facilitated by inhibited movement of (young) animals within a herd.

Furthermore, decreased oligodendrocyte numbers, reduced thickness of the corpus callosum, and low density of fibers within the white matter were found. Axons and accordingly myelin sheaths exhibited indistinct structure and swelling in the form of a string of pearls. Vacuole-like loss was mainly found in the center of the cerebellum which appears to be associated with severe loss of Purkinje cells.

Concerning NBAE pathogenesis, it remains unclear whether there was axonopathy first or myelinopathy first. It is possible that neuronal apoptosis is simultaneous with oligodendrocyte dysfunction based on the BDV-dependent cellular modulation. The functional relationship between oligodendrocytes, myelination, and phosphorylation of neuronal and axonal neurofilaments should not be considered separately.

Beyond that, consequences of glial effects on neurons and oligodendrocytes have to be mentioned. There is possible age-related correlation between demyelination and activation of astrocytes and microglia (XIE et al., 2013). In conclusion, the investigations revealed persistent astrogliosis and microgliosis while astrocyte counts reached their peak in group “12 bis 15 Monate” (12 to 15 months) which can be interpreted as a sign of regeneration.

Secreted glial substances are able to contribute either protection or destruction of brain tissue. The latter would result in a continuous process that would maintain the progression of neuronal degeneration and glia stimulation in a vicious circle.

In this context, BDV, being a persistent and non-cytolytic virus, presumably poses as a trigger for neurodegenerative alterations in old age.

8. LITERATURVERZEICHNIS

AGRESTI C, MEOMARTINI ME, AMADIO S, AMBROSINI E, VOLONTE C, ALOISI F und VISENTIN S, 2005: ATP regulates oligodendrocyte progenitor migration, proliferation, and differentiation: involvement of metabotropic P2 receptors. *Brain research. Brain research reviews*, 48: 157-65.

ALLEN NJ und BARRES BA, 2009: Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*, 457: 675-7.

ALLMANG U, HOFER M, HERZOG S, BECHTER K und STAEHELI P, 2001: Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry*, 6: 329-33.

ALMOLDA B, GONZALEZ B und CASTELLANO B, 2011: Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Frontiers in bioscience*, 16: 1157-71.

ALOISI F, PENNA G, POLAZZI E, MINGHETTI L und ADORINI L, 1999: CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *Journal of immunology*, 162: 1384-91.

ALTMAN J, 1972: Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *The Journal of comparative neurology*, 145: 399-463.

AMSTERDAM JD, WINOKUR A, DYSON W, HERZOG S, GONZALEZ F, ROTT R und KOPROWSKI H, 1985: Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders? *Archives of general psychiatry*, 42: 1093-1096.

ANZIL AP, 1972: [Experimental transmission of Borna encephalomyelitis virus: ultrastructural study of disease in the rabbit and analytical study of the infection in the hamster]. *Annales de l'Institut Pasteur*, 123: 537-44.

ARAQUE A, PARPURA V, SANZGIRI RP und HAYDON PG, 1999: Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22: 208-15.

ATKINSON RL, 2007: Viruses as an etiology of obesity. *Mayo Clinic proceedings*, 82: 1192-8.

AUTENRIETH CF, 1823: Ueber die hitzige Kopf-Krankheit der Pferde. *Auf Verlangen des Münsinger-Vereins zur Beförderung der Pferdezucht auf der Alp, und zunächst für diese Gegend, Tübingen*.

BACH FS, BODO G, KUEMMERLE JM, BIENERT-ZEIT A, HAINISCH EK und SIMHOFFER H, 2014: Bacterial Meningitis After Sinus Surgery in Five Adult Horses. *Veterinary surgery : VS*.

BAGERT BA, 2009: Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Current neurology and neuroscience reports*, 9: 405-10.

BAHMANI MK, NOWROUZIAN I, NAKAYA T, NAKAMURA Y, HAGIWARA K, TAKAHASHI H, RAD MA und IKUTA K, 1996: Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic, thoroughbred and their cross-bred horses in Iran. *Virus Res*, 45: 1-13.

BANKSTON AN, MANDLER MD und FENG Y, 2013: Oligodendroglia and neurotrophic factors in neurodegeneration. *Neuroscience bulletin*, 29: 216-28.

- BANSAL R, STEFANSSON K und PFEIFFER SE, 1992:** Proligodendroblast antigen (POA), a developmental antigen expressed by A007/O4-positive oligodendrocyte progenitors prior to the appearance of sulfatide and galactocerebroside. *Journal of neurochemistry*, 58: 2221-9.
- BARAC-LATAS V, SUCHANEK G, BREITSCHOPF H, STUEHLER A, WEGE H und LASSMANN H, 1997:** Patterns of oligodendrocyte pathology in coronavirus-induced subacute demyelinating encephalomyelitis in the Lewis rat. *Glia*, 19: 1-12.
- BARTZOKIS G, BECKSON M, LU PH, NUECHTERLEIN KH, EDWARDS N und MINTZ J, 2001:** Age-related changes in frontal and temporal lobe volumes in men: a magnetic resonance imaging study. *Archives of general psychiatry*, 58: 461-5.
- BAUMANN N und PHAM-DINH D, 2001:** Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*, 81: 871-927.
- BAUTISTA JR, RUBIN SA, MORAN TH, SCHWARTZ GJ und CARBONE KM, 1995:** Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection. *Brain research. Developmental brain research*, 90: 45-53.
- BAUTISTA JR, SCHWARTZ GJ, DE LA TORRE JC, MORAN TH und CARBONE KM, 1994:** Early and persistent abnormalities in rats with neonatally acquired Borna disease virus infection. *Brain research bulletin*, 34: 31-40.
- BECHTER K, SCHUTTLER R und HERZOG S, 1992:** Case of neurological and behavioral abnormalities: due to Borna disease virus encephalitis? *Psychiatry research*, 42: 193-6.
- BERG AL und BERG M, 1998:** A variant form of feline Borna disease. *Journal of comparative pathology*, 119: 323-31.
- BERG AL, DORRIES R und BERG M, 1999:** Borna disease virus infection in racing horses with behavioral and movement disorders. *Archives of virology*, 144: 547-59.
- BERG AL, REID-SMITH R, LARSSON M und BONNETT B, 1998:** Case control study of feline Borna disease in Sweden. *The Veterinary record*, 142: 715-7.
- BERG M, JOHANSSON M, MONTELL H und BERG AL, 2001:** Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiology and infection*, 127: 173-178.
- BIGNAMI A, ENG LF, DAHL D und UYEDA CT, 1972:** Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain research*, 43: 429-35.
- BILLICH C, 2002:** Charakterisierung von Borna Disease Virus-spezifischen Antikörpern in Human- und Tierseren. *Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau, Diss.*
- BILLICH C, SAUDER C, FRANK R, HERZOG S, BECHTER K, TAKAHASHI K, PETERS H, STAEHELI P und SCHWEMMLE M, 2002:** High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biological psychiatry*, 51: 979-987.
- BILZER T, GRABNER A und STITZ L, 1996:** [Immunopathology of Borna disease in the horse: clinical, virological and neuropathologic findings]. *Tierärztliche Praxis*, 24: 567-76.
- BILZER T, PLANZ O, LIPKIN WI und STITZ L, 1995:** Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. *Brain pathology*, 5: 223-230.
- BILZER T und STITZ L, 1993:** Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells. *Archives of virology. Supplementum*, 7: 153-8.

- BILZER T und STITZ L, 1994:** Immune-mediated brain atrophy. CD8+ T cells contribute to tissue destruction during borna disease. *Journal of immunology*, 153: 818-23.
- BILZER T und STITZ L, 1996:** Immunopathogenesis of virus diseases affecting the central nervous system. *Critical reviews in immunology*, 16: 145-222.
- BODDY MN, FURNARI B, MONDESERT O und RUSSELL P, 1998:** Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science*, 280: 909-12.
- BODE L, 1995:** Human infections with Borna disease virus and potential pathogenic implications. *Current topics in microbiology and immunology*, 190: 103-30.
- BODE L, RECKWALD P, SEVERUS WE, STOYLOFF R, FERSZT R, DIETRICH DE und LUDWIG H, 2001:** Borna disease virus-specific circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies - the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Mol Psychiatry*, 6: 481-91.
- BODE L, RIEGEL S, LUDWIG H, AMSTERDAM JD, LANGE W und KOPROWSKI H, 1988:** Borna disease virus-specific antibodies in patients with HIV infection and with mental disorders. *Lancet*, 2: 689.
- BODE L, STEINBACH F und LUDWIG H, 1994:** A novel marker for Borna disease virus infection. *Lancet*, 343: 297-8.
- BOULANGER P und AVERY RJ, 1975:** Equine infectious anaemia in Canada, diagnosis and control. *Veterinaro-meditsinski nauki*, 12: 135-7.
- BOURG M, HERZOG S, ENCARNACAO JA, NOBACH D, LANGE-HERBST H, EICKMANN M und HERDEN C, 2013:** Bicolored white-toothed shrews as reservoir for borna disease virus, Bavaria, Germany. *Emerging infectious diseases*, 19: 2064-6.
- BOYLE A, 2011:** Streptococcus equi subspecies equi infection (strangles) in horses. *Compendium*, 33: 1-7.
- BRIESE T, DE LA TORRE JC, LEWIS A, LUDWIG H und LIPKIN WI, 1992:** Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 11486-11489.
- BRIESE T, HORNIG M und LIPKIN WI, 1999:** Bornavirus immunopathogenesis in rodents: models for human neurological diseases. *Journal of neurovirology*, 5: 604-12.
- BRIESE T, SCHNEEMANN A, LEWIS AJ, PARK YS, KIM S, LUDWIG H und LIPKIN WI, 1994:** Genomic organization of Borna disease virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 4362-4366.
- BRONSTEIN R, TORRES L, NISSEN JC und TSIRKA SE, 2013:** Culturing microglia from the neonatal and adult central nervous system. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- BUNGE RP, 1968:** Glial cells and the central myelin sheath. *Physiological reviews*, 48: 197-251.
- CAPLAZI P, MELZER K, GOETZMANN R, ROHNER-COTTI A, BRACHER V, ZLINSZKY K und EHRENSPERGER F, 1999:** Die Bornasche Krankheit in der Schweiz und im Fürstentum Liechtenstein. Review. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde.*, 141: 521-7.
- CAPLAZI P, WALDVOGEL A, STITZ L, BRAUN U und EHRENSPERGER F, 1994:** Borna disease in naturally infected cattle. *Journal of comparative pathology*, 111: 65-72.

CARBONE KM, DUCHALA CS, GRIFFIN JW, KINCAID AL und NARAYAN O, 1987: Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J Virol*, 61: 3431-40.

CARBONE KM, PARK SW, RUBIN SA, WALTRIP RW, 2ND und VOGELSANG GB, 1991: Borna disease: association with a maturation defect in the cellular immune response. *J Virol*, 65: 6154-64.

CARBONE KM, RUBIN SA, SIERRA-HONIGMANN AM und LEDERMAN HM, 1993: Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol*, 67: 1453-60.

CERVOS-NAVARRO J, ROGGENDORF W, LUDWIG H und STITZ H, 1981: [The encephalitic reaction in Borna disease virus infected rhesus monkeys]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 65: 208-212.

CHALMERS RM, THOMAS DR und SALMON RL, 2005: Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 98: 255-74.

CHAMBERS JS und PERRONE-BIZZOZERO NI, 2004: Altered myelination of the hippocampal formation in subjects with schizophrenia and bipolar disorder. *Neurochemical research*, 29: 2293-302.

CHATTERJEE D, BISWAS K, NAG S, RAMACHANDRA SG und DAS SARMA J, 2013: Microglia play a major role in direct viral-induced demyelination. *Clinical & developmental immunology*, 2013: 510396.

CHEN CH, CHIU YL, WEI FC, KOONG FJ, LIU HC, SHAW CK, HWU HG und HSIAO KJ, 1999: High seroprevalence of Borna virus infection in schizophrenic patients, family members and mental health workers in Taiwan. *Mol Psychiatry*, 4: 33-8.

CHEW LJ, FUSAR-POLI P und SCHMITZ T, 2013: Oligodendroglial Alterations and the Role of Microglia in White Matter Injury: Relevance to Schizophrenia. *Developmental neuroscience*.

CODELUPPI S, FERNANDEZ-ZAFRA T, SANDOR K, KJELL J, LIU Q, ABRAMS M, OLSON L, GRAY NS, SVENSSON CI und UHLEN P, 2014: Interleukin-6 Secretion by Astrocytes Is Dynamically Regulated by PI3K-mTOR-Calcium Signaling. *PLoS one*, 9: 92649.

COUTINHO E, HARRISON P und VINCENT A, 2014: Do neuronal autoantibodies cause psychosis? A neuroimmunological perspective. *Biological psychiatry*, 75: 269-75.

CREUTZFELDT OD, 1983: Cortex Cerebri. Leistungen, strukturelle und funktionelle Organisation der Hirnrinde. *Springer, Berlin, Heidelberg*.

CUBITT B, LY C und DE LA TORRE JC, 2001: Identification and characterization of a new intron in Borna disease virus. *The Journal of general virology*, 82: 641-6.

CUBITT B, OLDSTONE C und DE LA TORRE JC, 1994: Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol*, 68: 1382-1396.

DAHL D, PERIDES G und BIGNAMI A, 1989: Axonal regeneration in old multiple sclerosis plaques. Immunohistochemical study with monoclonal antibodies to phosphorylated and non-phosphorylated neurofilament proteins. *Acta neuropathologica*, 79: 154-9.

DANIEL P, 2003: Zellzyklus und Apoptose. *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg: 134.

