

Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien
Universität Berlin und aus dem Robert Koch Institut Berlin

**Untersuchungen von Antikörpern gegen Protein p16
(Matrixprotein) bei verschiedenen natürlich infizierten
Spezies mit Bornaviruskrankheit**

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

CARLOS RODRÍGUEZ CHONG

Tierarzt aus Camagüey, Kuba

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3371

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Hanns Ludwig
Zweiter Gutachter: PD Dr. Liv Bode
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Klaus Osterrieder

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

borna disease virus, horses, sheep, man, antibodies, matrix proteins, elisa,
immunodiagnosis, reverse transcriptase polymerase chain reaction (MeSH)

Tag der Promotion: 11.06.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-855-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

... para Luna y Lara

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Historisches	6
1.2 Molekulare Charakterisierung des Borna Disease Virus.....	8
1.2.1 Genom des Borna Disease Virus	8
1.2.2 Die Proteine des Bornavirus	9
1.3 Epidemiologie des BDV	12
1.4 Die Diagnose der BDV Infektion	14
2 Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Enzyme und Plasmide	21
2.1.4 Eukaryotische Zelllinien.....	21
2.1.5 Prokaryotische Zelllinien.....	22
2.1.6 Virusstämme.....	22
2.1.7 Antikörper, Seren und Antigene.....	22
2.1.8 Puffer, Medien, Gefäße und Zusätze für die Zellkultur	23
2.1.9 Geräte	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten.....	24
2.2.1.1 Medien und Puffer	24
2.2.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	25
2.2.1.3 RNA-Extraktion aus Kulturzellen	25
2.2.1.4 Quantifizierungen von RNA-Proben.....	27
2.2.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	27
2.2.2.1 Primer enthalten Schnittstellen für Restriktionsenzyme	28
2.2.2.2 PCR-cDNA-Produkt-Aufreinigung.....	28
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
2.2.4 DNA-Agarosegelelektrophorese	31
2.2.5 DNA-Sequenzierung	32
2.2.6 Klonierung und Transformation	32
2.2.6.1 Ligation des p16- Genfragment in den pGEM- T- Vektor.....	32
2.2.6.2 Transformationen des ligierten pGEM- T- Vektors in JM109-Zellen ...	34
2.2.6.3 Blau- Weiß- Selektion	34
2.2.6.4 Restriktionsverdau von pGEM mit BamH I und Xho I.....	35
2.2.6.5 Restriktionsverdau von pGEX-6P-2 mit BamH I und Xho I.....	36
2.2.6.6 Ligation des p16- Genfragments in pGEX- 6P-2	36
2.2.6.7 Transformation des ligierten pGEX- Vektors in kompetente Zellen	36
2.2.7 Screening-PCR	37
2.2.8 Sequenzierungs- PCR.....	38
2.2.9 Induktion der Expression.....	39
2.2.9.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	39
2.2.10 Dialyse.....	41
2.2.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry	41
2.2.12.1 SDS-PAGE	42
2.2.12.2 Coomassie-Färbung.....	43
2.2.12.3 Silberfärbungen eines SDS-Gels	44
2.2.12.4 Ponceau-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran.....	45

2.2.13 ELISA (Enzym-gestützer Immunbindungstest, Enzyme-linked Immuno-Sorbent Assay).....	47
2.2.13.1 Bestimmungen der Antigenkonzentration und des Kopplungspuffes für einen indirekten ELISA	48
2.2.13.2 Probandenserum.....	48
2.2.13.2.1 Tierserum	48
2.2.13.2.2 Humanserum	49
2.2.13.3 Optimale Serumverdünnungen	49
2.2.13.4 Kreuzreaktionen gegen mögliche Kontaminanten	50
2.2.14 Indirekte ELISA zum Detektion von Antikörpern in Serum verschiedener Spezies.....	50
2.2.15 Western Blot.....	52
2.2.16 N-terminale Aminosäure-Bestimmung (Edman-Abbau)	52
3 Ergebnisse	54
3.1 Isolierung des für das M-Protein kodierenden Gens mittels RT-PCR	54
3.1.1 Ermittlung der Identität des RT-PCR-Amplifikates mittels Sequenzierung ..	55
3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung des M-Proteins mit einem prokaryotischen Expressionssystem.....	56
3.2.1 Expression vom Matrixprotein des Stamms Eq. A24 mit dem GST-Gene-Fusion-System.	57
3.2.1.1 Reinigung rekombinanter Fusionsproteine.....	57
3.2.1.2 N-terminale Aminosäure-Bestimmung des recM-Fusionsproteins (Edman-Abbau)	60
3.3 Antikörpernachweis im indirekten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (indirekte ELISA).....	61
3.3.1 Optimale Antigenkonzentration und Kopplungspuffer.....	62
3.3.2 Bestimmung des „Cut-off“-Wertes des indirekten ELISAs	63
3.3.3 Kreuzreaktionen.....	64
3.3.4 Beschreibung der Serumproben.....	64
3.3.5 Indirekte ELISA- Auswertung	65
3.4 Bestätigung von Serumproben (Pferde, Human, Katzen) auf Antikörper gegen Bornaviruskrankheit mittels Western Blot-Analyse.....	66
4 Diskussion.....	69
4.1 Darstellung des rekombinanten Proteins und dessen Überexpression	70
4.2 Reinigung, Charakterisierung und Identifikation	71
4.3 Aufbau und Einsatz eines spezifischen und sensitiven ELISA-Systems	71
5 Zusammenfassung	76
6 Summary	77
7 Präsentationen	78
8 Literatur	79

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BDV	<i>Borna Disease Virus</i>
BK	Borna Krankheit
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
C	Cytosin
ca.	circa
CIC	Zirkulierende Immunkomplexe
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
<i>Cut off</i>	Schwellenwert
°C	Grad Celsius
ddNTPs	Dideoxy nucleoside triphosphates
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DMEM	Dulbecco's „ <i>minimal essential medium</i> “
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECLIA	„ <i>electrochemiluminescenci immunoassay</i> “
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	„ <i>enzyme immunoassay</i> “
ELISA	„ <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> “
Fc	kristallinen Fragment
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Einheit der Zentrifugalbeschleunigung

G	Guanin
gp	Glykoprotein
GST	Glutathion S-Transferase
h	„hour“
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IFA	„Immunofluoreszenz analyse“
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopiranosid
IU	„international units“
Kb	Kilobasenpaare
KBR	Komplementbindungsreaktion
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	„multiple cloning site“
mg	milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationsignal
nm	Nanometer
NNS	Nichtsegmentiertes Negativstrang
NSV	negativstrangorientierung Viren
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminoterminus
OD _x	optische Dichte bei „x“ nm
OL	oligodendroglia
ORF _s	„open reading frames“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMCs	peripheren mononuklären Blutzellen
PBS	„phosphate buffered saline“
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

rec	rekombinant
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	„rotation per minute“
s	Sekunde
S	Transkriptionsstarts
SD	“ <i>Staggering Disease</i> ”
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ss	Einzelstrang
T	Thymin
T _A	Annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBS	“ <i>Tris Buffered Saline</i> ”
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
tRNA	“ <i>transfer</i> ” Ribonukleinsäure
TTP	Thymintriphosphat
TUW	equine Trachea-Zellen
U	Uridin
UV	ultraviolett
V	Volt
WB	“ <i>Western Blot</i> ”
x	mal
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1 Historisches

Die ältesten Aufzeichnungen, die Bezug zur Borna-Krankheit (BK) haben könnten sind auf das Jahr 1660 datiert (Galiberti, 1660) und berichten von typischen Symptomen, die heute als Krankheitsbild der Bornaschen Krankheit bekannt sind. Allerdings sind in der alten Literatur nur die schlimmsten und tödlich ausgehenden Fälle beschrieben. Man ging von einer hohen Mortalitätsrate von 80-90% aus. Die BK wurde nach Trichtern (1716) als Schläfrigkeit, Melancholie und auch als Erregung beschrieben. Am Anfang des 19. Jahrhunderts folgen dann weitere Beschreibungen, welche die Bornasche Krankheit als *hitzige Kopfkrankheit der Pferde* (Autenrieth, 1813, zitiert nach Zwick, 1939), *subakute Meningitis* (Dinter, 1879) und *Schlafsucht der Pferde* (Winkler, 1883) beschrieben. Ihren Name erhielt diese Krankheit aufgrund ihres seuchenähnlichen Auftretens in der Amtshauptstadt Borna, nahe der Stadt Leipzig. Um 1900 wurden dort beträchtliche Verluste bei Pferdervorkommen in Militär und Landwirtschaft beobachtet.

