

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung und Geschichte	1
1.2	Ätiologie	3
1.3	Immunpathologie und Neuropathologie	5
1.4	Klinisches Bild der Bornaschen Krankheit	7
1.5	Diagnostische Verfahren	8
1.6	Pathogenese	9
1.7	Experimentelle Infektion von Großtieren	12
2	PROBLEMSTELLUNG	15
3	MATERIAL	16
3.1	Zelllinien	16
3.2	Bakterienstämme	16
3.3	Virusstämme	16
3.4	Nukleinsäuren	16
3.4.1	Plasmide	16
3.4.2	Oligonukleotide /Primer	16
3.4.3	Weitere Nukleinsäuren	17
3.5	Enzyme und Kits	17
3.5.1	Enzyme	17
3.5.2	Kits	17
3.6	Antikörper und Seren	17
3.7	Chemikalien	18
3.8	Lösungen und Puffer	18
3.9	Verbrauchsmaterial	21

INHALTSVERZEICHNIS

3.10	Geräte und Laborhilfsmittel	22
3.10.1	Zentrifugen	22
3.10.2	Weitere Geräte	22
4	METHODEN	23
4.1	Zelllinien, Virusstämme, Probenaufbereitung	23
4.1.1	Kultivierung von Zellen	23
4.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	23
4.1.3	Erstellung des Standardlaborvirus BDV 4p adult	24
4.1.4	Infektion und Kultivierung von CRL 1405 Zellen mit Gehirnhomogenat des Schafes 18/9	24
4.1.5	Erstellung des Sf 18/9 Isolats	25
4.1.6	Aufbereitung von Schafblut zur Isolierung von Lymphozyten	25
4.2	Virologische Methoden/ Virus Focus Forming Unit Assay	26
4.3	Biochemische Methoden/ SDS-PAGE/ Gel Elektrophorese	27
4.4	Immunologische Methoden/ Immunfluoreszenztest	29
4.5	Molekularbiologische Methoden	30
4.5.1	RNA Extraktion /RNA Extraktion aus Geweben/Zellen	30
4.5.2	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	32
4.5.3	cDNA Erststrangsynthese	32
4.5.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
4.5.5	Klonierung BDV-spezifischer Nukleinsäure	33
4.5.6	Minipräparation	33
4.5.7	Isolierung der Plasmide	34
4.5.8	Sequenzierreaktion	34
4.5.9	Reinigung der DNA	35
4.5.10	Sequenzanalyse	35
4.5.11	In situ Hybridisierung	35
4.6	Intracerebrale Infektion	37
4.6.1	Intracerebrale Infektion von Ratten	37
4.6.2	Intracerebrale Infektion von Schafen	37

INHALTSVERZEICHNIS

4.7	Beurteilung der klinischen Symptome	37
4.7.1	Beurteilung der klinischen Symptome der Ratte	38
4.7.2	Beurteilung der klinischen Symptome der Schafe	38
4.8	Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	38
5	ERGEBNISSE	40
5.1	Experimentelle Infektion von Schafen mit BD Virus	40
5.1.1	Experimentelle Infektion von Schafen mit BDV 4p adult (Experiment 1)	41
5.1.1.1	Symptomatik	42
5.1.1.2	Gewichtskontrolle	43
5.1.1.3	Temperaturkontrolle	45
5.1.1.4	Serologische Untersuchung	47
5.1.1.4.1	Western Blot	47
5.1.1.4.2	Immunfluoreszenz	48
5.1.1.4.3	RT-PCR	48
5.1.1.5	Untersuchung der Gehirnregionen	49
5.1.1.5.1	Western Blot	51
5.1.1.5.2	Virustitration	51
5.1.1.5.3	Molekularbiologische Untersuchung	51
5.1.1.5.3.1	RT-PCR	51
5.1.1.5.3.2	In situ Hybridisierung	52
5.1.1.5.4	Histologische Untersuchung	52
5.1.1.6.	Zusammenfassung	54
5.2	Untersuchungsdaten des natürlich BDV infizierten Schafes 18/9	54
5.3.	Kultivierung von CRL 1405 Zellen mit Gehirnhomogenat aus dem Hippocampus des Schafes 18/9	55
5.3.1	Kontrolle der Infektion	57
5.3.2	Virustitration und Antigennachweis in Sf 18/9 infizierten Zellkulturen	58
5.3.3	Zusammenfassung	58

