

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-Agarosegel-Elektrophorese	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 Transports	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- Δ UL3.5-Mutanten	55
4.1.5.1	Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV- Δ UL3.5F	55
4.1.5.2	Intranasale Inokulation in Mäusen von PrV- Δ UL3.5/48	56
4.1.6	In-vivo-Charakterisierung von UL35-Mutanten	57
4.1.6.1	Intranasale Inokulation von PrV- Δ UL35.....	57
4.1.6.2	Intranasale Inokulation von PrV-UL35GFP	58
4.1.6.3	Intranasale Inokulation von PrV- Δ UL35Resc	58
4.1.7	In-vivo-Charakterisierung von UL36-Mutanten	59
4.1.7.1	Intranasale Inokulation von PrV-AUL36F	59
4.1.7.2	Intranasale Inokulation von PrV-UL36 Δ 2087-2795	59
4.1.7.3	Intranasale Inokulation von PrV-UL36A22-248	59
4.1.7.4	Intranasale Inokulation von PrV-UL36 Δ 748-991 und PrV-UL36 Δ 2087-2981	60
4.1.7.5	Intranasale Inokulation von PrV-UL36A22-248 Δ 2087-2981	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- Δ UL21/US3	63
4.2	In-vitro-Untersuchungen	66
4.2.1	Herstellung und In-vitro-Charakterisierung von PrV- Δ UL21/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- Δ U99	73
4.2.2.1.4	PrV- Δ UL11	73
4.2.2.1.5	PrV- Δ UL11/US9	73
4.2.2.1.6	PrV- Δ gE	74
4.2.2.1.7	PrV- Δ UL48	74
4.2.2.1.8	PrV- Δ UL21/US3	74
4.2.2.1.9	PrV- Δ UL37	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- Δ U99	78
4.2.2.2.4	PrV- Δ UL11	78
4.2.2.2.5	PrV- Δ UL11/US9	78
4.2.2.2.6	PrV- Δ gE	79
4.2.2.2.7	PrV- Δ UL48	79
4.2.2.2.8	PrV- Δ UL21/US3	79
4.2.2.2.9	PrV- Δ UL37	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