Die Ätiologie der BK war bis Anfang des 20. Jahrhunderts unklar. 1909 entdeckten Ernst Joest und Kurt Degen intranukleäre Einschlußkörperchen in den Ganglienzellen des Ammonshorns (Joest & Degen, 1909). Mit diesen neuen Erkenntnissen war es erstmals möglich, die Diagnose der Bornaschen Erkrankung *post mortem* zu stellen. Hinweise auf die Virusätiologie der Erkrankung ergaben sich erstmals durch die Übertragung bakterienfreier Gehirnhomogenate eines an BK erkrankten Pferdes auf ein Kaninchen und die erfolgreiche Rückübertragung auf ein Pferd (Zwick & Seifried, 1925). Einen weiteren Fortschritt erfuhr die Diagnose der Krankheit durch die Entdeckung eines komplementbindenden Antigens und die damit verbundene Ausarbeitung einer Komplementbindungsreaktion zum Antigen und Antikörpernachweis (Sprockhoff, 1954). Erst mit der Einführung des indirekten Immunfluoreszenzanalyse (IFA) wurde ein aussagekräftiges diagnostisches Verfahren (Wagner et al., 1968) geschaffen. In immunaffinitätschromatographisch gereinigten Zellextrakten konnten erstmalig partikelähnliche Strukturen nachgewiesen werden (Ludwig & Becht, 1977). Durch Filtrationsstudien und später durch elektronenmikroskopische Messungen wurde eine Größe der BDV-Virionen von 85-125 nm angegeben (Elford & Galloway, 1933; Compans et al., 1994; Zimmermann et al., 1994).

Das Virus lässt sich *in vitro* kultivieren und vermehren, was für experimentelle Studien von großer Bedeutung ist (Ludwig et al., 1973). Das Borna-Virus ist ein neurotropes Virus. Es repliziert sich präferentiell im Zentralnervensystem (ZNS). Bornavirus-spezifisches Antigen lässt sich in den Kernen und im Zytoplasma infizierter Neuronen, Astrozyten, Oligodendroglia, Schwannschen und Ependym-Zellen detektieren (Roggendorf et al., 1983; Ludwig et al., 1988; Gosztonyi et al., 1994). Die experimentelle Infektion konnte durch intracerebrale oder intranasale Inokulation auf eine Vielzahl von Tiergruppen übertragen werden, die von Kaninchen (Krey et al., 1979), Hamstern (Anzil et al., 1973), Hühnern (Ludwig et al., 1973), Meerschweinchen (Zwick & Seifried, 1925) bis zu Rhesusaffen (Stitz et al., 1980) reicht.

Das Borna Disease Virus (BDV) gehört als nicht-segmentiertes Negativstrang (NNS) RNA-Virus der Ordnung *Mononegavirales* an. Allerdings stellt BDV den einzigen Vertreter dieser Ordnung dar, dessen Replikation und Transkription im Nukleus der infizierten Wirtszelle lokalisiert ist (Briese et al., 1992). Diese besonderen Eigenschaften der NNS-RNA-Viren waren bisher nur von Pflanzenviren bekannt. Daher entschied man sich das tierpathogene Borna Virus einer neuen Familie zuzuordnen. Das Borna Disease Virus repräsentiert bis heute den Prototyp der Familie *Bornaviridae* (de la Torre, 1994; de la Torre et al., 2000). Neuerdings sind Geflügel Bornaviren entdeckt worden, die vermutlich einem weiteren Genus angehören (Kistler et al., 2008)

Bornavirus ist nicht zytolytisch (Ludwig et al., 1973; de la Torre et al., 2000; Ikuta et al., 2002). Das BDV infiziert Pferde, Schafe, Rinder, Vögel sowie Katzen und vermutlich auch Hunde (Ludwig & Bode, 2000). Die Infektion ist persistent und durch Sinnes- und Verhaltensstörungen gekennzeichnet, die mit einer nicht-eitrigen Meningoenzephalitis einhergehen können (Bode et al., 1996). Das Auftreten schien zunächst nur auf Europa beschränkt, jedoch kann heute von einer weltweiten Verbreitung gesprochen werden, wobei bei serologischen Untersuchungen auch Kaninchen, Ratten, Meerschweinchen, Mäuse und Rhesusaffen positiv getestet wurden (Ludwig et al., 1988; Ludwig & Bode, 2000). Studien zufolge kann das Wirtsspektrum des BDV alle Warmblüter (auch den Menschen) umfassen (Bode & Ludwig, 1997; Bode & Ludwig, 2000; Chalmers et al., 2005). Der Erreger ist durch seinen Neurotropismus, die niedrige Replikationsrate und seine Persistenz im zentralen Nervensystem charakterisiert (Gosztonyi & Ludwig, 1995; Gies et al., 1998). Erst 1990

gelang es schließlich der Arbeitsgruppe um Ian Lipkin mit der Isolation der ersten cDNA-Klone, ein RNA-Virus als ursächlichen Erreger der Bornaschen Erkrankung zu identifizieren (Lipkin et al., 1990).

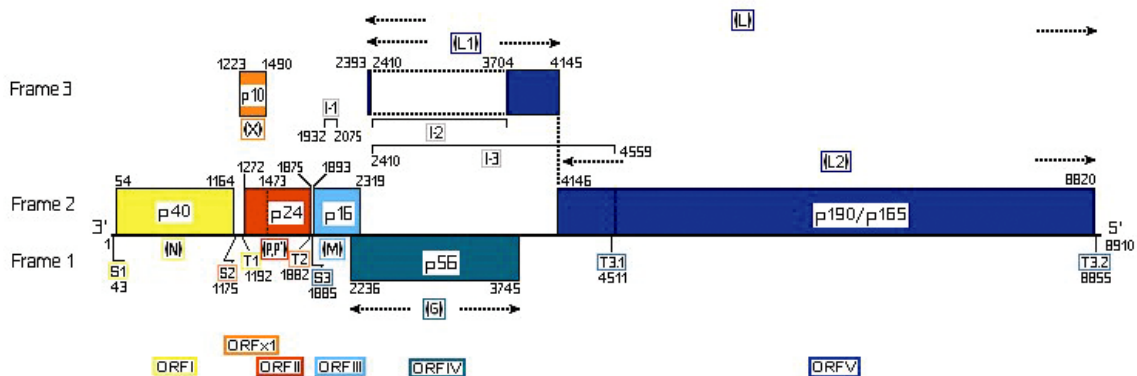
1.2 Molekulare Charakterisierung des Borna Disease Virus