- DANNER K und MAYR A, 1973:** [Fluorescence serological studies on the appearance of Borna virus antigen in cell cultures from brain explants of infected rabbits]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 20: 497-508.
- DAUPHIN G, LEGAY V, SAILLEAU C, SMONDACK S, HAMMOUMI S und ZIENTARA S, 2001:** Evidence of Borna disease virus genome detection in French domestic animals and in foxes (*Vulpes vulpes*). *The Journal of general virology*, 82: 2199-204.
- DE LA TORRE JC, 1994:** Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol*, 68: 7669-7675.
- DE LA TORRE JC, 2002:** Molecular biology of Borna disease virus and persistence. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7: 569-79.
- DE LA TORRE JC, 2006:** Reverse-genetic approaches to the study of Borna disease virus. *Nature reviews. Microbiology*, 4: 777-83.
- DE LA TORRE JC, CARBONE KM und LIPKIN WI, 1990:** Molecular characterization of the Borna disease agent. *Virology*, 179: 853-856.
- DE WAEGH SM, LEE VM und BRADY ST, 1992:** Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell*, 68: 451-63.
- DEGIORGIS MP, BERG AL, HARD AF SEGERSTAD C, MORNER T, JOHANSSON M und BERG M, 2000:** Borna disease in a free-ranging lynx (*Lynx lynx*). *Journal of clinical microbiology*, 38: 3087-91.
- DEL RIO HORTEGA P, 1921:** Histogenesis y evolucion normal; exodo y distribucion normal de la microglia. *Memor. Real. Soc. Esp. Hist. Nat.*, 11: 213-68.
- DEL RIO HORTEGA P, 1928:** Tercera aportacion al conocimiento morfologico e interpretacion funcional de la oligodendroglia. *Memor. Real. Soc. Esp. Hist. Nat.*, 14: 5-122.
- DENG YY, LU J, LING EA und KAUR C, 2011:** Role of microglia in the process of inflammation in the hypoxic developing brain. *Front Biosci (Schol Ed)*, 3: 884-900.
- DENKER SP, JI S, DINGMAN A, LEE SY, DERUGIN N, WENDLAND MF und VEXLER ZS, 2007:** Macrophages are comprised of resident brain microglia not infiltrating peripheral monocytes acutely after neonatal stroke. *Journal of neurochemistry*, 100: 893-904.
- DESCHL U, STITZ L, HERZOG S, FRESE K und ROTT R, 1990:** Determination of immune cells and expression of major histocompatibility complex class II antigen in encephalitic lesions of experimental Borna disease. *Acta neuropathologica*, 81: 41-50.
- DEXLER H, 1900:** Pathologisch-anatomische Untersuchungen über die Bornsche Krankheit. *Z Tiermed*, 4: 110-23.
- DITTRICH W, BODE L, LUDWIG H, KAO M und SCHNEIDER K, 1989:** Learning deficiencies in Borna disease virus-infected but clinically healthy rats. *Biological psychiatry*, 26: 818-28.
- DOBBING J und SANDS J, 1979:** Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early human development*, 3: 79-83.
- DUCHALA CS, CARBONE KM und NARAYAN O, 1989:** Preliminary studies on the biology of Borna disease virus. *The Journal of general virology*, 70: 3507-11.

DÜRRWALD R, KOLODZIEJEK J, WEISSENBOCK H und NOWOTNY N, 2014: The bicolored white-toothed shrew *Crocodyura leucodon* (HERMANN 1780) is an indigenous host of mammalian Borna disease virus. *PLoS one*, 9: e93659.

DÜRRWALD R und LUDWIG H, 1997: Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Zentralbl Veterinarmed B*, 44: 147-84.

EDDLESTON M und MUCKE L, 1993: Molecular profile of reactive astrocytes - implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54: 15-36.

EICKMANN M, KIERMAYER S, KRAUS I, GOSSL M, RICHT JA und GARTEN W, 2005: Maturation of Borna disease virus glycoprotein. *FEBS letters*, 579: 4751-6.

EISENMAN LM, BROTHERS R, TRAN MH, KEAN RB, DICKSON GM, DIETZSCHOLD B und HOOPER DC, 1999: Neonatal Borna disease virus infection in the rat causes a loss of Purkinje cells in the cerebellum. *Journal of neurovirology*, 5: 181-9.

EKDAHL CT, CLAASEN JH, BONDE S, KOKAIA Z und LINDVALL O, 2003: Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 13632-7.

ELMORE MR, BURTON MD, CONRAD MS, RYTYCH JL, VAN ALSTINE WG und JOHNSON RW, 2014: Respiratory viral infection in neonatal piglets causes marked microglia activation in the hippocampus and deficits in spatial learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 34: 2120-9.

ENG LF und GHIRNIKAR RS, 1994: GFAP and astrogliosis. *Brain pathology*, 4: 229-37.

ENG LF, GHIRNIKAR RS und LEE YL, 2000: Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*, 25: 1439-51.

ESEN N und KIELIAN T, 2006: Central role for MyD88 in the responses of microglia to pathogen-associated molecular patterns. *Journal of immunology*, 176: 6802-11.

FANKHAUSER R, 1982: [Canine distemper - the history of a disease]. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 124: 245-56.

FAWCETT JW und ASHER RA, 1999: The glial scar and central nervous system repair. *Brain research bulletin*, 49: 377-91.

FIELDS RD und STEVENS-GRAHAM B, 2002: New insights into neuron-glia communication. *Science*, 298: 556-62.

FIELDS RD und STEVENS B, 2000: ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends in neurosciences*, 23: 625-33.

FITZHUGH R, 1962: Computation of impulse initiation and saltatory conduction in a myelinated nerve fiber. *Biophysical journal*, 2: 11-21.

FLYNN SW, LANG DJ, MACKAY AL, GOGHARI V, VAVASOUR IM, WHITTALL KP, SMITH GN, ARANGO V, MANN JJ, DWORK AJ, FALKAI P und HONER WG, 2003: Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol Psychiatry*, 8: 811-20.

FORD AL, GOODSALL AL, HICKEY WF und SEDGWICK JD, 1995: Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. *Journal of immunology*, 154: 4309-21.

FRIEDBERGER F und FRÖHNER E, 1896: Lehrbuch der speciellen Pathologie und Therapie der Hausthiere. *Stuttgart, Enke*.

FU ZF, AMSTERDAM JD, KAO M, SHANKAR V, KOPROWSKI H und DIETZSCHOLD B, 1993: Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with affective disorders by western immunoblot technique. *Journal of affective disorders*, 27: 61-8.

FU ZF und JACKSON AC, 2005: Neuronal dysfunction and death in rabies virus infection. *Journal of neurovirology*, 11: 101-6.

FUKUDA K, TAKAHASHI K, IWATA Y, MORI N, GONDA K, OGAWA T, OSONOE K, SATO M, OGATA S, HORIMOTO T, SAWADA T, TASHIRO M, YAMAGUCHI K, NIWA S und SHIGETA S, 2001: Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan. *Journal of clinical microbiology*, 39: 419-29.

FURRER E, BILZER T, STITZ L und PLANZ O, 2001: High-dose Borna disease virus infection induces a nucleoprotein-specific cytotoxic T-lymphocyte response and prevention of immunopathology. *J Virol*, 75: 11700-8.

GAGE FH, BRUNDIN P, STRECKER R, DUNNETT SB, ISACSON O und BJORKLUND A, 1988: Intracerebral neuronal grafting in experimental animal models of age-related motor dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 515: 383-94.

GALABRU J, SARON MF, BERG M, BERG AL, HERZOG S, LABIE J und ZIENTARA S, 2000: Borna disease virus antibodies in French horses. *The Veterinary record*, 147: 721-2.

GALIBERTI JB, 1660: Neugebahnter Tümmelplatz, und eröffnete Reitschul. Samt beygefügter Gestütt Ordnung und gründlicher Einzäumung wie auch der Pferde Cur und Artzney. (Übersetzt vom Italienisch ins Teutsch und mit denen darzu gehörigen Figuren geziert durch Mathaeum Drummern von Pabenbach). *Verlegung Michael Riegers Buchhandlers, Vienna*.

GANGULI R, BRAR JS, SOLOMON W, CHENGAPPA KN und RABIN BS, 1992: Altered interleukin-2 production in schizophrenia: association between clinical state and autoantibody production. *Psychiatry research*, 44: 113-23.

GARCIA ML, LOBSIGER CS, SHAH SB, DEERINCK TJ, CRUM J, YOUNG D, WARD CM, CRAWFORD TO, GOTOW T, UCHIYAMA Y, ELLISMAN MH, CALCUTT NA und CLEVELAND DW, 2003: NF-M is an essential target for the myelin-directed "outside-in" signaling cascade that mediates radial axonal growth. *The Journal of cell biology*, 163: 1011-20.

GARD AL und PFEIFFER SE, 1993: Glial cell mitogens bFGF and PDGF differentially regulate development of O4+GalC- oligodendrocyte progenitors. *Developmental biology*, 159: 618-30.

GARDEN GA und MOLLER T, 2006: Microglia biology in health and disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 1: 127-37.

GARTHWAITE G, GOODWIN DA, BATCHELOR AM, LEEMING K und GARTHWAITE J, 2002: Nitric oxide toxicity in CNS white matter: an in vitro study using rat optic nerve. *Neuroscience*, 109: 145-55.

GEHRKE K, 2011: Veränderungen der Expression von Neurofilamenten und des DISC1-Proteins im Gehirn nach neonataler Infektion von Lewis-Ratten mit dem Borna Disease Virus. *Justus-Liebig-Universität Giessen, Diss.*

GENSERT, 1896: Die Borna'sche Krankheit. *Berl Thierärztl Wochenschr* 12: 447-9.

GERBER H, GAILLARD C, FATZER R, MARTI E, PFISTER B, SUSTRONCK B, UELTSCHI G, MEIER HP, HERHOLZ C, STRAUB R, GEISSBÜHLER U und GERBER V, 1995: Cerebellare Abiotrophie bei Vollblutaraber-Fohlen. *Pferdeheilkunde*, 11: 423-31.

GIES U, BILZER T, STITZ L und STAIGER JF, 1998: Disturbance of the cortical cholinergic innervation in Borna disease prior to encephalitis. *Brain pathology*, 8: 39-48.

GIULIAN D und INGEMAN JE, 1988: Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8: 4707-17.

GONZALEZ-DUNIA D, CUBITT B und DE LA TORRE JC, 1998: Mechanism of Borna disease virus entry into cells. *J Virol*, 72: 783-8.

GONZALEZ-DUNIA D, SAUDER C und DE LA TORRE JC, 1997: Borna disease virus and the brain. *Brain research bulletin*, 44: 647-664.

GONZALEZ-DUNIA D, VOLMER R, MAYER D und SCHWEMMLE M, 2005: Borna disease virus interference with neuronal plasticity. *Virus Res*, 111: 224-34.

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

GOSZTONYI G, DIETZSCHOLD B, KAO M, RUPPRECHT CE, LUDWIG H und KOPROWSKI H, 1993: Rabies and borna disease. A comparative pathogenetic study of two neurovirulent agents. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 68: 285-95.

GOSZTONYI G und LUDWIG H, 1984: Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals. *Acta neuropathologica*, 64: 213-21.

GOSZTONYI G und LUDWIG H, 1995: Borna disease - neuropathology and pathogenesis. *Current topics in microbiology and immunology*, 190: 39-73.

GOTOW T, LETERRIER JF, OHSAWA Y, WATANABE T, ISAHARA K, SHIBATA R, IKENAKA K und UCHIYAMA Y, 1999: Abnormal expression of neurofilament proteins in dysmyelinating axons located in the central nervous system of jimpy mutant mice. *The European journal of neuroscience*, 11: 3893-903.

GRABER HU, MULLER CF, VANDEVELDE M und ZURBRIGGEN A, 1995: Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes. *Acta neuropathologica*, 90: 312-8.

GRABNER A und FISCHER A, 1991: [Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years]. *Tierärztliche Praxis*, 19: 68-73.

GREEN SL, LITTLE CB, BAIRD JD, TREMBLAY RR und SMITH-MAXIE LL, 1994: Tetanus in the horse: a review of 20 cases (1970 to 1990). *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 8: 128-32.

HAGIWARA K, ASAKAWA M, LIAO L, JIANG W, YAN S, CHAI J, OKU Y, IKUTA K und ITO M, 2001: Seroprevalence of Borna disease virus in domestic animals in Xinjiang, China. *Veterinary microbiology*, 80: 383-9.

HAGIWARA K, KAMITANI W, TAKAMURA S, TANIYAMA H, NAKAYA T, TANAKA H, KIRISAWA R, IWAI H und IKUTA K, 2000: Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. *Veterinary microbiology*, 72: 207-16.

HAGIWARA K, NAKAYA T, NAKAMURA Y, ASAHI S, TAKAHASHI H, ISHIHARA C und IKUTA K, 1996: Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy dairy cattle. *Medical microbiology and immunology*, 185: 145-151.

HALLENSLEBEN W, SCHWEMMLE M, HAUSMANN J, STITZ L, VOLK B, PAGENSTECHE A und STAEHELI P, 1998: Borna disease virus-induced neurological disorder in mice: infection of neonates results in immunopathology. *J Virol*, 72: 4379-4386.

HAMILTON-FLETCHER R, 2004: Veterinary Advice on Laminitis in Horses. *Ringpress Books Ltd.*

HAMLIN LH, 1961: Electron microscopy of mossy fibre endings in Ammon's horn. *Nature*, 190: 645-6.

HANLY JG, 2014: Diagnosis and management of neuropsychiatric SLE. *Nature reviews. Rheumatology*.

HARRIS RE, 2011: Epidemiology of Brain Tumors with Special Reference to Gliomas. In: *Epidemiology of Chronic Disease*. Jones & Bartlett Pub (Ma): 327-8.

HATTEN ME, LIEM RK, SHELANSKI ML und MASON CA, 1991: Astroglia in CNS injury. *Glia*, 4: 233-43.

HAUSMANN J, HALLENSLEBEN W, DE LA TORRE JC, PAGENSTECHE A, ZIMMERMANN C, PIRCHER H und STAEHELI P, 1999: T cell ignorance in mice to Borna disease virus can be overcome by peripheral expression of the viral nucleoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 9769-74.

HEFFELS-REDMANN U, ENDERLEIN D, HERZOG S, PIEPENBRING A, BURKLE M, NEUMANN D, HERDEN C und LIERZ M, 2012: Follow-up investigations on different courses of natural avian bornavirus infections in psittacines. *Avian diseases*, 56: 153-9.