INHALTSVERZEICHNIS

5.4	Experimentelle Infektion von Schafen mit Sf 18/9 Isolat (Experiment 2)	59
5.4.1	Symptomatik	59
5.4.2	Gewichtskontrolle	60
5.4.3	Temperaturkontrolle	60
5.4.4	Serologische Untersuchung	61
5.4.4.1	Western Blot	62
5.4.4.2	Immunfluoreszenz	62
5.4.4.3	RT-PCR	62
5.4.5	Histologische Untersuchung von Gehirnmateriale	63
5.4.6	Zusammenfassung	64
5.5	Infektion von 6 Wochen alten Lewis Ratten (Experiment 3)	65
5.5.1	Infektion von 6 Wochen alten Lewis Ratten mit BDV 4p adult	65
5.5.1.1	Symptomatik	66
5.5.1.2	Gewichtskontrolle	67
5.5.1.3	Serologische Untersuchung	68
5.5.1.3.1	Western Blot	68
5.5.1.4	Untersuchung des Gehirnmateriale	69
5.5.1.4.1	Western Blot	69
5.5.1.4.2	Virustitration	70
5.5.2	Infektion von 6 Wochen alten Lewis Ratten mit BDV CRL Virus	70
5.5.2.1	Symptomatik	71
5.5.2.2	Gewichtskontrolle	71
5.5.2.3	Serologische Untersuchung	72
5.5.2.4	Untersuchung des Gehirnmateriale	72
5.5.3	Zusammenfassung	72
5.5.4	Infektion von 6 Wochen alten Lewis Ratten mit Sf 18/9 Isolat (Charge I)	72
5.5.4.1	Symptomatik	73

INHALTSVERZEICHNIS

5.5.4.2	Gewichtskontrolle	77
5.5.4.3	Serologische Untersuchung	79
5.5.4.3.1	Western Blot	79
5.5.4.3.2	RT-PCR	81
5.5.4.4	Untersuchung des Gehirnmaterials	82
5.5.4.4.1	Western Blot	82
5.5.4.4.2	Virustitration	83
5.5.5	Zusammenfassung	85
5.5.6	Infektion von 6 Wochen alten Lewis Ratten mit Sf 18/9	
	Isolat der Charge II und III	86
5.5.6.1	Symptomatik	86
5.5.6.2	Gewichtskontrolle	87
5.5.6.3	Serumuntersuchung	87
5.5.6.4	Untersuchung des Gehirnmaterials	88
5.5.6.5	Zusammenfassung	88
5.5.7	Histologische und immunhistochemische Untersuchung des Gehirnmaterials der Gruppen D-H	89
5.5.7.1	Zusammenfassung	91
5.5.8	Zusammenfassung	91
5.6	Molekularbiologische Charakterisierung des Sf 18/9 Isolats	93
5.6.1	Amplifikation von Teilabschnitten des Sf 18/9 Isolats	93
5.6.2	Klonierung der Amplifikate	93
5.6.3	Strukturelle Analyse des Sf 18/9 Isolats	94
5.6.4	Sequenzvergleich Sf 18/9 Isolat zu HE/80 und Stamm V	94
5.6.4.1	Austausch auf Nukleotidbasis und Aminosäurenbasis	94
5.6.5	Zusammenfassung	95
6	ANHANG	96
7	DISKUSSION	99
8	ZUSAMMENFASSUNG	119

INHALTSVERZEICHNIS

9	SUMMARY	121
10	LITERATURVERZEICHNIS	123