

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Herpesviren als Krankheitserreger bei Tieren	2
2.2 Das Pseudorabiesvirus (PrV).....	3
2.2.1 Morphologie.....	3
2.2.2 Replikationszyklus.....	5
2.2.3 PrV-Infektionen <i>in vivo</i>	9
2.3 Neuroanatomische Grundlagen der Neuroinvasion und Neurovirulenz.....	11
3 Material und Methoden.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Virusstämme	18
3.1.2 Zelllinien	19
3.1.3 Versuchstiere.....	20
3.1.4 Enzyme	20
3.1.5 Seren und Antiseren	20
3.1.6 Chemikalien, Kits und Arzneimittel	21
3.1.7 Geräte und Instrumente.....	23
3.1.8 Verbrauchsmaterial	23
3.1.9 Stammlösungen und Puffer.....	24
3.2 Methoden	32
3.2.1 In-vitro-Untersuchungen.....	32
3.2.1.1 Kultivierung von nichtneuronalen Zellen	32
3.2.1.2 Transfektion.....	32
3.2.1.3 Virusanzucht.....	33
3.2.1.4 Plaquetest	33
3.2.1.5 Kinetik	33
3.2.1.6 DNA-Isolierung.....	34
3.2.1.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	34
3.2.1.8 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	34
3.2.1.9 DNA-Agarosegelelektrophorese	34
3.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
3.2.1.11 Real-Time PCR zum Nachweis von PrV.....	35
3.2.1.12 Southern-Blot-Hybridisierung	36
3.2.1.13 Western Blot.....	37
3.2.2 Untersuchungen an primären Neuronenkulturen aus Rattenembryonen	38
3.2.2.1 Präparation des oberen Zervikalganglions aus Rattenembryonen	38
3.2.2.2 Vorbehandlung der Zellkulturgefäße.....	38
3.2.2.3 Anzucht im Drei-Kammer-Modell	39
3.2.2.4 Konfokale Zeitrafferaufnahmen	40
3.2.2.5 Messung des intraaxonalen Transportes.....	40
3.2.2.6 Immunfluoreszenztechniken.....	40
3.2.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	41
3.2.2.8 In-vivo-Untersuchungen	41
3.2.2.9 Versuchstiere	41
3.2.2.10 Intranasale Inokulation	42
3.2.2.11 Intradermale Inokulation („Flankenmodell“).....	42

3.2.2.12	Organentnahme und Fixierung	42
3.2.3	Histopathologische Untersuchungen	43
3.2.3.1	Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten	43
3.2.3.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE)	43
3.2.3.3	ABC-Methode	44
3.2.3.4	Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung	45
4	Ergebnisse.....	47
4.1	In-vivo-Untersuchungen.....	47
4.1.1	Verlauf der AK in Schweinen nach experimenteller Infektion	47
4.1.2	Bestimmung der mittleren Überlebenszeit in Mäusen nach PrV-Infektion	50
4.1.3	Intradermale Inokulation von PrV-Kaplan.....	52
4.1.4	Intranasale Inokulation von PrV-Kaplan.....	54
4.1.5	In-vivo-Charakterisierung von PrV-ΔUL3.5-Mutanten	55
4.1.5.1	Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV-ΔUL3.5F	55
4.1.5.2	Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV-ΔUL3.5/48	56
4.1.6	In-vivo-Charakterisierung von UL35-Mutanten	57
4.1.6.1	Intranasale Inokulation von PrV-ΔUL35	57
4.1.6.2	Intranasale Inokulation von PrV-UL35GFP	58
4.1.6.3	Intranasale Inokulation von PrV-ΔUL35Resc	58
4.1.7	In-vivo-Charakterisierung von UL36-Mutanten	59
4.1.7.1	Intranasale Inokulation von PrV-ΔUL36F	59
4.1.7.2	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ2087-2795	59
4.1.7.3	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ22-248	59
4.1.7.4	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ748-991 und PrV-UL36Δ2087-2981	60
4.1.7.5	Intranasale Inokulation von PrV-UL36Δ22-248Δ2087-2981	60
4.1.7.6	Intranasale Inokulation von PrV-UL36(C ₂₆ S)	60
4.1.7.7	Intranasale Inokulation von PrV-UL36(C ₂₆ S)R	62
4.1.7.8	In-vivo-Charakterisierung von PrV-ΔUL21/US3	63
4.2	In-vitro-Untersuchungen	66
4.2.1	Herstellung und In-vitro-Charakterisierung von PrV-ΔUL21/US3/UL35mCherry	66
4.2.2	Untersuchung des intraaxonalen Transportes mit konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie	68
4.2.2.1	Untersuchungen zum retrograden intraaxonalen Transport	70
4.2.2.1.1	PrV-Kaplan	71
4.2.2.1.2	PrV-Bartha	72
4.2.2.1.3	PrV-ΔUS9	73
4.2.2.1.4	PrV-ΔUL11	73
4.2.2.1.5	PrV-ΔUL11/US9	73
4.2.2.1.6	PrV-ΔgE	74
4.2.2.1.7	PrV-ΔUL48	74
4.2.2.1.8	PrV-ΔUL21/US3	74
4.2.2.1.9	PrV-ΔUL37	74
4.2.2.1.10	PrV-UL36(C ₂₆ S)	74
4.2.2.2	Untersuchungen zum anterograden Transport	75
4.2.2.2.1	PrV-Kaplan	76
4.2.2.2.2	PrV-Bartha	77
4.2.2.2.3	PrV-ΔUS9	78
4.2.2.2.4	PrV-ΔUL11	78
4.2.2.2.5	PrV-ΔUL11/US9	78
4.2.2.2.6	PrV-ΔgE	79
4.2.2.2.7	PrV-ΔUL48	79
4.2.2.2.8	PrV-ΔUL21/US3	79
4.2.2.2.9	PrV-ΔUL37	79
4.2.2.2.10	PrV-UL36(C ₂₆ S)	80
4.2.3	Untersuchung des neuronalen Transportes mittels Elektronenmikroskopie	80
4.2.3.1	Transport nach Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit PrV-Kaplan	81
4.2.3.2	Transport nach Infektion primärer muriner Neuronenkulturen mit PrV-gB	82

5	Diskussion	84
6	Zusammenfassung	100
7	Literaturverzeichnis	104
8	Anhang.....	122
8.1	Abkürzungen.....	122