HEINIG A, 1969: Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In: *RÖHRER, H. (Hrsg.): Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren. Band 4*. Gustav Fischer Verlag, Jena.: 83-148.

HEINRICH A und ADAMASZEK M, 2010: Anti-Borna disease virus antibody responses in psychiatric patients: long-term follow up. *Psychiatry and clinical neurosciences*, 64: 255-61.

HELPS CR, TURAN N, BILAL T, HARBOUR DA und YILMAZ H, 2001: Detection of antibodies to Borna disease virus in Turkish cats by using recombinant p40. *The Veterinary record*, 149: 647-50.

HERDEN C, HERZOG S, RICHT JA, NESSELER A, CHRIST M, FAILING K und FRESE K, 2000: Distribution of Borna disease virus in the brain of rats infected with an obesity-inducing virus strain. *Brain pathology*, 10: 39-48.

HERZOG S, FRESE K und ROTT R, 1991: Studies on the genetic control of resistance of black hooded rats to Borna disease. *The Journal of general virology*, 72: 535-40.

HERZOG S, KOMPETER C, FRESE K und ROTT R, 1984: Replication of Borna disease virus in rats: age-dependent differences in tissue distribution. *Medical microbiology and immunology*, 173: 171-7.

HERZOG S und ROTT R, 1980: Replication of Borna disease virus in cell cultures. *Medical microbiology and immunology*, 168: 153-158.

HESS DC, ABE T, HILL WD, STUDDARD AM, CAROTHERS J, MASUYA M, FLEMING PA, DRAKE CJ und OGAWA M, 2004: Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Experimental neurology*, 186: 134-44.

HILBE M, HERRSCHE R, KOLODZIEJEK J, NOWOTNY N, ZLINSZKY K und EHRENSPERGER F, 2006: Shrews as reservoir hosts of borna disease virus. *Emerging infectious diseases*, 12: 675-7.

HIRANO N, KAO M und LUDWIG H, 1983: Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *The Journal of general virology*, 64: 1521-1530.

HOLSHUH HJ und HOWARD EB, 1982: Pineoblastoma, a primitive neuroectodermal tumor in the brain of a horse. *Veterinary pathology*, 19: 567-9.

HONKAVUORI KS, SHIVAPRASAD HL, WILLIAMS BL, QUAN PL, HORNIG M, STREET C, PALACIOS G, HUTCHISON SK, FRANCA M, EGHOLM M, BRIESE T und LIPKIN WI, 2008: Novel borna virus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerging infectious diseases*, 14: 1883-6.

HORGAN ES und MCKINNON RM, 1937: A comparison of the mesencephalon and hippocampus as sites of election for Negri bodies in rabies. *The Journal of hygiene*, 37: 340-4.

HORNIG M, BRIESE T, LICINIO J, KHABBAZ RF, ALTSHULER LL, POTKIN SG, SCHWEMMLE M, SIEMETZKI U, MINTZ J, HONKAVUORI K, KRAEMER HC, EGAN MF, WHYBROW PC, BUNNEY WE und LIPKIN WI, 2012: Absence of evidence for bornavirus infection in schizophrenia, bipolar disorder and major depressive disorder. *Mol Psychiatry*, 17: 486-493.

HORNIG M, SOLBRIG M, HORSCROFT N, WEISSENBÖCK H und LIPKIN WI, 2001: Borna disease virus infection of adult and neonatal rats: models for neuropsychiatric disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 253: 157-177.

HORNIG M, WEISSENBÖCK H, HORSCROFT N und LIPKIN WI, 1999: An infection-based model of neurodevelopmental damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96: 12102-7.

HORTSCH M, 2010: Histology of the Central Nervous System - Second look! *University of Michigan*.

HUTTLOVA J, KIKINIS Z, KERKOVSKY M, BOUIX S, VU MA, MAKRIS N, SHENTON M und KASPAREK T, 2014: Abnormalities in Myelination of the Superior Cerebellar Peduncle in Patients with Schizophrenia and Deficits in Movement Sequencing. *Cerebellum*.

IKEDA H und MURASE K, 2004: Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24: 9888-96.

ITO D, IMAI Y, OHSAWA K, NAKAJIMA K, FUKUUCHI Y und KOHSAKA S, 1998: Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain research. Molecular brain research*, 57: 1-9.

JACOBSEN B, ALGERMISSEN D, SCHAUDIEN D, VENNER M, HERZOG S, WENTZ E, HEWICKER-TRAUTWEIN M, BAUMGARTNER W und HERDEN C, 2010: Borna disease in an adult alpaca stallion (*Lama pacos*). *Journal of comparative pathology*, 143: 203-8.

JANZER RC und RAFF MC, 1987: Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325: 253-7.

JOEST E und DEGEN K, 1909a: Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde. *Z Infkrkh Haustiere*, 6: 348-56.

JOEST E und DEGEN K, 1909b: Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde. *Z Inf Krkh Haustiere* 9: 348-356.

JOEST E und SEMMLER W, 1911: Weitere Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung (Bornasche Krankheit) des Pferdes mit besonderer Berücksichtigung des Infektionsweges und der Kerneinschlüsse. *Z Inf Krkh Haustiere* 9, 10: 293.

JORDAN FL und THOMAS WE, 1987: Identification of microglia in primary cultures of mixed cerebral cortical cells. *Brain research bulletin*, 19: 153-9.

JOYCE JR und RUSSEL LH, 1981: Clinical signs of rabies in horses. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 3: 56-61.

JURYNEC MJ, RILEY CP, GUPTA DK, NGUYEN TD, MCKEON RJ und BUCK CR, 2003: TIGR is upregulated in the chronic glial scar in response to central nervous system injury and inhibits neurite outgrowth. *Molecular and cellular neurosciences*, 23: 69-80.

KAADEN OR, EICHHORN W und ESSBAUER S, 2002: Recent developments in the epidemiology of virus diseases. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 49: 3-6.

KANFER J, PARENTY M, GOUJET-ZALC C, MONGE M, BERNIER L, CAMPAGNONI AT, DAUTIGNY A und ZALC B, 1989: Developmental expression of myelin proteolipid, basic protein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase transcripts in different rat brain regions. *Journal of molecular neuroscience*, 1: 39-46.

KAO M, HAMIR AN, RUPPRECHT CE, FU ZF, SHANKAR V, KOPROWSKI H und DIETZSCHOLD B, 1993: Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *The Veterinary record*, 132: 241-4.

KAO M, LUDWIG H und GOSZTONYI G, 1984: Adaptation of Borna disease virus to the mouse. *The Journal of general virology*, 65: 1845-9.

KAUR C, SIVAKUMAR V, ZOU Z und LING EA, 2012: Microglia-derived proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta induce Purkinje neuronal apoptosis via their receptors in hypoxic neonatal rat brain. *Brain structure & function*.

KAWAJA MD und GAGE FH, 1991: Reactive astrocytes are substrates for the growth of adult CNS axons in the presence of elevated levels of nerve growth factor. *Neuron*, 7: 1019-30.

KETTENMANN H, HANISCH UK, NODA M und VERKHRATSKY A, 2011: Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91: 461-553.

KIERDORF K und PRINZ M, 2013: Factors regulating microglia activation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7: 44.

- KIMELBERG HK, SANKAR P, O'CONNOR ER, JALONEN T und GODERIE SK, 1992:** Functional consequences of astrocytic swelling. *Progress in brain research*, 94: 57-68.
- KINNUNEN PM, BILLICH C, EK-KOMMONEN C, HENTTONEN H, KALLIO RK, NIEMIMAA J, PALVA A, STAEHELI P, VAHERI A und VAPALAHTI O, 2007:** Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 38: 64-9.
- KITANI H, YAMAKAWA M und IKEDA H, 2000:** Preferential infection of neuronal and astroglia cells by Akabane virus in primary cultures of fetal bovine brain. *Veterinary microbiology*, 73: 269-79.
- KLYUSHNENKOVA EN und VANGURI P, 1997:** Ia expression and antigen presentation by glia: strain and cell type-specific differences among rat astrocytes and microglia. *Journal of neuroimmunology*, 79: 190-201.
- KOHL, 1896:** Ueber die Borna'sche Krankheit der Pferde. *Berl Thierärztl Wochenschr*, 12: 462-4.
- KOHNO T, GOTO T, TAKASAKI T, MORITA C, NAKAYA T, IKUTA K, KURANE I, SANO K und NAKAI M, 1999:** Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol*, 73: 760-6.
- KREUTZBERG GW, 1995:** Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittel-Forschung*, 45: 357-60.
- KREUTZBERG GW, GRAEBER MB und STREIT WJ, 1989:** Neuron-glia relationship during regeneration of motoneurons. *Metabolic brain disease*, 4: 81-5.
- KRIZ J, ZHU Q, JULIEN JP und PADJEN AL, 2000:** Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain research*, 885: 32-44.
- KRONEVI T, NORDSTROM M, MORENO W und NILSSON PO, 1974:** Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nordisk veterinærmedicin*, 26: 720-5.
- KUCHLER-BOPP S, DELAUNOY JP, ARTAULT JC, ZAEPFEL M und DIETRICH JB, 1999:** Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport*, 10: 1347-53.
- LANCASTER K, DIETZ DM, MORAN TH und PLETNIKOV MV, 2007:** Abnormal social behaviors in young and adult rats neonatally infected with Borna disease virus. *Behavioural brain research*, 176: 141-8.
- LASSMANN H, RINNER W und HICKEY WF, 1994:** Differential role of hematogenous macrophages, resident microglia and astrocytes in antigen presentation and tissue damage during autoimmune encephalomyelitis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 20: 195-6.
- LAWSON LJ, PERRY VH und GORDON S, 1992:** Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48: 405-15.
- LEE BJ, WATANABE M, KAMITANI W, BABA S, YAMASHITA M, KOBAYASHI T, TOMONAGA K und IKUTA K, 2003:** Age- and host-dependent control of Borna disease virus spread in the developing brains of gerbils and rats. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5: 1195-204.

LEMP C, SEEHUSEN F, SPITZBARTH I, ULRICH R und BAUMGÄRTNER W, 2014: Mechanismen axonaler Schädigung und Regeneration bei der demyelinisierenden Staupeenzephalitis des Hundes. *57. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Pathologie in Fulda*.

LEWIS KE, RASMUSSEN AL, BENNETT W, KING A, WEST AK, CHUNG RS und CHUAH MI, 2014: Microglia and motor neurons during disease progression in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: changes in arginase1 and inducible nitric oxide synthase. *Journal of neuroinflammation*, 11: 55.

LI D, LEI Y, DENG J, ZHOU C, ZHANG Y, LI W, HUANG H, CHENG S, ZHANG H, ZHANG L, HUANG R, LIU X, MA L, WANG X, LI J und XIE P, 2013: Human but Not Laboratory Borna Disease Virus Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Human Oligodendrocytes In Vitro. *PLoS one*, 8: 66623.

LI XQ, SARMENTO L und FU ZF, 2005: Degeneration of neuronal processes after infection with pathogenic, but not attenuated, rabies viruses. *J Virol*, 79: 10063-8.

LIEBICH HG, 2004: Gliazelle (Neuroglia, Gliozyt, Gliocyty). In: *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. 4. Auflage, Schattauer: Stuttgart, New York, 4: 127.

LING EA, 1979: Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles. *Journal of anatomy*, 128: 847-58.

LONDON A, COHEN M und SCHWARTZ M, 2013: Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7: 34.

LUDWIG H und BODE L, 2000: Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Revue scientifique et technique*, 19: 259-88.

LUDWIG H, BODE L und GOSZTONYI G, 1988: Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Progress in medical virology. Fortschritte der medizinischen Virusforschung. Progres en virologie medicale*, 35: 107-51.

LUDWIG H, KRAFT W, KAO M, GOSZTONYI G, DAHME E und KREY H, 1985: [Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice]. *Tierärztliche Praxis*, 13: 421-53.

LUDWIG TH, BECHT H und GROH L, 1973: Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Medical microbiology and immunology*, 158: 275-89.

LUNDGREN AL, CZECH G, BODE L und LUDWIG H, 1993: Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *Zentralbl Veterinarmed B*, 40: 298-303.

MALKINSON M, WEISMAN Y, PERL S und ASHASH E, 1995: A Borna-like disease of ostriches in Israel. *Current topics in microbiology and immunology*, 190: 31-8.

MANETTO V, STERNBERGER NH, PERRY G, STERNBERGER LA und GAMBETTI P, 1988: Phosphorylation of neurofilaments is altered in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 47: 642-53.

MARTIN R, DOOR R, ZIEGLER A, WARCHOL W, HAHN J und BREITIG D, 1999: Neurofilament phosphorylation and axon diameter in the squid giant fibre system. *Neuroscience*, 88: 327-36.