1.2.1 Genom des Borna Disease Virus

Die Struktur des Genoms ist von negativer Polarität, nicht segmentiert und besteht aus Einzelstrang(ss)-RNA mit einer Größe von 8,9 Kilobasen (Lipkin et al., 1990; Cubitt et al., 1994a; Briese et al., 1994). BDV ist ein sphärisches, behülltes Virus mit einer Größe von 85 bis 125 nm, welches durch Knospung von der Zelloberfläche freigesetzt wird (Zimmermann et al., 1994; Ludwig & Bode, 1997; Kohno et al., 1999). Das BDV wird deshalb wie die *Filoviridae*, *Paramyxoviridae* und *Rhabdoviridae* zur Ordnung der *Mononegavirales* gezählt. Innerhalb dieser Ordnung stellt das Virus den einzigen Vertreter der neu definierten Familie der *Bornaviridae* dar (Schneemann et al., 1995). Im Gegensatz zu den anderen Vertretern der Ordnung der *Mononegavirales* repliziert und transkribiert das BDV im Zellkern (Briese et al., 1992; Cubitt & de la Torre, 1994) und benutzt den Spleißapparat der Wirtszelle zur Modifikation eines Teils seiner Transkripte (Cubitt et al., 1994b; Schneider et al., 1994).

Das Genom trägt 8910 Basenpaare (bp) und kodiert sechs teilweise überlappende, offene Leserahmen (ORFs, *open reading frames*). ORF I kodiert für das 370 Aminosäuren (aa) lange N-Nukleoprotein (p40), welches in zwei unterschiedlichen Größen (38 kDa/40 kDa) gebildet wird (Briese et al., 1994). Der zweite offene Leserahmen (ORF II) kodiert für das 201 aa lange P-Phosphoprotein (p24) mit einem Molekulargewicht von 24 kDa (Thierer et al., 1992; Kobayashi et al., 2000). Die N und P-Proteine sind die am stärksten exprimierten BDV-Proteine. Das M-Matrixprotein (p16) mit einer Länge von 142 aa und einem Molekulargewicht von 16 kDa wird vom dritten offenen Leserahmen (ORF III) kodiert (Schädler et al., 1985; Stoyloff et al., 1994; Kliche et al., 1994; Kraus et al., 2005). ORF IV kodiert für das 503 aa lange (94 kDa) G-Glykoprotein (p56) (Gonzalez-Dunia et al., 1997). Die mehr als 1700 aa lange RNA-abhängige L-Polymerase (p190) wird von ORF V kodiert und stellt mit einem Molekulargewicht von 190 kDa das größte Virusprotein dar, welches allerdings noch

als ein verkürztes Produkt von 165 kDa expremiert wird (Walker et al., 2000). Der offene Leserahmen sechs (ORF VI) kodiert für das 87 aa lange X-Protein (p10) mit einem Molekulargewicht von 10 kDa (Schneider et al., 2003). Die RNA-Transkripte, von denen sechs Proteine translatiert werden, werden an drei Transkriptionsstarts (S1-S3) initiiert und an vier Terminationsenden gestoppt (Schneemann et al., 1994; Schwemmler et al., 1999).



Genomische Organisation des Borna Disease Virus. Gelb: ORF I (p40), rot: ORF II (p24), türkis: ORF III (p16), violett: ORF IV (p56), blau: ORF V (p190/p165), braun: ORF X (p10). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Stoyloff.

Das Genom des BDV ist hoch konserviert. Sequenzvergleiche von Virusisolaten aus Pferden ergaben eine Homologie von 95% (Schneider et al., 1994; de la Torre et al., 2000). Bei den menschlichen Isolaten liegen die Sequenzdivergenzen bei nur 3-4 % (Bode et al., 1996; de la Torre et al., 1996; Nakamura et al., 2000).

1.2.2 Die Proteine des Bornavirus

Der ORF I kodiert für das Nucleoprotein (N-Protein, p40). Mit 370 Aminosäuren hat das Protein eine Masse von 40 kDa, kann aber auch in einer 38 kDa-Isoform vorkommen (Pyper & Gartner., 1997). Die Bedeutung dieser Isoform bleibt noch unklar. Bekannt ist nur, dass ihr im Unterschied zu der p40-Isoform das monopartite Kernlokalisierungssignal (NLS); PKRRLVDDA, fehlt. Jedoch fand man die p38-Isoform des Proteins auch im Kern infizierter Zellen, was darauf hindeutet, dass es noch andere Mechanismen gibt, mit denen dieses Protein in den Zellkern transportiert wird (Ikuta et al., 2002). Interaktionen mit anderen viralen Proteinen sind wahrscheinlich. Das N-Protein ist wichtiger Bestandteil des Ribonucleoprotein (RNP) (Kobayashi et al., 1998;

Kobayashi et al., 2001), der aus RNA, N- und P-Protein besteht. Das N-Protein ist Bestandteil des bei Antigenämiephasen messbaren Immunkomplexes im Blut des infizierten Wirts (Bode et al., 2001).

Der ORF II kodiert für das Phosphoprotein (P-Protein, p24) mit einem Molekulargewicht von 24 kDa. In Analogie zu anderen unsegmentierten, einzelsträngigen RNA-Viren negativer Polarität (NNS-RNA-Viren) nimmt dieses Protein wahrscheinlich die Funktion eines Transkriptionsfaktors wahr (Schwemmler et al., 1998). Das P-Protein kann mit sich selbst über eine Disulfidbrücke kovalent zu einem Dimer koppeln, als auch mit den Proteinen N und X über Wechselwirkungen interagieren und somit im Zellkern einer infizierten Zelle aggregieren (Kliche et al., 1996). Es wird aufgrund seines NLS zusammen mit den gebundenen viralen Proteinen in den Zellkern transportiert. Durch die Nutzung eines weiteren Leserahmens, der mit dem ORF II überlappenden ORF x1, wird die genetische Information für ein Virusprotein (X-Protein, p10) mit einem Molekulargewicht von 10 kDa abgelesen. Das X-Protein gelangt in Bindung an N- und P-Proteinen in den Nukleus und fungiert vermutlich als Kofaktor für die virale Polymerase. Das P-Protein beinhaltet in seiner Aminosäuresequenz acht kontinuierliche Epitope und am aminoterminalen Ende noch ein diskontinuierliches. Diese reagieren auch mit monospezifischen und monoklonalen Antikörpern, die gegen das Nukleoprotein N gerichtet sind (Kliche et al., 1996). Eine derartige Reaktion erklärt die Kreuzreaktivität, die zwischen den auf Aminosäureebene nicht verwandten Proteinen N und P zu beobachten ist (Thiedemann et al., 1992). Das P-Protein ist vermutlich als N/P-Heterodimer Bestandteil der für die Diagnostik bedeutsamen Immunkomplexe im Blut. Weitere molekularbiologische Details sind bei Lipkin & Briese (2006) beschrieben.

Matrixproteine von RNS-Viren mit Negativstrangorientierung (NSV) sind für den Viruseintritt, Zusammenbau und die Freisetzung aus der Zelle kritisch. Zusätzlich zu der Rolle bei knospenden Viren spielt das M-Protein eine aktive Rolle in der Virusreplikation, wie für die meisten NSVs gezeigt worden ist, einschließlich des Influenza-Virus, Vesicular Stomatitis Virus, Rabies Virus (RV), Respiratory Syncytial Virus (RSV), Masern-Virus, und anderen Viren (Solon et al., 2005).