- MCCLURE MA, THIBAUT KJ, HATALSKI CG und LIPKIN WI, 1992:** Sequence similarity between Borna disease virus p40 and a duplicated domain within the paramyxovirus and rhabdovirus polymerase proteins. *J Virol*, 66: 6572-7.
- MCQUARRIE IG, GRAFSTEIN B, DREYFUS CF und GERSHON MD, 1978:** Regeneration of adrenergic axons in rat sciatic nerve: effect of a conditioning lesion. *Brain research*, 141: 21-34.
- MEDNICK SA, MACHON RA, HUTTUNEN MO und BONETT D, 1988:** Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Archives of general psychiatry*, 45: 189-92.
- MENDONCA DM, CHIMELLI L und MARTINEZ AM, 2005:** Quantitative evidence for neurofilament heavy subunit aggregation in motor neurons of spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]*, 38: 925-33.
- MENET A, SPETH C, LARCHER C, PRODINGER WM, SCHWENDINGER MG, CHAN P, JAGER M, SCHWARZMANN F, RECHEIS H, FONTAINE M und DIERICH MP, 1999:** Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *J Virol*, 73: 7722-33.
- METZLER A, EHRENSPERGER F und WYLER R, 1978:** [Natural borna virus infection in rabbits]. *Zentralbl Veterinarmed B*, 25: 161-164.
- MILLER RH, 1996:** Oligodendrocyte origins. *Trends in neurosciences*, 19: 92-6.
- MILLER RH, 2002:** Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in neurobiology*, 67: 451-67.
- MITRA AK und CLARKE K, 2010:** Viral obesity: fact or fiction? *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11: 289-96.
- MORALES JA, HERZOG S, KOMPTER C, FRESE K und ROTT R, 1988:** Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Medical microbiology and immunology*, 177: 51-68.
- MORRISON HW und FILOSA JA, 2013:** A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *Journal of neuroinflammation*, 10: 4.
- MURAYAMA S, BOULDIN TW und SUZUKI K, 1992:** Immunocytochemical and ultrastructural studies of upper motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta neuropathologica*, 83: 518-24.
- MUTINELLI F, VANDELDELDE M, GRIOT C und RICHARD A, 1989:** Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta neuropathologica*, 77: 333-5.
- MYER DJ, GURKOFF GG, LEE SM, HOVDA DA und SOFRONIEW MV, 2006:** Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain : a journal of neurology*, 129: 2761-72.
- NAKAMURA Y, NAKAYA T, HAGIWARA K, MOMIYAMA N, KAGAWA Y, TANIYAMA H, ISHIHARA C, SATA T, KURATA T und IKUTA K, 1999a:** High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. *Vaccine*, 17: 480-9.
- NAKAMURA Y, TAKAHASHI H, SHOYA Y, NAKAYA T, WATANABE M, TOMONAGA K, IWAHASHI K, AMENO K, MOMIYAMA N, TANIYAMA H, SATA T, KURATA T, DE LA TORRE JC und IKUTA K, 2000:** Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J Virol*, 74: 4601-11.

NAKAMURA Y, WATANABE M, KAMITANI W, TANIYAMA H, NAKAYA T, NISHIMURA Y, TSUJIMOTO H, MACHIDA S und IKUTA K, 1999b: High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. *Veterinary microbiology*, 70: 153-69.

NARAYAN O, HERZOG S, FRESE K, SCHEEFERS H und ROTT R, 1983a: Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science*, 220: 1401-1403.

NARAYAN O, HERZOG S, FRESE K, SCHEEFERS H und ROTT R, 1983b: Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. *J Infect Dis*, 148: 305-15.

NEDOROST N, MADERNER CA, KOLODZIEJEK J, LUSSY H, NOWOTNY N und WEISSENBOCK H, 2012: Identification of mixed infections with different genotypes of avian bornaviruses in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Avian diseases*, 56: 414-7.

NEUMANN P, LIEBER D, MEYER S, DAUTEL P, KERTH A, KRAUS I, GARTEN W und STUBBS MT, 2009: Crystal structure of the Borna disease virus matrix protein (BDV-M) reveals ssRNA binding properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 3710-5.

NISHINO Y, OOISHI R, KUROKAWA S, FUJINO K, MURAKAMI M, MADARAME H, HASHIMOTO O, SUGIYAMA K und FUNABA M, 2009: Gene expression of the TGF-beta family in rat brain infected with Borna disease virus. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 11: 737-43.

NITZSCHKE E, 1963: Untersuchungen über die experimentelle Bornavirus-Infektion bei der Ratte. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 10: 470-504.

NIXON RA und SIHAG RK, 1991: Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends in neurosciences*, 14: 501-6.

NOBACH D, BOURG M, HERZOG S, LANGE-HERBST H, ENCARNACAO JA, EICKMANN M und HERDEN C, 2014: Natürliche Borna Disease Virus-Infektion im Reservoirwirt *Crocidura leucodon*. *57. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe Pathologie in Fulda*.

NORTON WT, 1984: Recent advances in myelin biochemistry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 436: 5-10.

NÖSKE K, BILZER T, PLANZ O und STITZ L, 1998: Virus-specific CD4+ T cells eliminate borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8+ T cells. *J Virol*, 72: 4387-95.

NOWOTNY N, KOLODZIEJEK J, JEHLE CO, SUCHY A, STAEHELI P und SCHWEMMLE M, 2000: Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol*, 74: 5655-8.

O'CALLAGHAN E, SHAM P, TAKEI N, GLOVER G und MURRAY RM, 1991: Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic. *Lancet*, 337: 1248-50.

OBERHEIM NA, WANG X, GOLDMAN S und NEDERGAARD M, 2006: Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in neurosciences*, 29: 547-53.

OEY L, MULLER JM, VON KLOPMANN T, JACOBSEN B, BEINEKE A und FEIGE K, 2011: Diagnosis of internal and external hydrocephalus in a warmblood foal using magnetic resonance imaging. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere*, 39: 41-5.

OKAMOTO M, HAGIWARA K, KAMITANI W, SAKO T, HIRAYAMA K, KIRISAWA R, TSUJI M, ISHIHARA C, IWAI H, KOBAYASHI T, TOMONAGA K, IKUTA K und TANIYAMA H, 2003: Experimental vertical transmission of Borna disease virus in the mouse. *Archives of virology*, 148: 1557-68.

OKAMOTO M, KAGAWA Y, KAMITANI W, HAGIWARA K, KIRISAWA R, IWAI H, IKUTA K und TANIYAMA H, 2002: Borna disease in a dog in Japan. *Journal of comparative pathology*, 126: 312-7.

OSTROWSKI SR, KUBISKI SV, PALMERO J, REILLY CM, HIGGINS JK, COOK-CRONIN S, TAWDE SN, CROSSLEY BM, YANT P, CAZAREZ R und UZAL FA, 2012: An outbreak of equine botulism type A associated with feeding grass clippings. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 24: 601-3.

OVANESOV MV, AYHAN Y, WOLBERT C, MOLDOVAN K, SAUDER C und PLETNIKOV MV, 2008: Astrocytes play a key role in activation of microglia by persistent Borna disease virus infection. *Journal of neuroinflammation*, 5: 50.

OVANESOV MV, SAUDER C, RUBIN SA, RICHT J, NATH A, CARBONE KM und PLETNIKOV MV, 2006: Activation of microglia by borna disease virus infection: in vitro study. *J Virol*, 80: 12141-8.

PASCUAL O, CASPER KB, KUBERA C, ZHANG J, REVILLA-SANCHEZ R, SUL JY, TAKANO H, MOSS SJ, MCCARTHY K und HAYDON PG, 2005: Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science*, 310: 113-6.

PAXINOS G und WATSON C, 1998: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Coronal + Sagittal + Horizontal Drawings & Photographs. *Academic Press*, Fourth Edition.

PEARCE-KELLING S, MITCHELL WJ, SUMMERS BA und APPEL MJ, 1990: Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes: relationship to in vivo persistence and disease. *Microbial pathogenesis*, 8: 71-82.

PEARCE JW, GALLE LE, KLEIBOEKER SB, TURK JR, SCHOMMER SK, DUBIELZIG RR, MITCHELL WJ, MOORE CP und GIULIANO EA, 2007: Detection of *Leptospira interrogans* DNA and antigen in fixed equine eyes affected with end-stage equine recurrent uveitis. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 19: 686-90.

PEKNY M und NILSSON M, 2005: Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50: 427-34.

PELLEGRINO LJ und CUSHMAN AJ, 1967: A stereotaxic atlas of the rat brain. *Appleton-Century-Crofts*.

PENFIELD W und MILNER B, 1958: Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *A.M.A. archives of neurology and psychiatry*, 79: 475-97.

PEREZ M, SANCHEZ A, CUBITT B, ROSARIO D und DE LA TORRE JC, 2003: A reverse genetics system for Borna disease virus. *The Journal of general virology*, 84: 3099-104.

PEREZ M, WATANABE M, WHITT MA und DE LA TORRE JC, 2001: N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol*, 75: 7078-85.

PERLMAN S und RIES D, 1987: The astrocyte is a target cell in mice persistently infected with mouse hepatitis virus, strain JHM. *Microbial pathogenesis*, 3: 309-14.

PETZOLD A, GVERIC D, GROVES M, SCHMIERER K, GRANT D, CHAPMAN M, KEIR G, CUZNER L und THOMPSON EJ, 2008: Phosphorylation and compactness of neurofilaments in multiple sclerosis: indicators of axonal pathology. *Experimental neurology*, 213: 326-35.

PETZOLD A, TOZER DJ und SCHMIERER K, 2011: Axonal damage in the making: neurofilament phosphorylation, proton mobility and magnetisation transfer in multiple sclerosis normal appearing white matter. *Experimental neurology*, 232: 234-9.

PIEPENBRING AK, ENDERLEIN D, HERZOG S, KALETA EF, HEFFELS-REDMANN U, RESSMEYER S, HERDEN C und LIERZ M, 2012: Pathogenesis of avian bornavirus in experimentally infected cockatiels. *Emerging infectious diseases*, 18: 234-41.

PLANZ O, BILZER T, SOBBE M und STITZ L, 1993: Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J Exp Med*, 178: 163-174.

PLANZ O, PLESCHKA S, OESTERLE K, BERBERICH-SIEBELT F, EHRHARDT C, STITZ L und LUDWIG S, 2003: Borna disease virus nucleoprotein interacts with the CDC2-cyclin B1 complex. *J Virol*, 77: 11186-92.

PLANZ O und STITZ L, 1999: Borna disease virus nucleoprotein (p40) is a major target for CD8(+)-T-cell-mediated immune response. *J Virol*, 73: 1715-8.

PLATA-SALAMAN CR, ILYIN SE, GAYLE D, ROMANOVITCH A und CARBONE KM, 1999: Regional cytokine, cytokine receptor and neuropeptide mRNA changes associated with behavioral and neuroanatomical abnormalities in persistent, noninflammatory virus infection of neonatal rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 890: 469.

PLETNIKOV MV, RUBIN SA, SCHWARTZ GJ, CARBONE KM und MORAN TH, 2000: Effects of neonatal rat Borna disease virus (BDV) infection on the postnatal development of the brain monoaminergic systems. *Brain research. Developmental brain research*, 119: 179-85.

PLETNIKOV MV, RUBIN SA, SCHWARTZ GJ, MORAN TH, SOBOTKA TJ und CARBONE KM, 1999a: Persistent neonatal Borna disease virus (BDV) infection of the brain causes chronic emotional abnormalities in adult rats. *Physiology & behavior*, 66: 823-31.

PLETNIKOV MV, RUBIN SA, VASUDEVAN K, MORAN TH und CARBONE KM, 1999b: Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behavioural brain research*, 100: 43-50.

PLETNIKOV MV, RUBIN SA, VOGEL MW, MORAN TH und CARBONE KM, 2002: Effects of genetic background on neonatal Borna disease virus infection-induced neurodevelopmental damage. I. Brain pathology and behavioral deficits. *Brain research*, 944: 97-107.

POLIAK S und PELES E, 2003: The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nature reviews. Neuroscience*, 4: 968-80.

POPOVA EV, BOIKO AN, KHACHANOVA NV und SHARANOVA SN, 2014: [Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis (a review).]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova / Ministerstvo zdravookhraneniia i meditsinskoi promyshlennosti Rossiiskoi Federatsii, Vserossiiskoe obshchestvo nevrologov [i] Vserossiiskoe obshchestvo psikhiiat*, 114: 29-34.

POROMBKA D, BAUMGARTNER W und HERDEN C, 2008: A rapid method for gene expression analysis of Borna disease virus in neurons and astrocytes using laser microdissection and real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*, 148: 58-65.

PRAT CM, SCHMID S, FARRUGIA F, CENAC N, LE MASSON G, SCHWEMMLE M und GONZALEZ-DUNIA D, 2009: Mutation of the protein kinase C site in borna disease virus phosphoprotein abrogates viral interference with neuronal signaling and restores normal synaptic activity. *PLoS pathogens*, 5: 1000425.

PRINGLE CR, 1996: Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Archives of virology*, 141: 2251-6.

PRINGLE NP, MUDHAR HS, COLLARINI EJ und RICHARDSON WD, 1992: PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development*, 115: 535-51.

PUORGER ME, HILBE M, MULLER JP, KOLODZIEJEK J, NOWOTNY N, ZLINSZKY K und EHRENSPERGER F, 2010: Distribution of Borna disease virus antigen and RNA in tissues of naturally infected bicolored white-toothed shrews, *Crocidura leucodon*, supporting their role as reservoir host species. *Veterinary pathology*, 47: 236-44.

PURSELL AR, SANGSTER LT, BYARS TD, DIVERS TJ und COLE JR, JR., 1979: Neurologic disease induced by equine herpesvirus 1. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 175: 473-4.

PYPER JM, CLEMENTS JE und ZINK MC, 1998: The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J Virol*, 72: 7697-702.

RAIVICH G, BOHATSCHK M, KLOSS CU, WERNER A, JONES LL und KREUTZBERG GW, 1999: Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain research. Brain research reviews*, 30: 77-105.

RAIVICH G, JONES LL, KLOSS CU, WERNER A, NEUMANN H und KREUTZBERG GW, 1998: Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18: 5804-16.

RAIVICH G, MORENO-FLORES MT, MOLLER JC und KREUTZBERG GW, 1994: Inhibition of posttraumatic microglial proliferation in a genetic model of macrophage colony-stimulating factor deficiency in the mouse. *The European journal of neuroscience*, 6: 1615-8.

RANVIER LA, 1878: Leçons sur l'histologie du système nerveux.

RE F, BELYANSKAYA SL, RIESE RJ, CIPRIANI B, FISCHER FR, GRANUCCI F, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, BROSNAN C, STERN LJ, STROMINGER JL und SANTAMBROGIO L, 2002: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *Journal of immunology*, 169: 2264-73.

REEVES NA, HELPS CR, GUNN-MOORE DA, BLUNDELL C, FINNEMORE PL, PEARSON GR und HARBOUR DA, 1998: Natural Borna disease virus infection in cats in the United Kingdom. *The Veterinary record*, 143: 523-6.

RICE D und BARONE S, JR., 2000: Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental health perspectives*, 108: 511-33.

RICHT JA, HERZOG S, HABERZETTL K und ROTT R, 1993: Demonstration of Borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Medical microbiology and immunology*, 182: 293-304.

- RICHT JA, PFEUFFER I, CHRIST M, FRESE K, BECHTER K und HERZOG S, 1997:** Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging infectious diseases*, 3: 343-52.
- RICHT JA und ROTT R, 2001:** Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. *Veterinary journal*, 161: 24-40.
- RICHT JA, STITZ L, WEKERLE H und ROTT R, 1989:** Borna disease, a progressive meningoencephalomyelitis as a model for CD4+ T cell-mediated immunopathology in the brain. *J Exp Med*, 170: 1045-50.
- RICHT JA, VANDEWOUDE S, ZINK MC, CLEMENTS JE, HERZOG S, STITZ L, ROTT R und NARAYAN O, 1992:** Infection with Borna disease virus: molecular and immunobiological characterization of the agent. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 14: 1240-50.
- ROSARIO D, PEREZ M und DE LA TORRE JC, 2005:** Functional characterization of the genomic promoter of borna disease virus (BDV): implications of 3'-terminal sequence heterogeneity for BDV persistence. *J Virol*, 79: 6544-50.
- ROTT R und BECHT H, 1995:** Natural and experimental Borna disease in animals. *Current topics in microbiology and immunology*, 190: 17-30.
- ROTT R, HERZOG S, FLEISCHER B, WINOKUR A, AMSTERDAM J, DYSON W und KOPROWSKI H, 1985:** Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science*, 228: 755-756.
- ROWLAND LP und SHNEIDER NA, 2001:** Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine*, 344: 1688-700.
- RUBIN SA, BAUTISTA JR, MORAN TH, SCHWARTZ GJ und CARBONE KM, 1999:** Viral teratogenesis: brain developmental damage associated with maturation state at time of infection. *Brain research. Developmental brain research*, 112: 237-44.
- RUBIN SA, WALTRIP RW, 2ND, BAUTISTA JR und CARBONE KM, 1993:** Borna disease virus in mice: host-specific differences in disease expression. *J Virol*, 67: 548-52.
- RUDD PA, CATTANEO R und VON MESSLING V, 2006:** Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol*, 80: 9361-70.
- RUSSELL P, 1998:** Checkpoints on the road to mitosis. *Trends in biochemical sciences*, 23: 399-402.
- RYBAKOWSKI F, SAWADA T, YAMAGUCHI K, RAJEWSKI A und RYBAKOWSKI J, 2002:** Borna Disease Virus - reactive antibodies in Polish psychiatric patients. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 8: 642-6.
- SAKAGUCHI T, OKADA M, KITAMURA T und KAWASAKI K, 1993:** Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett*, 153: 65-8.
- SANTELLI M und VOLTERRA A, 2009:** Synaptic modulation by astrocytes via Ca²⁺-dependent glutamate release. *Neuroscience*, 158: 253-9.
- SAUDER C und DE LA TORRE JC, 1998:** Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology. *Journal of virological methods*, 71: 229-45.

- SAUDER C und DE LA TORRE JC, 1999:** Cytokine expression in the rat central nervous system following perinatal Borna disease virus infection. *Journal of neuroimmunology*, 96: 29-45.
- SAUDER C, MULLER A, CUBITT B, MAYER J, STEINMETZ J, TRABERT W, ZIEGLER B, WANKE K, MUELLER-LANTZSCH N, DE LA TORRE JC und GRASSER FA, 1996:** Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J Virol*, 70: 7713-24.
- SCHEEL M, PROKSCHA T, BAYERL M, GALLINAT J und MONTAG C, 2013:** Myelination deficits in schizophrenia: evidence from diffusion tensor imaging. *Brain structure & function*, 218: 151-6.
- 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. *Justus-Liebig-Universität Giessen, Diss.*
- SCHINDLER AR, VOGTLIN A, HILBE M, PUORGER M, ZLINSZKY K, ACKERMANN M und EHRENSPERGER F, 2007:** Reverse transcription real-time PCR assays for detection and quantification of Borna disease virus in diseased hosts. *Molecular and cellular probes*, 21: 47-55.
- SCHNEEMANN A, SCHNEIDER PA, KIM S und LIPKIN WI, 1994:** Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol*, 68: 6514-22.
- SCHNEEMANN A, SCHNEIDER PA und LIPKIN WI, 1995:** The atypical strategies used for gene expression of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *Virus*, 45: 165-74.
- SCHNEIDER PA, BRIESE T, ZIMMERMANN W, LUDWIG H und LIPKIN WI, 1994:** Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J Virol*, 68: 63-8.
- SCHNEIDER U, 2005:** Novel insights into the regulation of the viral polymerase complex of neurotropic Borna disease virus. *Virus Res*, 111: 148-60.
- SCHOBESBERGER M, ZURBRIGGEN A, DOHERR MG, WEISSENBOCK H, VANDELDELDE M, LASSMANN H und GRIOT C, 2002:** Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta neuropathologica*, 103: 11-9.
- SCHÜPPEL KF, KINNE J und REINACHER M, 1994:** Bornavirus-Antigennachweis bei Alpakas (*Lama pako*) sowie bei einem Faultier (*Choloepus didaktylus*) und einem Zwergflußpferd (*Choeropsis liberiensis*). *Verhandlungsbericht XXXVI Int Symp Erkrk Zootiere* 36: 189-94.
- SCHÜPPEL KF, REINACHER M, LEBELT J und KULKA D, 1995:** Bornasche Krankheit bei Primaten. *Verhandlungsbericht XXXVII Int Symp Erkrk Zootiere* 37: 115-20.
- SCHWARDT M, MAYER D, FRANK R, SCHNEIDER U, EICKMANN M, PLANZ O, WOLFF T und SCHWEMMLE M, 2005:** The negative regulator of Borna disease virus polymerase is a non-structural protein. *The Journal of general virology*, 86: 3163-9.
- SCHWEMMLE M, JEHLE C, SHOEMAKER T und LIPKIN WI, 1999:** Characterization of the major nuclear localization signal of the Borna disease virus phosphoprotein. *The Journal of general virology*, 80: 97-100.
- SCHWEMMLE M, SALVATORE M, SHI L, RICHT J, LEE CH und LIPKIN WI, 1998:** Interactions of the borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *The Journal of biological chemistry*, 273: 9007-12.

SEELIGER HPR, 1958: Listeriose. *Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig.*

SETOGUCHI T und KONDO T, 2004: Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor-induced astrocyte differentiation. *The Journal of cell biology*, 166: 963-8.

SHERWOOD CC, STIMPSON CD, RAGHANTI MA, WILDMAN DE, UDDIN M, GROSSMAN LI, GOODMAN M, REDMOND JC, BONAR CJ, ERWIN JM und HOF PR, 2006: Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 13606-11.

SIEDAMGROTZKY A und SCHLEGEL M, 1896: Zur Kenntniss der seuchenartigen Cerebrospinalmeningitis der Pferde. *Arch Tierheilk* 22: 287-332.

SIERRA-HONIGMANN AM, RUBIN SA, ESTAFANOUS MG, YOLKEN RH und CARBONE KM, 1993: Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *Journal of neuroimmunology*, 45: 31-6.

SIREVAAG AM und GREENOUGH WT, 1987: Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain research*, 424: 320-32.

SOBBE M, BILZER T, GOMMEL S, NÖSKE K, PLANZ O und STITZ L, 1997: Induction of degenerative brain lesions after adoptive transfer of brain lymphocytes from Borna disease virus-infected rats: presence of CD8+ T cells and perforin mRNA. *J Virol*, 71: 2400-7.

SOLBRIG MV, 2010: Animal models of CNS viral disease: examples from borna disease virus models. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2010: 709791.

SOLLMANN D, 2007: Charakterisierung der BDV-Infektion bei neugeborenen-aerogeninfizierten Ratten mittels immunhistochemischer Methoden. *Justus-Liebig-Universität Giessen, Diss.*

SPRANKEL H, RICHAZ K, LUDWIG H und ROTT R, 1978: Behavior alterations in tree shrews (*Tupaia glis*, Diard 1820) induced by Borna disease virus. *Medical microbiology and immunology*, 165: 1-18.

STAEHELI P, SAUDER C, HAUSMANN J, EHRENSPERGER F und SCHWEMMLE M, 2000: Epidemiology of Borna disease virus. *The Journal of general virology*, 81: 2123-35.

STARR R, ATTEMA B, DEVRIES GH und MONTEIRO MJ, 1996: Neurofilament phosphorylation is modulated by myelination. *J Neurosci Res*, 44: 328-37.

STEIN VM, CZUB M, SCHREINER N, MOORE PF, VANDELDELDE M, ZURBRIGGEN A und TIPOLD A, 2004: Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *Journal of neuroimmunology*, 153: 122-31.

STERNBERGER NH, STERNBERGER LA und ULRICH J, 1985: Aberrant neurofilament phosphorylation in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 4274-6.

STITZ L, BILZER T und PLANZ O, 2002: The immunopathogenesis of Borna disease virus infection. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 7: 541-55.

STITZ L, BILZER T, RICHT JA und ROTT R, 1993: Pathogenesis of Borna disease. *Archives of virology. Supplementum*, 7: 135-51.

STITZ L, DIETZSCHOLD B und CARBONE KM, 1995: Immunopathogenesis of Borna disease. *Current topics in microbiology and immunology*, 190: 75-92.

- STITZ L, KREY H und LUDWIG H, 1981:** Borna disease in rhesus monkeys as a models for uveo-cerebral symptoms. *Journal of medical virology*, 6: 333-40.
- STITZ L, PLANZ O, BILZER T, FREI K und FONTANA A, 1991:** Transforming growth factor-beta modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus. Pathogenic importance of CD8+ cells and suppression of antibody formation. *Journal of immunology*, 147: 3581-6.
- STREIT WJ, 2002:** Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40: 133-9.
- STREIT WJ und KREUTZBERG GW, 1988:** Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *The Journal of comparative neurology*, 268: 248-63.
- SWANSON RA, YING W und KAUPPINEN TM, 2004:** Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Current molecular medicine*, 4: 193-205.
- SYKOVA E, SVOBODA J, SIMONOVA Z und JENDELOVA P, 1992:** Role of astrocytes in ionic and volume homeostasis in spinal cord during development and injury. *Progress in brain research*, 94: 47-56.
- SZELIGO F und LEBLOND CP, 1977:** Response of the three main types of glial cells of cortex and corpus callosum in rats handled during suckling or exposed to enriched, control and impoverished environments following weaning. *The Journal of comparative neurology*, 172: 247-63.
- TANIYAMA H, OKAMOTO M, HIRAYAMA K, HAGIWARA K, KIRISAWA R, KAMITANI W, TSUNODA N und IKUTA K, 2001:** Equine Borna disease in Japan. *The Veterinary record*, 148: 480-2.
- TROJANOWSKI JQ und LEE VM, 1998:** Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Archives of neurology*, 55: 151-2.
- TSACOPOULOS M und MAGISTRETTI PJ, 1996:** Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16: 877-85.
- TSAI HH und MILLER RH, 2002:** Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends in neurosciences*, 25: 173-6.
- TSIANG H, 1979:** Evidence for an intraaxonal transport of fixed and street rabies virus. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 38: 286-99.
- ULRICH J und LARDI H, 1978:** Multiple sclerosis: demyelination and myelination inhibition of organotypic tissue cultures of the spinal cord by sera of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Journal of neurology*, 218: 7-16.
- UYEDA CT, ENG LF und BIGNAMI A, 1972:** Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain research*, 37: 81-9.
- VAN DAMSEN B, 2012:** Sommerliche Schattenseiten - Hilfe bei Gefahren durch Hitze und Sonne. *Jahr & Co. Verlag, Kavallo*, 9.
- VAN DER REE M und WIJNBERG I, 2012:** A review on epilepsy in the horse and the potential of Ambulatory EEG as a diagnostic tool. *The Veterinary quarterly*, 32: 159-67.
- VANDEVELDE M, FANKHAUSER R, KRISTENSEN F und KRISTENSEN B, 1981:** Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. *Acta neuropathologica*, 54: 31-41.

- VANDEVELDE M, ZURBRIGGEN A, DUMAS M und PALMER D, 1985:** Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro. *Journal of the neurological sciences*, 69: 133-7.
- VIRCHOW R, 1846:** in: *Handbuch der allgemeinen pathologischen Anatomie Medicinische Zeitung*, 15.
- VIRCHOW R, 1854:** Über das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, 6: 562-72.
- VON SIND JB, 1767:** Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt, welcher einen gründlichen Unterricht von den gewöhnlichsten Krankheiten der Pferde im Feld und auf der Reise wie auch einen auserlesenen Vorrath der nützlichsten und durch Erfahrung bewährtesten Heilmitteln eröffnet. *Bey Heinrich Ludwig Brönnner, Frankfurt und Leipzig*.
- WALKER FR, BEYNON SB, JONES KA, ZHAO Z, KONGSUI R, CAIRNS M und NILSSON M, 2014:** Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: A review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain, behavior, and immunity*, 37C: 1-14.
- WALTHER F, 1899:** Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde in der Amtshauptmannschaft Borna. *Mitteilungen aus den Berichten der Bezirksthierärzte auf das Jahr 1899. Ber Veterinärwesen Königr Sachsen*, 41: 123-5.
- WALTRIP RW, BUCHANAN RW, SUMMERFELT A, BREIER A, CARPENTER WT, JR., BRYANT NL, RUBIN SA und CARBONE KM, 1995:** Borna disease virus and schizophrenia. *Psychiatry research*, 56: 33-44.
- WALZ W, 1989:** Role of glial cells in the regulation of the brain ion microenvironment. *Progress in neurobiology*, 33: 309-33.
- WATANABE M, LEE BJ, KAMITANI W, KOBAYASHI T, TANIYAMA H, TOMONAGA K und IKUTA K, 2001:** Neurological diseases and viral dynamics in the brains of neonatally borna disease virus-infected gerbils. *Virology*, 282: 65-76.
- WATANABE M, LEE BJ, YAMASHITA M, KAMITANI W, KOBAYASHI T, TOMONAGA K und IKUTA K, 2003:** Borna disease virus induces acute fatal neurological disorders in neonatal gerbils without virus- and immune-mediated cell destructions. *Virology*, 310: 245-53.
- WATANABE Y, IBRAHIM MS, HAGIWARA K, OKAMOTO M, KAMITANI W, YANAI H, OHTAKI N, HAYASHI Y, TANIYAMA H, IKUTA K und TOMONAGA K, 2007:** Characterization of a Borna disease virus field isolate which shows efficient viral propagation and transmissibility. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 9: 417-27.
- WEISSENBOCK H, BILZER T, EHRENSPERGER F, GOSZTONYI G, HERDEN C, STAEHLI P, HAUSMANN J und PAGENSTECHE A, 2002:** Equine borna disease in Japan. *The Veterinary record*, 151: 712.
- WEISSENBOCK H, HORNIG M, HICKEY WF und LIPKIN WI, 2000:** Microglial activation and neuronal apoptosis in Bornavirus infected neonatal Lewis rats. *Brain pathology*, 10: 260-72.
- WEISSENBOCK H, NOWOTNY N, CAPLAZI P, KOLODZIEJEK J und EHRENSPERGER F, 1998a:** Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *Journal of clinical microbiology*, 36: 2127-2130.
- WEISSENBOCK H, SUCHY A, CAPLAZI P, HERZOG S und NOWOTNY N, 1998b:** Borna disease in Austrian horses. *The Veterinary record*, 143: 21-2.