Der ORF III kodiert für ein 16 kDa-Protein (M-Protein, p16) mit 142 Aminosäuren und eine Länge von 426 bp. Anhand massenspektrometrischer Untersuchungen mittels MALDI-TOF wurde gezeigt, dass das M-Protein sich zu Tetrameren der Größe 68 kDa zusammenlagern kann. Es enthält zwei stark hydrophobe Motive in der Aminosäuresequenz, mit denen es in der Virushülle membranständig ist (Stoyloff et al., 1997). Das M-Protein ist womöglich an der Innenseite des Nukleokapsids lokalisiert und interagiert dort möglicherweise mit dem Glykoprotein. In Anlehnung an die Organisation verwandter NNS-RNA-Viren wird seine Funktion als Matrixprotein (M) diskutiert. Gegen das M-Protein gerichtete Antikörper haben eine neutralisierende Wirkung (Hatalski et al., 1995). Demnach scheint M auf der Oberfläche der Virushülle vorzukommen. Andererseits kann diese neutralisierende Aktivität auch direkt gegen den mit BDV-M-assoziierten Ribonukleoprotein-Komplex gerichtet sein, der von Zelle zu Zelle übertragen wird (Pyper et al., 1998). *In-vitro*-Versuche zeigten, dass das M-Protein eine BDV-Infektion in einer Dosis-abhängigen Weise inhibiert (Stoyloff et al., 1997), wobei in Versuchen mit Anti-Kohlehydrat-Antisera demonstriert wurde, dass dabei die terminalen Kohlehydratreste des M-Proteins die entscheidende Rolle spielen (Stoyloff et al., 1998). Aufgrund jener Versuche wurde gefordert, dass es sich bei dem Protein um eine für die virale Adsorption essentielle Membrankomponente handeln müsste (Stoyloff et al., 1997).

Der folgende ORF IV kodiert für das Glykoprotein (G-Protein, p56) mit einer Länge von 1510 bp. Es hat 503 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 56 kDa. In infizierten Zellen kommen zwei glykosylierte Formen dieses Proteins mit Molekulargewichten von 94 kDa (gp94) und 43 kDa (gp43) vor, wobei das gp43 dem C-terminalen Teil des gp94 entspricht und wahrscheinlich nach proteolytischer Spaltung durch Furin entsteht (Richt et al., 1998). Untersuchungen zeigten, dass gp94 im endoplasmatischen Retikulum akkumuliert, während gp43 die Zelloberfläche erreicht (Gonzalez-Dunia et al., 1997). Das G-Protein induziert ebenfalls neutralisierende Antikörper und ist bedeutend für den Viruseintritt in die Zelle. So vermittelt gp94 die Virusanheftung an zelluläre Oberflächenrezeptoren, während gp43 beim Viruseintritt über pH-abhängige Endozytose eine wichtige Rolle spielt. Das G-Protein ist sowohl an der Adsorption an die Zellmembran als auch am Eintritt in die Zelle beteiligt (Perez et al., 2001).

Der ORF V enthält die genetische Information für ein Protein mit 1608 Aminosäuren und einem vorausgesagten Molekulargewicht von 190 kDa. Aufgrund der Größe seiner Nukleotidsequenz und der Nukleotidsequenzmotive gleicht dieser Genomabschnitt den Genen, die bei NNS-RNA-Viren für das „large protein“ (L) – die viruseigene *RNA-abhängigen RNA-Polymerase* – kodieren (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994). Das Gen ist Teil der dritten Transkriptionseinheit, wobei dessen Expression von einem alternativen Spleißvorgang abhängig ist (Walker et al., 2000). Dabei kommt es zur Fusion eines kleinen Sequenzabschnittes in 3'-Richtung und dem übrigen L-ORF, welcher mit dem ORF des G-Proteins überlappt (Ikuta et al., 2002). Zelluläre Proteinkinasen phosphorylieren die Polymerase und regulieren darüber deren Aktivität. Das L-Protein gelangt über die Bindung an P-Protein in den Zellkern (Walker et al., 2000).

Der kleinste ORF des BDV mit einer Länge von 267 bp kodiert das X-Protein. Dieses Protein, auch p10 genannt, wurde als sechstes virales Genprodukt identifiziert (Wehner et al., 1997). Seine Sequenz überlappt mit der des P-Proteins. Die Funktion dieses 10 kDa großen Proteins ist noch weitgehend unbekannt. In Minireplikon-Experimenten wurde p10 mittlerweile als negativer Regulator der viralen Polymerase identifiziert (Schneider et al., 2003). Der Import von p10 in den Zellkern könnte somit ein wichtiger Faktor für die Regulation der Polymerase sein. Außerdem wurde gezeigt, dass die Fähigkeit von p10 zur Interaktion mit P essentiell für dessen inhibitorische Funktion ist. Interaktionen mit den Proteinen N und P lassen vermuten, dass es im Kern infizierter Zellen lokalisiert ist (Schwemmler et al., 1998). Auch Interaktionen mit der L-Polymerase wurden beschrieben, die auf eine Rolle des X-Proteins als deren Kofaktor hindeuten könnten (Ikuta et al., 2002).

1.3 Epidemiologie des BDV

Die Bornasche Krankheit wird als eine nichteitrige Meningoenzephalomyelitis beschrieben, die in Deutschland, Österreich, der Schweiz, den Niederlanden und in anderen Ländern Europas auftritt (Lange et al., 1987; Caplazi et al., 1999; Herzog et al., 1994; Metzler et al., 1976, 1979b; Nowotny et al., 2000; Suchy et al., 1997; Weissenböck et al., 1998b). Außerdem sind BDV-spezifische Ak bei Pferden in Japan (Nakamura et al., 1995), Iran (Bahmani et al., 1996), Israel (Herzog et al., 1994; Richt

et al., 1994) und den USA (Kao et al., 1993) beschrieben worden. In den meisten Fällen wurden BDV-spezifische Ak in klinisch gesunden Tieren (Herzog et al., 1994; Richt et al., 1994) aber auch beim Menschen berichtet (Bode, 1995), so dass davon auszugehen ist, dass die natürliche Infektion bei Mensch und Tier meist subklinisch verläuft. Der oftmalige Nachweis BDV-spezifischer Antikörper in Seren von Humanpatienten deutet auf eine mögliche Rolle des BDV bei psychiatrischen Erkrankungen des Menschen hin (Bode, 1995). In mehreren Untersuchungen wurde BDV-spezifische RNA im Gehirn einzelner Patienten nachgewiesen (de la Torre et al., 1996; Nakamura et al., 2000), die unter Schizophrenie oder bipolaren Depressionen gelitten hatten. Über die Isolierung des BDV aus Monozyten solcher Patienten wurde berichtet (Bode et al., 1995; Bode et al., 1996). Nach heutigem Kenntnisstand kann man davon ausgehen, dass klinisch inapparente Infektionen häufig sind. Noch ist ungeklärt, ob diese bei Tier und Mensch unter bestimmten Bedingungen auch zur Auslösung einer deutlichen klinischen Symptomatik führen können (Bode et al., 2005).