- WENSMAN JJ, JADERLUND KH, HOLST BS und BERG M, 2013:** Borna disease virus infection in cats. *Veterinary journal*.
- WENSMAN JJ, THOREN P, HAKHVERDYAN M, BELAK S und BERG M, 2007:** Development of a real-time RT-PCR assay for improved detection of Borna disease virus. *Journal of virological methods*, 143: 1-10.
- WIGGINS RC, 1982:** Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain research*, 257: 151-75.
- WILHELMSSON U, LI L, PEKNA M, BERTHOLD CH, BLOM S, ELIASSON C, RENNER O, BUSHONG E, ELLISMAN M, MORGAN TE und PEKNY M, 2004:** Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24: 5016-21.
- WILLIAMS KC, DOOLEY NP, ULVESTAD E, WAAGE A, BLAIN M, YONG VW und ANTEL JP, 1995:** Antigen presentation by human fetal astrocytes with the cooperative effect of microglia or the microglial-derived cytokine IL-1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15: 1869-78.
- WOLFF T, HEINS G, PAULI G, BURGER R und KURTH R, 2006:** Failure to detect Borna disease virus antigen and RNA in human blood. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 36: 309-11.
- WOLSWIJK G und NOBLE M, 1989:** Identification of an adult-specific glial progenitor cell. *Development*, 105: 387-400.
- WÖRZ JJ, 1858:** Die halbakute Gehirnentzündung oder Kopfkrankheit der Pferde. . *Ebner & Seubert, Stuttgart*.
- XIE F, ZHANG JC, FU H und CHEN J, 2013:** Age-related decline of myelin proteins is highly correlated with activation of astrocytes and microglia in the rat CNS. *International journal of molecular medicine*, 32: 1021-1028.
- YAMAGUCHI K, SAWADA T, NARAKI T, IGATA-YI R, SHIRAKI H, HORII Y, ISHII T, IKEDA K, ASOU N, OKABE H, MOCHIZUKI M, TAKAHASHI K, YAMADA S, KUBO K, YASHIKI S, WALTRIP RW, 2ND und CARBONE KM, 1999:** Detection of borna disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 6: 696-700.
- YESILBAG K, HERZOG S, KENNERMAN E, TUNCER P, SCHMID S, KAYA G und THIEL HJ, 2012:** Serological evidence for infections with Borna disease virus in Turkey. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift*, 125: 452-5.
- YILMAZ H, HELPS CR, TURAN N, UYSAL A und HARBOUR DA, 2002:** Detection of antibodies to Borna disease virus (BDV) in Turkish horse sera using recombinant p40. Brief report. *Archives of virology*, 147: 429-35.
- ZANGER R, 1863:** Die Hirnentzündung des Pferdes. *Arch Tierheilk*, 23: 278-9.
- ZHAI J, LIN H, JULIEN JP und SCHLAEPFER WW, 2007:** Disruption of neurofilament network with aggregation of light neurofilament protein: a common pathway leading to motor neuron degeneration due to Charcot-Marie-Tooth disease-linked mutations in NFL and HSPB1. *Human molecular genetics*, 16: 3103-16.

ZHANG Q, PANGRSIC T, KREFT M, KRZAN M, LI N, SUL JY, HALASSA M, VAN BOCKSTAELE E, ZOREC R und HAYDON PG, 2004: Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279: 12724-33.

ZIMMERMANN W, BRETER H, RUDOLPH M und LUDWIG H, 1994: Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. *J Virol*, 68: 6755-8.

ZURBRIGGEN A, YAMAWAKI M und VANDEVELDE M, 1993: Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 68: 277-84.

ZWICK W, 1939: Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere. In: *GILDENMEISTER, E.; HAAGEN, E. und WALDMANN, O. (Hrsg.): Handbuch der Viruskrankheiten. Gustav Fischer Verlag, Jena., 2: 254-354.*

ZWICK W und SEIFRIED O, 1925: Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). *Berl Tierärztl Wochenschr*, 41: 129-32.

ZWICK W, SEIFRIED O und WITTE J, 1927: Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). *Z Infkrkh Haustiere*, 30: 42-136.

9. ANHANG

Tabelle 9-1: Auszählung degenerierter Neuronen im Hippocampus

Lokalisation	CA1	CA1	CA2	CA2	CA3	CA3	Gd
Status	ges	deg	ges	deg	ges	deg	
Tier							
4 bis 6 Wochen							
Lewis NL-4	-	-	-	-	-	-	-
BDV neg 4Wo	-	-	-	-	-	-	-
6. NL Lewis	-	-	-	-	-	-	-
4. NBAE T6	-	-	-	-	-	-	-
6. NBAE T7	-	-	-	-	-	-	-
19 NBAE.1	-	-	-	-	-	-	-
19 NBAE.2	-	-	-	-	-	-	-
19 NBAE.3	-	-	-	-	-	-	-
4 bis 6 Monate							
Lewis NL 1	-	-	53	2	23	2	-
Lewis NL 2	-	-	-	-	-	-	-
Lewis NL 3	-	-	-	-	33	3	-
Lewis NL 4	-	-	-	-	-	-	-
22. NL Lewis	-	-	-	-	-	-	-
I BDV NBAE 1 (Nr. 4)	-	-	-	-	-	-	-
I BDV NBAE 2 (Nr. 6)	-	-	-	-	13	9	-
I BDV NBAE 3 (Nr. 9)	-	-	-	-	-	-	-
I BDV NBAE (Nr. 11)	-	-	-	-	23	3	-
II BDV NBAE 1 (Nr. 7)	23	3	-	-	-	-	-
II BDV NBAE 2 (Nr. 10)	20	4	-	-	-	-	-
II BDV NBAE 3 (Nr. 13)	-	-	-	-	21	1	-
II BDV NBAE 4 (Nr. 14)	-	-	-	-	-	-	-
III BDV NBAE 1 (Nr. 5)	-	-	-	-	-	-	-
III BDV NBAE 2 (Nr. 3)	38	8	-	-	-	-	-
III BDV NBAE 3 (Nr. 12)	-	-	25	5	24	4	-
IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)	24	4	42	2	-	-	-
BDV NBAE 4 (Nr. 8)	-	-	-	-	33	3	-

Tabelle 9-1: (Fortsetzung)

Lokalisation	CA1	CA1	CA2	CA2	CA3	CA3	Gd
Status	ges	deg	ges	deg	ges	deg	
Tier							
12 bis 15 Monate							
Lewis Kontrolle NL ♀ 1	-	-	-	-	-	-	-
Lewis Kontrolle NL ♀ 2	-	-	-	-	21	1	-
Lewis Kontrolle NL ♀ 3	-	-	-	-	-	-	-
Lewis Kontrolle NL ♂ 1	-	-	-	-	-	-	-
Lewis Kontrolle NL ♂ 2	-	-	n. a.	n. a.	-	-	-
Lewis Kontrolle NL ♂ 3	-	-	n. a.	n. a.	-	-	-
BDV Low Carrier NBAE ♀ 1	35	5	-	-	-	-	-
BDV Low Carrier NBAE ♀ 2	-	-	-	-	-	-	-
BDV Low Carrier NBAE ♀ 5	33	3	-	-	n. a.	n. a.	n. a.
BDV Low Carrier NBAE ♂ 1	34	3	-	-	45	5	-
BDV Low Carrier NBAE ♂ 2	-	-	-	-	-	-	-
BDV Low Carrier NBAE ♂ 3	-	-	-	-	-	-	-
14 NBAE 1	25	5	-	-	-	-	-
off VIII NBAE	7	2	-	-	-	-	-
19 Monate							
12 NBAE 1	22	2	44	14	22	12	-
12 NBAE 2	-	-	-	-	29	14	-
13 NBAE 7	30	10	-	-	30	10	n. a.
13 NBAE 8	-	-	-	-	13	3	n. a.
21 bis 26 Monate							
Lewis 53	31	1	-	-	-	-	-
Lewis 61	35	10	26	1	22	2	-
Lewis 65	-	-	-	-	-	-	-
11 NBAE 8	17	2	-	-	11	7	-
IX NBAE 4	22	16	-	-	-	-	-
18 NBAE 1	-	-	-	-	-	-	-
18 NBAE 2	27	12	-	-	28	20	-
18 NBAE 5	30	10	-	-	-	-	-
18 NBAE 6	-	-	21	1	26	1	-
18 NBAE 8	-	-	-	-	22	2	-

Angaben in absoluten Zahlen; verblindete Auszählung; BDV = Borna-Disease-Virus; CA = Cornu ammonis (Ammonshorn); deg = degeneriert; Gd = Gyrus dentatus; ges = gesamt; m/♂ = männlich; n. a. = nicht auswertbar; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen; - = keine Veränderung

Tabelle 9-2: Auszählung der Purkinjezellen

Gesichtsfeld	1	2	3	4	5
Tier					
4 bis 6 Wochen					
Lewis NL-4	12	10	8	11	11
BDV neg 4Wo	7	8	8	9	7
6. NL Lewis	12	16	10	11	10
4. NBAE T6	8	6	6	9	7
6. NBAE T7	7	4	8	6	4
19 NBAE.1	11	7	9	9	8
19 NBAE.2	10	9	9	9	8
19 NBAE.3	9	9	8	7	4
4 bis 6 Monate					
Lewis NL 1	8	8	7	12	10
Lewis NL 2	7	7	9	9	8
Lewis NL 3	10	10	6	8	11
Lewis NL 4	9	6	7	8	10
22. NL Lewis	8	9	9	10	9
I BDV NBAE 1 (Nr. 4)	1	2	3	1	4
I BDV NBAE 2 (Nr. 6)	4	4	2	1	2
I BDV NBAE 3 (Nr. 9)	1	3	1	4	2
I BDV NBAE (Nr. 11)	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 1 (Nr. 7)	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 2 (Nr. 10)	2	4	1	2	2
II BDV NBAE 3 (Nr. 13)	4	4	3	4	3
II BDV NBAE 4 (Nr. 14)	3	3	2	4	3
III BDV NBAE 1 (Nr. 5)	2	4	5	1	2
III BDV NBAE 2 (Nr. 3)	4	3	5	2	5
III BDV NBAE 3 (Nr. 12)	2	2	3	2	2
IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)	4	2	2	3	5
BDV NBAE 4 (Nr. 8)	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.

Tabelle 9-2: (Fortsetzung)

Gesichtsfeld	1	2	3	4	5
Tier					
12 bis 15 Monate					
Lewis Kontrolle NL ♀ 1	11	8	8	10	9
Lewis Kontrolle NL ♀ 2	9	8	9	7	7
Lewis Kontrolle NL ♀ 3	7	5	5	5	6
Lewis Kontrolle NL ♂ 1	6	7	8	6	7
Lewis Kontrolle NL ♂ 2	5	7	6	6	7
Lewis Kontrolle NL ♂ 3	7	7	5	6	6
BDV Low Carrier NBAE ♀ 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
BDV Low Carrier NBAE ♀ 2	2	2	3	1	1
BDV Low Carrier NBAE ♀ 5	3	1	3	2	2
BDV Low Carrier NBAE ♂ 1	1	2	2	1	3
BDV Low Carrier NBAE ♂ 2	2	2	3	5	2
BDV Low Carrier NBAE ♂ 3	2	1	2	1	3
14 NBAE 1	5	2	3	5	4
off VIII NBAE	3	5	3	3	4
19 Monate					
12 NBAE 1	4	2	2	4	3
12 NBAE 2	2	3	3	2	1
13 NBAE 7	2	1	2	1	2
13 NBAE 8	2	3	3	3	3
21 bis 26 Monate					
Lewis 53	7	6	4	5	5
Lewis 61	4	5	4	7	5
Lewis 65	5	5	6	6	6
11 NBAE 8	4	2	4	3	4
IX NBAE 4	1	1	2	2	2
18 NBAE 1	2	1	2	1	0
18 NBAE 2	2	1	0	1	0
18 NBAE 5	3	2	1	1	0
18 NBAE 6	1	2	0	1	1
18 NBAE 8	2	2	0	1	1

Angaben in absoluten Zahlen; verblindete Auszählung; BDV = Borna-Disease-Virus; m/♂ = männlich; n. a. = nicht auswertbar; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen

Tabelle 9-3: Auszählung der BDV-infizierten Zellen

Lokalisation	Gesichtsfeld	Status	Tier	K			Hc			CA			KHM											
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3						
				ges	p38	p38	ges	p38	p38	ges	p38	p38	ges	p38	p38	ges	p38							
4 bis 6 Wochen				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
Lewis NL-4				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
BDV neg 4Wo				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
6. NL Lewis				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
4. NBAE T6				35	50	90	8	10	30	15	15	25	2	2	1	30	50	25	40	45	12	20	10	
6. NBAE T7				90	50	30	30	20	7	35	40	30	3	1	4	40	35	30	10	45	35	20	20	
19 NBAE.1				50	60	60	18	17	18	70	90	80	20	17	12	15	100	50	9	50	20	90	50	60
19 NBAE.2				40	60	90	8	7	21	30	35	35	4	6	9	100	60	50	70	40	30	50	60	40
19 NBAE.3				70	50	60	21	15	11	50	45	40	9	13	4	60	30	50	18	8	40	50	60	30
4 bis 6 Monate				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lewis NL1				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis NL2				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis NL3				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis NL4				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22. NL Lewis				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
I BDV NBAE1 (Nr. 4)				110	70	70	50	26	40	30	5	10	5	3	2	55	60	40	28	40	30	90	140	20
I BDV NBAE2 (Nr. 6)				50	40	70	10	20	25	20	20	20	1	3	1	40	40	30	35	18	30	70	60	30
I BDV NBAE3 (Nr. 9)				50	40	50	20	15	23	50	40	30	8	6	1	30	20	40	20	10	25	30	40	50
I BDV NBAE (Nr. 11)				30	60	35	16	9	25	25	15	20	7	7	7	30	40	40	20	30	25	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE1 (Nr. 7)				40	45	40	15	20	12	25	25	15	3	10	3	40	30	30	30	15	20	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE2 (Nr. 10)				40	20	30	13	8	8	30	25	20	9	4	2	40	40	30	40	20	22	30	40	40
II BDV NBAE3 (Nr. 13)				30	30	30	18	2	20	15	25	25	3	3	2	40	20	50	20	12	30	30	40	50
II BDV NBAE4 (Nr. 14)				50	60	30	20	30	15	25	30	20	2	2	3	10	35	40	5	30	40	30	30	40
III BDV NBAE1 (Nr. 5)				80	50	100	60	37	40	40	30	30	9	8	4	60	35	30	34	28	19	40	20	40
III BDV NBAE2 (Nr. 3)				90	100	240	25	26	47	70	60	30	10	7	3	80	50	90	51	34	67	70	170	100
III BDV NBAE3 (Nr. 12)				35	40	40	20	18	30	20	10	15	1	1	4	50	25	30	40	25	25	15	70	50
IV BDV NBAE1 (Nr. 1)				200	150	110	25	41	52	40	40	50	5	20	9	170	70	50	70	50	30	34	40	30
BDV NBAE4 (Nr. 8)				45	40	30	22	30	21	20	10	20	5	2	1	30	40	30	25	30	26	n. a.	n. a.	n. a.

Tabelle 9-3: (Fortsetzung)

Lokalisation	Gestirnsfeld	Status	Tier	K		K		K		Hc		Hc		CA		CA		KEM		KEM		
				1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
12 bis 15 Monate				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lewis Kontrolle	NL ♀ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis Kontrolle	NL ♀ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis Kontrolle	NL ♀ 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis Kontrolle	NL ♂ 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis Kontrolle	NL ♂ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis Kontrolle	NL ♂ 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BDV Lew Carrier	NBAE ♀ 1	110	150	18	30	7	50	50	30	5	15	2	40	30	35	25	20	20	50	40	30	
BDV Lew Carrier	NBAE ♀ 2	80	70	4	1	3	40	30	30	6	7	5	50	40	40	30	30	35	n. a.	n. a.	n. a.	
BDV Lew Carrier	NBAE ♀ 5	80	100	100	8	5	7	20	30	30	4	10	7	40	35	50	30	40	30	100	50	
BDV Lew Carrier	NBAE ♂ 1	50	30	30	3	12	13	20	10	30	3	1	7	30	30	10	5	14	30	20	20	
BDV Lew Carrier	NBAE ♂ 2	30	50	40	14	11	15	40	30	30	15	8	6	25	40	30	20	30	25	20	20	
BDV Lew Carrier	NBAE ♂ 3	40	30	50	20	5	30	20	20	4	5	7	40	40	40	35	25	30	20	18	30	
14 NBAE 1		30	25	15	11	12	4	15	30	15	1	1	3	30	20	30	20	5	13	30	25	
off VIII NBAE		40	40	40	14	13	16	30	20	30	2	1	1	20	18	19	13	12	12	40	50	
19 Monate				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12 NBAE 1		40	50	24	20	13	14	30	30	35	4	7	2	40	50	23	35	45	15	25	30	
12 NBAE 2		30	40	35	14	30	24	20	15	10	3	2	1	50	30	35	45	25	20	30	20	
13 NBAE 7		20	25	35	15	13	20	10	10	15	3	5	4	50	35	30	40	20	20	25	15	
13 NBAE 8		35	35	15	17	10	7	15	15	10	3	3	5	30	25	20	25	20	18	30	35	
21 bis 26 Monate				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lewis 53		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis 61		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis 65		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabelle 9-3: (Fortsetzung)

Lokalisation	Gesichtsfeld	Status	Tier	KHM	KHM	KHM	Kör	Kör	Kör	Kör	PZ	PZ	PZ	PZ	Mol	Mol	Mol	Mol	Mol	Mol				
				1	2	3	ges	1	2	3	ges	1	2	3	ges	1	2	3	1	2	3	1	2	3
12 bis 15 Monate				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lewis Kontrolle	NL	♀	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lewis Kontrolle	NL	♀	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lewis Kontrolle	NL	♀	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lewis Kontrolle	NL	♂	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lewis Kontrolle	NL	♂	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Lewis Kontrolle	NL	♂	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
BDV Low Carrier	NBAE	♀	1	2	2	3	300	200	250	2	8	3	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	30	40	40	3	5		
BDV Low Carrier	NBAE	♀	2	n. a.	n. a.	n. a.	300	250	200	1	1	1	2	3	3	1	1	1	37	40	40	2	2	
BDV Low Carrier	NBAE	♀	5	19	9	5	150	300	300	10	8	5	2	3	2	1	1	2	50	29	30	3	2	
BDV Low Carrier	NBAE	♂	1	15	8	5	250	200	300	2	5	3	2	4	3	1	1	1	27	30	30	8	10	
BDV Low Carrier	NBAE	♂	2	2	4	3	250	200	200	20	25	20	5	2	3	1	1	1	30	25	30	1	5	
BDV Low Carrier	NBAE	♂	3	8	4	11	300	200	300	20	10	5	3	2	3	1	1	1	30	30	40	8	10	
14 NBAE 1				1	3	3	250	250	300	4	3	10	6	4	5	1	1	0	20	30	20	2	1	
off VIII NBAE				4	6	7	100	300	300	4	12	11	3	4	3	2	0	2	35	20	50	1	1	
19 Monate																								
12 NBAE 1				3	3	3	300	300	150	30	20	14	2	4	3	1	0	0	15	20	20	3	2	
12 NBAE 2				2	3	3	120	150	300	13	25	6	3	3	5	0	1	0	25	30	15	4	3	
13 NBAE 7				8	7	10	200	150	80	20	20	20	4	3	3	1	1	0	18	15	15	7	9	
13 NBAE 8				4	3	2	150	200	250	20	10	20	3	4	3	2	0	0	15	15	25	6	3	
21 bis 26 Monate																								
Lewis 53				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis 61				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Lewis 65				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabelle 9-3: (Fortsetzung)

Lokalisation	K	K	K	K	K	Hc	Hc	Hc	CA	CA	CA	CA	KHM	KHM	KHM						
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3						
Gesichtsfeld	ges	ges	p38	p38	ges	ges	p38	ges	p38	ges	p38	ges	p38	ges	ges						
Status																					
Tier																					
21 bis 26 Monate																					
11 NBAE 8	20	25	20	9	10	14	10	15	15	4	5	7	30	30	25	20	30	24	25	30	20
IX NBAE 4	35	25	25	20	12	15	15	10	15	3	1	4	20	30	25	6	17	3	30	30	25
18 NBAE 1	25	20	20	10	8	10	10	15	15	3	4	7	15	8	15	10	6	10	25	30	15
18 NBAE 2	25	30	30	15	12	14	10	15	20	5	5	2	30	12	20	10	9	15	40	30	38
18 NBAE 5	25	25	15	13	12	5	10	10	15	10	5	7	35	20	20	30	19	12	30	25	19
18 NBAE 6	15	30	20	9	14	10	10	10	9	1	3	2	25	30	25	20	20	20	50	30	40
18 NBAE 8	20	30	20	11	20	14	15	10	10	4	3	2	15	25	25	11	20	20	30	30	20

Lokalisation	KHM	KHM	KHM	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	Kör	PZ	PZ	PZ	PZ	Mol	Mol	Mol	Mol	Mol	Mol	Mol	Mol
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Gesichtsfeld	p38	p38	ges	ges	ges	p38	p38	p38	ges	ges	p38	ges	p38	ges	p38	ges	p38	ges	p38	ges	p38
Status																					
Tier																					
21 bis 26 Monate																					
11 NBAE 8	3	3	4	250	250	300	100	50	10	4	3	3	0	1	0	25	15	30	5	7	1
IX NBAE 4	1	2	2	250	300	250	8	30	20	2	3	2	0	0	2	15	20	23	3	3	4
18 NBAE 1	3	6	2	100	250	150	20	13	15	2	4	4	1	0	1	30	19	15	8	5	5
18 NBAE 2	6	1	2	150	100	200	4	5	2	2	3	2	0	1	0	15	20	20	1	1	2
18 NBAE 5	3	3	7	120	100	90	12	50	20	4	3	4	0	1	1	15	10	15	2	4	6
18 NBAE 6	5	3	2	300	300	250	4	5	10	4	3	3	1	0	1	35	40	30	1	2	3
18 NBAE 8	2	3	1	250	300	300	20	10	6	3	3	2	1	0	0	30	30	25	3	1	2

Angaben in absoluten Zahlen; Auszählung verblindet und unabhängig vom Zelltyp; BDV = Borna-Disease-Virus; CA = Ammonshorn und Gyrus dentatus (große Neuronen); ges = gesamt; Hc = Hippocampus (Bereich neben CA); K = Kortex; KHM = Kleinhirnmark; Kör = Körnerzellschicht des Kleinhirns; m/♂ = männlich; Mol = Molekularschicht des Kleinhirns; n. a. = nicht auswertbar; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; PZ = Purkinjzellschicht; p38 = Borna-Disease-Virus-infiziert; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen; - = p38-negativ

Tabelle 9-4: Auszählung der Astrozyten

Lokalisation	K	K	K	Hc	Hc	Hc	KHM	KHM	KHM
Gesichtsfeld	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tier									
4 bis 6 Wochen									
Lewis NL-4	13	14	12	15	19	15	15	10	8
BDV neg 4Wo	8	10	7	10	17	19	22	17	19
6. NL Lewis	13	14	20	16	15	18	10	17	11
4. NBAE T6	22	22	21	24	23	25	23	22	18
6. NBAE T7	16	18	14	27	22	26	29	15	27
19 NBAE.1	17	18	23	24	27	20	18	21	15
19 NBAE.2	21	22	21	30	29	27	23	18	17
19 NBAE.3	20	26	20	31	30	33	22	21	24
4 bis 6 Monate									
Lewis NL 1	n. a.	n. a.	n. a.	14	21	18	15	13	10
Lewis NL 2	10	8	10	22	15	12	12	20	15
Lewis NL 3	9	13	10	13	15	15	10	15	11
Lewis NL 4	13	9	15	15	16	12	20	15	7
22. NL Lewis	17	21	16	18	17	19	16	14	10
I BDV NBAE 1 (Nr. 4)	11	10	18	17	18	17	16	13	13
I BDV NBAE 2 (Nr. 6)	20	13	13	17	18	20	15	13	12
I BDV NBAE 3 (Nr. 9)	17	11	11	15	14	13	15	13	14
I BDV NBAE (Nr. 11)	17	15	12	21	20	20	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 1 (Nr. 7)	15	10	15	19	19	10	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 2 (Nr. 10)	10	14	14	19	18	15	33	14	18
II BDV NBAE 3 (Nr. 13)	15	20	16	21	26	19	15	11	9
II BDV NBAE 4 (Nr. 14)	11	20	11	29	19	25	17	15	9
III BDV NBAE 1 (Nr. 5)	15	11	8	17	20	17	18	15	17
III BDV NBAE 2 (Nr. 3)	16	15	13	15	18	20	18	16	10
III BDV NBAE 3 (Nr. 12)	10	9	13	21	18	20	12	13	12
IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)	11	13	13	17	19	16	12	15	13
BDV NBAE 4 (Nr. 8)	10	18	20	16	14	18	n. a.	n. a.	n. a.