Bis heute ist die genaue Transmission des Bornavirus unbekannt, scheint aber auch via Sekrete oder Aerosole möglich zu sein (Ludwig et al., 1988). Experimentelle Infektionen wurden bei Ratten, Mäusen, Kaninchen, Hamstern und Rhesusaffen durchgeführt. Nagetiere wurden als ein Kandidat für BDV-Reservoir vorgeschlagen, was allerdings unwahrscheinlich ist (Ludwig & Bode, 2000). BDV-RNA ist auch im Vogel-Exkrement berichtet worden, so dass man die Möglichkeit von Vogelreservoir in Betracht gezogen hat (Berg et al., 2001). Berichte über die Virusnukleinsäure der Bornakrankheit und Proteine aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) zeigen auch die Möglichkeit der hämatogenen Übertragung (Rubin et al., 1995). Die Infektion läuft entlang der Nervenbahnen ins limbische System des Gehirns, wo sich das Virus in bestimmten Neuronen festsetzt (Bilzer et al., 1996; Boucher et al., 1999). Die Infektion verläuft weiter intra-axonal zum peripheren Nervensystem und anderen Organen. Die Verbreitung des Virus erfolgt intra-axonal und transsynaptisch in anterograder oder retrograder Richtung. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass das BDV außer Neuronen auch Astrozyten, Oligodendroglia- und Schwannsche Zellen sowie weiße Blutzellen infizieren kann (Carbone et al., 1991; Gostonyi & Ludwig, 1995; Bode et al., 1995).

Die meisten Vertreter der Mononegavirales, wie auch das Bornavirus, sind Erreger bedeutender Tier- und Humankrankheiten (Bode, 1999). Auf Grund der großen Homologie von Bornavirus-Genomen wird angenommen, dass dieses Virus einen langen Evolutionsprozess durchlaufen hat, um sich langsam an verschiedene Spezies, wie an Pferde oder auch an den Menschen anzupassen (Ludwig & Bode, 2000).

Die klinischen Symptome treten nach einer Inkubationszeit von einigen Tagen bis Monaten auf und können mit Koliksymptomatik oder Enzephalitiden anderer Genese verwechselt werden. In Allgemeinen treten bei der Bornaviruskrankheit Krankheitsbildern auf, wie Verhaltensstörung (Depression, Exitation, Apathie) Bewegungsstörungen (Schwanken, Ataxie, Spasmen, Stolpern, Muskelzucken) und Beeinträchtigung der Sensibilität und des Sensoriums (Verlust des Schluckreflexes, Leerkauen, Speicheln) (Ludwig & Bode, 2000; Boucher et al., 1999). Die Krankheit kann im Allgemeinen von einer bis zu mehreren Wochen dauern. Die Mortalität wird verschieden hoch eingeschätzt und kann nach schwerem Krankheitsverlauf über 50% betragen (Ludwig et al., 1985; Ludwig & Bode, 2000). Bei 30% - 50% der unauffälligen Pferde sind Serumantikörper nachweisbar. Gelegentlich kann eine spontane Verbesserung der klinischen Symptomatik oder ein rekurrierender Verlauf der Erkrankung auftreten, trotz Persistenz des Virus im ZNS (Zwick, 1939; Grabner & Fischer, 1991).

Die Infektion des Menschen gab und gibt Anlass zu Diskussionen. Rott et al. fanden 1985 spezifische Antikörper gegen das BDV im Serum psychisch auffälliger Patienten, während diese bei gesunden Patienten fehlten. Bode et al., 1988 bestätigten diese Befunde und fanden auch bei gesunden Patienten spezifische Antikörper. Entsprechende Untersuchungsergebnisse wurden später von anderen Gruppen ebenfalls berichtet (Bode et al., 1995; Bechter et al., 1989; Rott et al., 1991; Bode et al., 1992; Sauder et al., 1996; Fu et al., 1993). Der Übertragungsweg von BDV ist bisher wenig aufgeklärt, wird allerdings neuerdings auch als die Ausbreitung über die Nervenbahnen ins limbische System des Gehirns diskutiert (Gosztonyi, 2008).

1.4 Die Diagnose der BDV Infektion

Untersuchungen der Bornaschen Krankheit von Pferden und Schafen in Mitteleuropa

zeigten, dass hohe Prozentsätze der Tiere Antikörper im Serum besaßen (Ludwig & Thein, 1977; Vahlenkamp et al., 2002). Die heutigen Möglichkeiten der molekularbiologischen Diagnostik erhärten das Konzept einer viralen Genese verschiedener neuropsychiatrischer Erkrankungen. Nach dem Nachweis von BDV-Infektionen beim Menschen erlangte die epidemiologische Erfassung von BDV-Infektionen bei natürlich infizierten Tieren und beim Menschen im Rahmen der Klärung der Übertragung, Ausbreitung und Verbreitung dieser Infektion eine besondere Bedeutung. Die Symptome der Bornaschen Krankheit sind sehr heterogen. Differentialdiagnostisch müssen auch andere Erreger beachtet werden. Deshalb kann die Diagnose der BK nicht allein anhand der klinischen Symptomatik gestellt werden, sondern Labormethoden müssen herangezogen werden, wie indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA), Komplementbindungsreaktion (KBR), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blot (WB), Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) und Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR). Eine zuverlässige *intra vitam*-Diagnostik der Bornavirus Krankheit ist nach wie vor schwierig. *Intra vitam*-Untersuchungen zur Absicherung von Verdachtsdiagnosen wurden mit der Untersuchung von Serum und Zerebrospinalflüssigkeit gemacht (Danner, 1976; Deuschle et al., 1998). Molekulare Methoden haben heute den Nachteil, dass sie teurer, kontaminationsanfälliger und nicht quantitativer sind als serologische Methoden, allerdings sind letztgenannte Methoden abhängig vom Infektionsstatus der Krankheit. RT-PCR Analyse ist eine empfindliche alternative Technik, die verwendet werden kann, um die klinische Diagnose einer Borna Krankheit zu bestätigen (Binz et al., 1994; Schneider et al., 1994; Zimmermann et al., 1994; Schüppel et al., 1995; Bilzer et al., 1996). Die Gefahren einer Kontamination ist hier jedoch besonders groß.

Die Sensitivität der bisher verfügbaren serologischen Methoden ist oft nicht ausreichend, weil die Antikörpertiter niedrig bleiben können, ja sogar unter die Nachweisgrenze sinken (Bode, 1995; Sauder et al., 2002). Ein negativer Antikörperbefund schließt also eine BDV-Infektion nicht aus. Die Serologie wurde am häufigsten zur *intra vitam*-Diagnostik verwertet. Die Untersuchungen zeigten ein weltweites Vorkommen BDV-reaktiver Ak bei Tier und Mensch (Ludwig et al., 1988; Bode, 1995; Sauder et al., 1996; Ouchi et al., 2001; Wensman et al., 2008; Patti et al., 2008).

Ein Durchbruch in der Diagnostik wurde mit der Entdeckung und Messung spezifischer Immunkomplexe (CIC) und Antigene im Plasma erzielt (Bode et al., 2001; Bode, 2008). Unter den derzeit verwendeten Methoden, diese CIC und Antigene zu entdecken, scheint der CIC-ELISA am zuverlässigsten zu sein (Dietrich & Bode, 2008). Der Prozentsatz verschiedener Tierarten und Menschen mit bestätigter Bornavirus Infektion, die positive Antikörper in serologischen Untersuchungen aufwiesen, variiert beträchtlich in verschiedenen Studien (Dürwald, 1993; Herzog et al., 1994; Bilzer et al., 1996; Caplazi & Ehrensperger, 1998). Während bei gesunden Menschen und Blutspendern 30% positiv auf BDV-spezifische CIC getestet wurden, waren in der gleichen Studie circa 2-3% positiv auf Antikörper durch Immunfluoreszenzanalyse (Bode & Ludwig, 2003). Ein Grund für diese ungleichförmigen Ergebnisse ist der gewöhnlich sehr niedrige BDV-spezifische Antikörpertiter im Serum (Metzler et al., 1979; Dürwald, 1993; Herzog et al., 1994; Bilzer et al., 1996; Katz et al., 1998). Verschiedene Studien zeigten immer wieder unterschiedliche Ergebnisse zur Evaluierung der Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit verschiedener Testsysteme zum Nachweis BDV-spezifischer Ak und RNA. Die Entdeckung zirkulierender Immunkomplexe (CIC) im Blut hat Klärung in viele dieser Fragen gebracht (Bode et al., 2001). Dieser CIC-ELISA hat sowohl eine grundlegende Bedeutung für das Verständnis der in Aktivierungsschüben verlaufenden lebenslangen Bornavirus-Infektion als auch eine große praktische Bedeutung für die schnelle Diagnostik. Die CICs erklären nicht nur, warum niedrige oder auch keine BDV-spezifische Antikörpertiter im Serum nachweisbar sein können, sondern heben dadurch auch die zentrale Rolle stiller Träger in der Infektionsprävalenz des BDV hervor, die somit wichtig für das Verständnis der Pathogenität dieses Virus ist (Bode, 2008).

Bornavirus wurde bei Katzen (Lundgren & Ludwig, 1993; Reeves et al., 1998), Eseln (Zimmermann et al., 1994; Bilzer et al., 1996; Caplazi et al., 1999), Ziegen (Caplazi et al., 1999) und Rindern (Bode et al., 1994b) mit neurologischer Krankheit und starker lymphozyter Infiltration des ZNS nachgewiesen. Ihlenburg beschrieb 1966 zum ersten Mal die Empfindlichkeit der Katze nach experimenteller Infektion. Im Jahre 1993 wurden erstmalig spezifische Antikörper gegen BDV in schwedischen Katzen gefunden, die eine nicht-suppurative Meningoenzephalitis zeigten (Lundgren & Ludwig, 1993). Diese Berichte zeigten, dass ein hoher Prozentsatz (44 %) schwedischer Katzen, die unter der sogenannten „Staggering Disease“ litten, Antikörper gegen BDV aufwiesen.

Andererseits konnte ein katzenspezifisches BDV aus dem Zentralnervensystem von Katzen mit "Staggering Disease" (SD) auch in Japan isoliert werden (Nakamura et al., 1996). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass BDV in Zusammenhang mit SD stehen muss (Kamhieh et al., 2008; Wensman et al., 2008). In Deutschland wurde außerdem über erhöhte Bornavirus Werte bei Katzen mit Feline Immunodeficiency Virus (FIV) Infektion berichtet (Hübner et al., 2001).

Die Bornakrankheit ist nicht ausschließlich auf Pferde und Schafe beschränkt, sondern betrifft auch andere Spezies, den Menschen inbegriffen (Bode et al., 1996; de la Torre et al., 1996; Bilzer et al., 1996; Bode & Ludwig, 1997; Dietrich & Bode, 2008). In Seroepidemiologischen Studien wurde eine bedeutsam höhere Seroprävalenz von Bornavirus Infektion bei Patienten mit neuropsychiatrischen Störungen als bei gesunden Menschen gefunden (Bode et al., 1988; Bechter et al., 1992; Bode, 1995; Flower et al., 2008). Mittels RT-PCR von extrahierter RNA aus humanen peripheren Blutmonozyten (PBMC) konnte das BDV-Genom in menschlichen Zellen nachgewiesen werden (Bode et al., 1995). Ein Jahr später wurden aus PBMCs von manisch-depressiven Patienten die ersten menschlichen Virusisolate gewonnen (Bode et al., 1996). In neueren Studien wurde von BDV Infektion beim Menschen, inklusive Kindern, berichtet (Terayama et al., 2003; Bode et al., 2005; Flower & Ludwig, 2006; Miranda et al., 2006; Dietrich & Bode, 2008; Patti et al., 2008; Li et al., 2009). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die Infektion des Menschen mit BDV existiert und geben genau Hinweisen auf den zoonotischen Charakter dieses Virus.

Es gibt verschiedene Hypothesen zur Übertragung des Virus bei Tieren, während diese Frage beim Menschen noch offen ist. Allerdings lässt die stark steigende Anzahl infizierter Kinder vermuten (Patti et al., 2008), dass andere epidemiologische Faktoren auch eine Rolle bei der Übertragung des Virus spielen können. Die Anpassung dieses Virus an Embryonen, die Entdeckung und Lokalisierung von Antigenen im Gehirn (Gosztanyi, 2008), die Verhaltensstörungen von experimentell infizierten Tieren (Ludwig, 2008), die Persistenz des BDV im Gehirn (Ludwig et al., 1988; Gosztanyi & Ludwig, 1995) und die Entdeckung der BDV-Infektion beim Menschen mit der Möglichkeit einer Behandlung (Bode et al., 1995; Bode et al., 1997; Bode et al., 2005; Dietrich & Bode, 2008), ebenso wie die Notwendigkeit, die Forschung an diesem neurotrophen Virus weiter zu vertiefen, werden verwendet zu einer großen

Herausforderung. Aus diesem Grund haben wir die folgende Arbeit beabsichtigt.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mehrere Berichte weisen darauf hin, dass BDV-M-Proteine (p16) von unsegmentierten einzelsträngigen RNA-Viren an den ersten Schritten der Infektion beteiligt sein können, da gegen dieses Protein ebenfalls Antikörper mit virusneutralisierender Eigenschaft gemessen werden konnten (Hatalski et al., 1995; Stoyloff et al., 1997; Chase et al., 2007). Lange Zeit haben die immunogenen Proteine p40 und p23 der Bornavirus Krankheit eine sehr wichtige Rolle in der Diagnostik gespielt (Briese et al., 1995; Ludwig et al., 1993; Ludwig & Bode, 2000) und dabei das Protein p16 aufgrund seines niedrigen Expressionsniveaus und seiner Immunantwort zu wenig beachtet. Das Protein p16 zeigt jedoch eine neutralisierende Antikörperantwort und kann somit eine größere Bedeutung bei der Erforschung von Pathogenese und Kontrolle der Infektion haben (Kliche et al., 1994), als bisher angenommen.

Bis heute liegen sehr wenige Untersuchungen zur Molekularbiologie von p16 vor und die diagnostische Bedeutung bei der Bornaschen Krankheit ist bisher nicht untersucht worden.

Die Aufgabe meiner Dissertation war daher, einen ELISA zu etablieren, der serologischen Untersuchungen zur Entdeckung des Matrix Protein von BDV bei verschiedenen Mammalier-Spezies erlaubt, die eine natürliche Infektion aufweisen. Dazu musste rekombinantes p16 hergestellt und charakterisiert und seine Eigenschaft als Antigen geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

2-Butanol	Merck
4-Chloro-1-Naphthol	Sigma-Aldrich
ABI Prism® Big Dye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Agar	Invitrogen
Agarose	Invitrogen
Akrylamid/Bisakrylamid (30 % / 0,8 %)	Roth
Ampicillin	Merck
APS	Merck
Bisakrylamid	Roth
Bromphenolblau	Biorad
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant-Blau G-250	Sigma-Aldrich
DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche
DIG Easy Hyb-Hybridisierungslösung	Roche
DIG Wasch- und Block-Puffer Set	Roche
Dithiothreitol (DTT)	Roth
Ethanol 70%	Merck
Ethidiumbromid	Merck
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fast Red-TR-Hemi(zinkchlorid)salz	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Glycin	Merck
Glukose	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (Lactose-Analagon)	Merck

Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ ·x 6H ₂ O)	Merck
Marker (Größenstandard) See Blue® Plus 2	Invitrogen
Marker <i>HyperLadder/lane IV</i>	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin(TEMED)	Roth
Naphthol-AS-TR Phosphate Tabletten zu 4 mg	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen	Merck
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Rotiblock® (10fach konz.)	Roth
Salzsäure (HCl)	Merck
Serumalbumin aus Rind (BSA)	Roth
SDS ultra pure für die Elektrophorese	Roth
Silbernitrat (AgNO ₃)	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Triton X-100	Fluka
TRIzol™-Reagenz	GibcoBRL
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filterpapier	Whatman
Gewebekulturgefäße	Falcon
Mikrotiterplatten	Falcon
Nitrozellulosemembran	Sigma-Aldrich

2.1.3 Enzyme und Plasmide

DNase I: PeqGold DNase I (RNase-frei)	Peqlab
DNase Quick-Clean-Reagenz	Bioline
dNTP-Mix (je 0,5 mM)	MBI Fermentas
One-Step RT-PCR Kit	Qiagen
pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega
pGEX6P-2 aus dem GST Gene Fusion System	Amersham
Restriktionsendonuklease BamH I mit 10x Puffer	Bioline
Restriktionsendonuklease EcoR I mit 10x Puffer	Bioline
Restriktionsendonuklease Xho I mit 10x Puffer	Bioline
PreScission Protease	Amersham
T4 DNA Ligase	Bioline
<i>Taq</i> DNA Polymerase mit 10x Puffer	New England BioLabs
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Stratagene

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien

humane Oligodendroglia-Zellen (OL)	Institut für Virologie der Freien Universität Berlin
equine Trachea-Zellen (TUW)	Institut für Virologie der Freien Universität Berlin

2.1.5 Prokaryotische Zelllinien

<i>E. coli</i> K12-Stamm JM109	Genotype: <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , Δ (<i>lac-proAB</i>), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI^qZΔM15</i>].
<i>E. coli</i> Stamm Rosetta™(BL21)	Genotype: F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r_B^- m_B^-) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)

2.1.6 Virusstämme

BDV

Stamm-V	Kaninchen adaptiertes Bornavirus; nach Zwick (1939) Stamm V genannt und siebenmal über ein Tag alte Ratten passagiert (Ludwig et al., 1993).
Stamm -Hu-H2	Humanes Isolat Hu-H2; stammt aus peripheren Blutmonozyten (<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , PBMC) einer unter Zwangsstörungen leidenden Patientin (Bode et al., 1996).
Stamm-Eq. A24	Equines Bornavirus

2.1.7 Antikörper, Seren und Antigene

AffiniPure Goat Anti-Horse IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories.

AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories.

AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories.

AffiniPure Goat Anti-Cat IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories.

Anti-GST Antikörper, Amersham Biosciences

EV-3.2 (Anti-BDV-Serum, Kaninchen; gerichtet gegen BDV s-Antigen).

RD65, RD58 (Anti-BDV-Seren, Kaninchen).

humanes Patientenserum Nr. 25867 (HS25867)

Fiodora Anti-BDV-Serum, Pferd; freundlicherweise von Prof. P. Glatzel zur Verfügung gestellt.

Rekombinantes Protein M.

2.1.8 Puffer, Medien, Gefäße und Zusätze für die Zellkultur

Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM).	Invitrogen/Gibco BRL, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen/Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen/Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen/Gibco BRL, Eggenstein
Zellkulturschalen (d = 10 cm, 15 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.9 Geräte

Instabmesselektrode: pH-Meter 761	Calimatic KNICK
Kühlzentrifuge: Biofuge Fresco	Heraeus
Kühlzentrifuge: Varifuge 3.0R	Heraeus
MALDI-TOF-Massenspektrometer Ultraflex	Brucker-Daltonik
Mikroskop:CK	Olympus
PCR-Automat: Mx 4000 (<i>Real-time</i>)	Stratagene
PCR-Automat: T3 Thermocycler	Biometra
Pipetten	Eppendorf; Gilson
Spektrometer: SmartSpec™ 3000	Biorad
Sterilarbeitsbank	The Baker Company, INC.
Ultraschallgerät: Sonifier Cell Disruptor B15	Branson
Ultrazentrifuge: L8-70M	Beckman
Vakuum Blotter Model 785	Biorad
<i>Tank Blot</i> -Apparatur	Biorad
Vortex	Ika
HiTrap 15 ml Protein G Säule	Amersham
Wasserbad	Braun

Multikanalphotometer SLT Spectra	Tecan
ELISA-Washer SLT Tecan 96 PW	Tecan
Mikrotiterplatten MaxiSorp F96 Immuno Module	Nunc

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen und Virusarbeiten

2.2.1.1 Medien und Puffer

Die Puffer wurden mit durch Milli-Q-Filter (MILLIPORE) filtriertem Wasser (H₂O bidest.) hergestellt und zur Herstellung RNase- und DNase-freier Puffer mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrokarbonat (DEPC) versetzt und autoklaviert (DEPC-H₂O). Der pH-Wert einer Lösung wurde mit einer Einstabmeßelektrode bei Raumtemperatur gemessen und eingestellt.

Dulbecco's MEM (DMEM) mit Zusätzen:	Dulbecco's MEM Pulvermedium, (Invitrogen), GIBCO
	L-Alanin 0,0178 g/l
	Glycin 0,7 g/l
	L-Glutaminsäure 0,075 g/l
	L-Prolin 0,025 g/l
	Biotin 0,1 gm/l
	Hypoxanthin 0,025 g/l
	NaHCO ₃ 3,7 g/l

Vor Gebrauch wurden 10%iges fötales Kälberserum (FKS), 100 000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin zugegeben.

Trypsinlösung:	NaCl 8,0 g/l
	KCl 0,2 g/l
	Na ₂ PO ₄ 1,44 g/l
	KH ₂ PO ₄ 0,2 g/l

	Trypsin (1:250)	2,5 g/l
	Versen (EDTA)	1,23 g/l
	Phenolrot	0,016 g/l
	mit 1 N HCl auf pH 7,2 einstellen	
PBS pH 7,2:	KCl	0,2 g/l
	NaCl	8 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g/l

2.2.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

BDV-infizierte und nicht infizierte humane Oligodendroglia- (OL) und equine Trachea-Zellen (TUW) wurden im Brutschrank (WTB Binder) unter konstanten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 100 % Luftfeuchtigkeit) in Zellkulturschalen (TPP) mit Zellkulturmedium (DMEM) bis zur Konfluenz kultiviert. Zellkulturarbeiten wurden an Sterilarbeitsbänken durchgeführt. (The Baker Company, Inc.).

Zur Passagierung wurden die Zellen nach Entfernen des Zellkulturmediums zweimal mit PBS gewaschen, durch Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C abgelöst, in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:5 in neue Zellkulturschalen ausgesät. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen anschließend mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Bevor sich die Zellen vom Plattenboden ablösten, wurde das Trypsin abgesaugt, die Zellen mit 5ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 1000 rpm und 4 °C pelletiert, bevor diese direkt zur RNA-Extraktion überführt wurden.

2.2.1.3 RNA-Extraktion aus Kulturzellen

Die Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben kann wegen der Empfindlichkeit der RNA gegenüber stabiler Ribonucleasen erheblich beeinträchtigt werden. Dabei ist speziell zu beachten, dass sowohl die im Zellmaterial vorhandenen Nucleasen als auch die im Laborbereich nahezu überall verbreiteten Ribonucleasen die hydrolytische Spaltung von Nucleinsäuren katalysieren und zur Degradation der RNA führen.