Tabelle 9-4: (Fortsetzung)

Lokalisation	K	K	K	Hc	Hc	Hc	KHM	KHM	KHM
Gesichtsfeld	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tier									
12 bis 15 Monate									
Lewis Kontrolle NL ♀ 1	11	14	7	10	11	15	20	10	11
Lewis Kontrolle NL ♀ 2	15	13	16	25	14	18	11	16	11
Lewis Kontrolle NL ♀ 3	20	17	25	16	20	17	20	19	12
Lewis Kontrolle NL ♂ 1	16	23	19	21	18	18	11	15	20
Lewis Kontrolle NL ♂ 2	10	14	12	12	15	17	18	16	12
Lewis Kontrolle NL ♂ 3	16	14	17	20	18	14	11	10	10
BDV Low Carrier NBAE ♀ 1	20	25	21	23	20	23	22	28	26
BDV Low Carrier NBAE ♀ 2	25	20	30	26	25	20	n. a.	n. a.	n. a.
BDV Low Carrier NBAE ♀ 5	25	33	25	19	22	32	20	23	23
BDV Low Carrier NBAE ♂ 1	33	32	32	31	30	33	30	28	33
BDV Low Carrier NBAE ♂ 2	27	20	31	30	28	28	25	26	26
BDV Low Carrier NBAE ♂ 3	24	25	27	22	21	16	n. a.	n. a.	n. a.
14 NBAE 1	21	16	14	12	8	13	11	10	9
off VIII NBAE	10	14	8	15	10	14	11	15	11
19 Monate									
12 NBAE 1	12	7	12	15	21	15	10	9	15
12 NBAE 2	13	9	10	12	8	11	11	7	15
13 NBAE 7	15	13	11	18	15	14	9	7	14
13 NBAE 8	11	12	12	9	13	10	18	15	13
21 bis 26 Monate									
Lewis 53	16	17	15	11	14	15	12	14	13
Lewis 61	13	17	18	28	28	20	18	18	24
Lewis 65	17	20	16	27	26	20	24	25	20
11 NBAE 8	10	11	13	13	8	15	13	14	12
IX NBAE 4	13	15	13	12	16	11	15	15	10
18 NBAE 1	7	9	7	17	15	13	14	12	14
18 NBAE 2	11	13	12	14	12	16	16	14	10
18 NBAE 5	11	10	10	9	7	13	9	10	8
18 NBAE 6	15	14	11	12	14	10	13	14	10
18 NBAE 8	12	13	13	9	8	17	15	16	15

Angaben in absoluten Zahlen; verblindete Auszählung; BDV = Borna-Disease-Virus; Hc = Hippocampus (Bereich neben Ammonshorn); K = Kortex; KHM = Kleinhirnmarm; m/♂ = männlich; n. a. = nicht auswertbar; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen

Tabelle 9-5: Auszählung der Oligodendrozyten

Lokalisation	Cc	Cc	Cc	KHM	KHM	KHM
Gesichtsfeld	1	2	3	1	2	3
Tier						
4 bis 6 Wochen						
Lewis NL-4	42	31	30	25	31	30
BDV neg 4Wo	45	50	45	21	20	20
6. NL Lewis	50	35	30	17	18	17
4. NBAE T6	20	30	30	16	15	18
6. NBAE T7	30	35	32	n. a.	n. a.	n. a.
19 NBAE.1	35	29	28	25	22	20
19 NBAE.2	22	25	25	25	19	17
19 NBAE.3	33	28	30	30	32	30
4 bis 6 Monate						
Lewis NL 1	46	40	40	19	17	16
Lewis NL 2	45	42	40	18	15	20
Lewis NL 3	40	40	42	20	15	17
Lewis NL 4	45	42	45	20	18	15
22. NL Lewis	50	45	37	15	12	12
I BDV NBAE 1 (Nr. 4)	35	30	30	14	9	10
I BDV NBAE 2 (Nr. 6)	25	30	20	9	10	9
I BDV NBAE 3 (Nr. 9)	30	25	25	16	10	11
I BDV NBAE (Nr. 11)	35	25	30	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 1 (Nr. 7)	30	35	20	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 2 (Nr. 10)	25	25	20	10	15	10
II BDV NBAE 3 (Nr. 13)	30	35	32	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 4 (Nr. 14)	n. a.	n. a.	n. a.	19	12	10
III BDV NBAE 1 (Nr. 5)	20	20	25	19	7	14
III BDV NBAE 2 (Nr. 3)	25	35	25	17	12	9
III BDV NBAE 3 (Nr. 12)	35	30	28	9	10	8
IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)	35	40	30	14	15	11
BDV NBAE 4 (Nr. 8)	36	30	27	n. a.	n. a.	n. a.

Tabelle 9-5: (Fortsetzung)

Lokalisation	Cc	Cc	Cc	KHM	KHM	KHM
Gesichtsfeld	1	2	3	1	2	3
Tier						
12 bis 15 Monate						
Lewis Kontrolle NL ♀ 1	25	29	30	14	17	15
Lewis Kontrolle NL ♀ 2	45	40	38	n. a.	n. a.	n. a.
Lewis Kontrolle NL ♀ 3	35	30	33	12	10	10
Lewis Kontrolle NL ♂ 1	45	30	40	11	12	10
Lewis Kontrolle NL ♂ 2	30	31	25	11	14	9
Lewis Kontrolle NL ♂ 3	45	50	48	15	10	11
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 1	30	25	25	7	9	10
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 2	26	20	35	n. a.	n. a.	n. a.
BDV Lew Carrier NBAE ♀ 5	30	27	28	10	9	9
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 1	25	35	33	9	11	12
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 2	30	23	20	11	8	12
BDV Lew Carrier NBAE ♂ 3	30	29	25	n. a.	n. a.	n. a.
14 NBAE 1	24	28	25	10	7	10
off VIII NBAE	20	19	25	6	8	9
19 Monate						
12 NBAE 1	28	21	23	13	9	7
12 NBAE 2	25	30	32	10	11	9
13 NBAE 7	28	20	35	9	14	8
13 NBAE 8	20	25	28	9	6	8
21 bis 26 Monate						
Lewis 53	45	38	40	15	9	15
Lewis 61	39	40	40	20	15	11
Lewis 65	30	30	32	14	10	9
11 NBAE 8	20	25	23	8	11	7
IX NBAE 4	25	18	25	9	5	5
18 NBAE 1	30	25	28	9	7	10
18 NBAE 2	35	35	36	10	10	8
18 NBAE 5	25	20	22	9	6	9
18 NBAE 6	23	20	25	8	5	9
18 NBAE 8	20	24	19	9	10	8

Angaben in absoluten Zahlen; verblindete Auszählung; BDV = Borna-Disease-Virus; Cc = Corpus callosum; KHM = Kleinhirnmarg; m/♂ = männlich; n. a. = nicht auswertbar; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen

Tabelle 9-6: Auszählung der Mikroglia

Lokalisation	K	K	K	Hc	Hc	Hc	KHM	KHM	KHM
Gesichtsfeld	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tier									
4 bis 6 Wochen									
Lewis NL-4	8	4	7	6	7	8	11	9	8
BDV neg 4Wo	8	7	9	5	7	6	8	9	8
6. NL Lewis	7	10	9	7	7	5	10	8	11
4. NBAE T6	14	15	18	18	16	20	13	12	8
6. NBAE T7	13	20	14	18	22	14	12	17	15
19 NBAE.1	15	16	18	20	17	10	19	20	12
19 NBAE.2	14	12	8	16	20	17	16	10	15
19 NBAE.3	12	13	10	15	15	14	17	13	18
4 bis 6 Monate									
Lewis NL 1	6	5	7	5	8	6	10	7	9
Lewis NL 2	7	7	9	7	5	7	7	8	9
Lewis NL 3	5	6	8	8	6	9	9	7	7
Lewis NL 4	9	9	7	7	6	9	8	8	7
22. NL Lewis	8	5	8	9	9	8	9	7	9
I BDV NBAE 1 (Nr. 4)	11	14	18	16	14	12	15	14	12
I BDV NBAE 2 (Nr. 6)	12	9	14	14	12	13	9	14	16
I BDV NBAE 3 (Nr. 9)	14	15	11	15	12	17	13	11	10
I BDV NBAE (Nr. 11)	16	17	10	9	10	10	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 1 (Nr. 7)	9	10	13	14	13	17	n. a.	n. a.	n. a.
II BDV NBAE 2 (Nr. 10)	11	10	12	12	15	15	12	14	14
II BDV NBAE 3 (Nr. 13)	10	12	12	17	9	18	12	10	9
II BDV NBAE 4 (Nr. 14)	11	9	8	n. a.	n. a.	n. a.	14	9	13
III BDV NBAE 1 (Nr. 5)	7	11	14	10	15	9	10	10	13
III BDV NBAE 2 (Nr. 3)	15	16	11	10	11	13	13	16	10
III BDV NBAE 3 (Nr. 12)	12	10	16	11	9	15	9	9	12
IV BDV NBAE 1 (Nr. 1)	7	9	12	14	12	16	13	12	10
BDV NBAE 4 (Nr. 8)	12	16	11	14	15	18	n. a.	n. a.	n. a.

Tabelle 9-6: (Fortsetzung)

Lokalisation	K	K	K	Hc	Hc	Hc	KHM	KHM	KHM
Gesichtsfeld	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Tier									
12 bis 15 Monate									
Lewis Kontrolle NL ♀ 1	8	11	7	7	6	8	5	8	11
Lewis Kontrolle NL ♀ 2	8	10	8	12	6	9	8	6	7
Lewis Kontrolle NL ♀ 3	9	8	7	6	5	8	9	9	10
Lewis Kontrolle NL ♂ 1	7	9	7	7	7	10	7	9	6
Lewis Kontrolle NL ♂ 2	8	7	9	9	8	9	6	8	6
Lewis Kontrolle NL ♂ 3	7	9	6	5	6	6	6	5	8
BDV Low Carrier NBAE ♀ 1	19	12	16	13	15	13	12	14	12
BDV Low Carrier NBAE ♀ 2	13	18	10	12	9	11	n. a.	n. a.	n. a.
BDV Low Carrier NBAE ♀ 5	8	18	13	15	15	12	13	11	9
BDV Low Carrier NBAE ♂ 1	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	13	12	10
BDV Low Carrier NBAE ♂ 2	13	18	21	14	14	16	12	10	10
BDV Low Carrier NBAE ♂ 3	18	16	18	13	11	11	n. a.	n. a.	n. a.
14 NBAE 1	19	16	20	15	15	19	14	14	12
off VIII NBAE	18	17	12	21	17	20	10	11	11
19 Monate									
12 NBAE 1	20	21	14	15	20	16	18	16	19
12 NBAE 2	15	16	11	16	13	17	12	19	12
13 NBAE 7	9	9	15	10	12	10	14	13	13
13 NBAE 8	13	15	12	16	13	10	16	17	11
21 bis 26 Monate									
Lewis 53	6	6	7	6	7	5	5	8	8
Lewis 61	4	6	7	9	5	7	5	6	6
Lewis 65	9	8	6	5	8	5	6	8	9
11 NBAE 8	15	12	13	11	18	13	12	14	14
IX NBAE 4	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
18 NBAE 1	10	9	12	12	11	13	15	11	12
18 NBAE 2	13	14	14	14	12	10	16	16	15
18 NBAE 5	9	11	8	8	10	11	15	10	12
18 NBAE 6	10	14	10	6	8	11	9	12	11
18 NBAE 8	10	8	10	12	10	12	13	11	10

Angaben in absoluten Zahlen; verblindete Auszählung; BDV = Borna-Disease-Virus; Hc = Hippocampus (Bereich neben Ammonshorn); K = Kortex; KHM = Kleinhirnmark; m/♂ = männlich; n. a. = nicht auswertbar; NBAE = neonatal-Aerosol-infiziert; neg = negativ; NL = normal Lewis; T = Tier; w/♀ = weiblich; Wo = Wochen

Tabelle 9-7: Ungepaarter t-Test (gesunde Kontrollen versus BDV-infizierte Tiere)

Altersgruppe	4 bis 6 Wochen	4 bis 6 Monate	12 bis 15 Monate	21 bis 26 Monate
Tierzahl (gesund)	n = 3	n = 5	n = 6	n = 3
Tierzahl (BDV)	n = 5	n = 13	n = 8	n = 7
Zellpopulation/ Lokalisation	p-Wert			
Astrozyten				
Kortex	0,048	0,61	0,02	0,001
Hippocampus	0,0016	0,069	0,093	0,15
Kleinhirnmark	0,11	0,38	0,093	0,18
Oligodendrozyten				
Corpus callosum	0,078	<,0001	0,027	0,038
Kleinhirnmark	0,95	0,0026	0,026	0,047
Mikroglia				
Kortex	0,0025	<,0001	<,0001	0,0024
Hippocampus	<,0001	<,0001	0,0003	0,0012
Kleinhirnmark	0,0045	<,0001	<,0001	0,0005

Der t-Test erfolgte zur Evaluierung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen der gesunden Kontrollen und BDV-infizierten Ratten besteht. Es handelte sich um ungepaarte Stichproben, da in den zu vergleichenden Altersgruppen jeweils unterschiedliche Tiere untersucht wurden. Ein p-Wert von unter 0,05 gilt als signifikant und ein Signifikanzniveau von kleiner als 0,0001 ist hochsignifikant.

In den verschiedenen Altersgruppen und Lokalisationen ergaben sich hochsignifikante Unterschiede bei den einmonatigen Tieren in der hippocampalen Mikroglia-Zahl sowie in der Gruppe „4 bis 6 Monate“ in der Oligodendrozyten-Zahl im Corpus callosum, außerdem in der Mikroglia-Zahl im Kortex, Hippocampus und Kleinhirnmark. Hochsignifikante Unterschiede waren zusätzlich in der Mikroglia-Zahl im Kortex und Kleinhirnmark der einjährigen Ratten zu verzeichnen.

10. PUBLIKATION

Teile dieser Arbeit werden publiziert in:

Autoren: Karoline Krautz, Kira Gehrke, Michaela Schepers, Daniela Sollmann, Lothar Stitz, Thomas Bilzer

Titel: Impairment of neurofilament integrity and myelination in the brains of Lewis rats after neonatal aerosol infection with Borna disease virus.

Manuskript in Vorbereitung

11. ERKLÄRUNG

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

Karoline Krautz

12. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lothar Stitz, der mir durch die NBAE-Studie und das Bereitstellen des Materials meine Dissertation ermöglichte.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Thomas Bilzer für die lehrreichen und amüsanten Stunden mit viel Diskussionsstoff.

Ein großes Dankeschön geht ebenso an...

...meine Familie, besonders meine Eltern, ohne deren unentwegt liebevolle und finanzielle Unterstützung diese Arbeit wesentlich schwieriger gewesen wäre.

...meinen lieben Andi, der immer an mich glaubte und für mich da war, wenn die Nerven mal wieder sehr fragil waren.

...meine treuen Freunde, die für einen guten Ausgleich sorgten und teilweise „dissertationsbedingte“ Frustration und Motivation mit mir teilten. Besonders hervorheben möchte ich dabei Miri, Hannah und meine kleine Nina.

...meine liebe Freundin und ehemalige „Haus-Mitbewohnerin“ Neli für die Unterstützung bei statistischen und sonstigen Fragestellungen.

...meine ehemalige Kollegin Ali mit der ich im ersten Jahr eine schöne und sehr lehrreiche Zeit hatte.

...Herrn Dr. Hans-Jürgen Bidmon für das Bereitstellen von Antikörpern und hilfreichen Tipps.

...und natürlich an die Mitarbeiter des Labors, Christine, Daniela, Heike, Natali und Christoph, die mit viel Geduld meine zahlreichen, technischen Fragen beantworteten und stets ein offenes Ohr hatten.

ISBN 978-3-86345-239-1



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvf.de · Internet: www.dvf.de**