Die Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte mit S.N.A.P.TM Total RNA Isolation Kit (Invitrogen). Eine zentrifugierte Probe wurde in 600 μ l Lysispuffer resuspendiert. Nach vollständiger Lyse und Zentrifugation bei v_{\max} (13000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, 300 μ l Isopropanol dazugegeben und das Gefäß sechs bis zehnmal kopfüber geschwenkt. Die Lösung wurde in eine S.N.A.P.TM Column (Invitrogen) überführt und eine Minute bei V_{\max} zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 600 μ l 1 x RNA-Waschlösung wurde bei v_{\max} zentrifugiert und der Überstand verworfen (dieser Schritt wurde zweimal wiederholt). Die behandelte S.N.A.P.TM Column wurde eine Minute zentrifugiert, wobei das Auffanggefäß verworfen und ein frisches Gefäß bereitgestellt wurde. Zur Elution der RNA wurde die Säule mit 135 μ l H₂O bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Säule für eine Minute bei v_{\max} zentrifugiert. Nach Zugabe von 15 μ l 10 x DNase-Puffer und 1 μ l (2 U pro 1 μ l) RNase-freie DNase wurde dieses in der Säule gemischt und kurz zentrifugiert, bevor es für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert wurde. Nach Zugabe von 450 μ l Bindungspuffer und fünf- bis sechsmaliges Kopfüber-Schwenken des Gefäßes wurden 300 μ l Isopropanol hinzugefügt und das Gefäß wieder sechs- bis zehnmal kopfüber geschwenkt. Die Lösung wurde in eine neue S.N.A.P.TM Column überführt und für 1 min bei v_{\max} zentrifugiert, den Überstand anschließend verworfen. Nach Zugabe von 600 μ l der 1 x RNA-Waschlösung wurde bei v_{\max} zentrifugiert, der Überstand verworfen und der letzte Schritt zweimal wiederholt. Die behandelte S.N.A.P.TM Column wurde 1 min zentrifugiert, das Auffanggefäß verworfen und durch ein frisches, steriles und RNase-freies Gefäß ersetzt. Zur Elution der RNA wurden 125 μ l H₂O (Nuklease-frei) oder 10 mM Tris, pH 8.0, auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, anschließend 1 min bei v_{\max} zentrifugiert und die Säule verworfen. Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde in einem Spektralphotometer (BIORAD) durchgeführt. Die folgende Tabelle fasst die Reagenzien für die RNA-Extraktion zusammen, die in den entsprechenden Schritten eingesetzt wurden.

Lösung	Zusammensetzung
Lysis Buffer	150 μ l TE; 450 μ l Binding Buffer
Binding Buffer	7 M Gdn•HCl; 2% Triton X-100
5X RNA Waschlösung	500mM NaCl

10X DNase Buffer	400 mM Tris, pH 8.0; 60 mM MgCl ₂ 20 mM CaCl ₂
RNase-Free Dnase	2 U/μl

2.2.1.4 Quantifizierungen von RNA-Proben

Die RNA-Probe (5 μl) wurde 10 min bei 60 °C inkubiert, mit 495 μl DEPC-H₂O gemischt und die Extinktionen in einer Quarz-Küvette (BIORAD) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ in einem Spektrophotometer (BIORAD) gegen einen Leerwert (500 μl DEPC-H₂O) vermessen. DNA-Proben wurden ohne vorherige Inkubation auf gleiche Art vermessen. Bei einer verwendeten Probenverdünnung (1:100) und bei einem gegebenen Konversionsfaktor 1 OD_{260nm} entspricht ca.

50 μg/ml für dsDNA

40 μg/ml für RNA

(nach Sambrook et al., 1989)

Es ergeben sich folgende Gleichungen:

DNS-Konzentration (μg/ml) = Messwert OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 50

RNS-Konzentration (μg/ml) = Messwert OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40

2.2.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mittels Reverser Transkriptase-Polymerasekettenreaktion können kleinste Mengen einer mRNA-Sequenz spezifisch detektiert werden. Das Prinzip der RT-PCR besteht darin, die reverse Transkription von RNA mit der Amplifikation der daraus erhaltenen komplementären DNA (cDNA) durch die Polymerasekettenreaktion zu verbinden.

Die Reaktionsmischung für einen Ansatz bestand aus:

DEPC-Wasser:	22,5	μL
5 × PCR-Puffer:	10	μL
dNTPs (10 mM):	2	μL
Forward-Primer (20 pmol/μL):	1,5	μL
Reverse-Primer (20 pmol/μL):	1,5	μL
Enzymmix:	2	μL
RNase-Inhibitor:	0,5	μL

Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit Wasser als Probe mitgeführt. Für den Reaktionsansatz werden dann je 40 µl Mix + 10 µl RNA angesetzt. Die RT-PCR ist in einem T3 Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt worden.

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	10 min	95 °C
Denaturierung		60 s	94 °C
„Annealing“	40x	90 s	55 °C
„Elongation“		60 s/kb	72 °C
„Elongation“	1x	10 min	72 °C
Pause		Pause	4 °C

2.2.2.1 Primer enthalten Schnittstellen für Restriktionsenzyme

Forward-Primer BamHI

Reverse-Primer XhoI

One-Step-RT-PCR-Kit von QIAGEN

Enzymmix: - Omniscript™ Reverse Transcriptase
- Sensiscript™ Reverse Transcriptase
- HotStarTaq® DNA-Polymerase

5 × One Step RT-PCR-Puffer:
- 12,5 mM MgCl₂

dNTPs: - je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

2.2.2.2 PCR-cDNA-Produkt-Aufreinigung

Nach erfolgter RT-PCR wurden die Reaktionsansätze von den Enzymen und kleinen unspezifischen Amplifikationsprodukten befreit. Diese Reinigung war für die anschließenden Sequenzierungs- und Klonierungsreaktionen unerlässlich und wurde mit

dem DNase Quick Clean (Bioline) durchgeführt (Durchführung laut Herstellerangaben).

Zum PCR-Produkt wurde dieselbe Menge DNase Quick Clean (Bioline) hinzugegeben, die als Ansatz gevortext wurde. Nach Inkubation von 5 min. bei RT und Zentrifugation bei 13000 rpm für 12 min. wurde das PCR Produkt mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend gevortext. Dann wurde für 12 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Überstand abgenommen. Das Pellet wurde getrocknet und in 30 µl H₂O bidest aufgenommen.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Enzyme: *Taq*-DNA-Polymerase (Firma New England BioLabs)
 Pfu- DNA-Polymerase (Firma Stratagene)

Geräte: PCR-Automat T3 Thermocycler (BIOMETRA)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) besteht darin, einzelsträngige DNA-Moleküle mittels eines Enzyms (der DNA-Polymerase) mittels Oligodesoxynukleotid-Startsequenzen (*Primer*) in doppelsträngige DNA umzuschreiben.

Eine PCR umfasst drei Verfahrensschritte, die als Denaturierung, Annealing und Extension bezeichnet werden. Die Hitze-Denaturierung veranlasst die Trennung der eingesetzten doppelsträngigen DNA in zwei Einzelstränge. Dabei brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nucleobasen aufgrund der hohen Temperatur auf. Im zweiten Schritt wird die Temperatur des Reaktionsansatzes wieder runtergekühlt, wodurch sich gezielt zwischen der flankierenden Nucleotid- Sequenz am 3'-Ende jedes Matrizenstrangs und dem komplementären Primer Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden können. Primer sind durch chemische Synthese hergestellte Oligonucleotide, in denen in der Regel 20 bis 30 Desoxyribonucleotide-Reste miteinander verknüpft sind. Durch dieses Primer-Annealing wird die Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes festgelegt. Die spezifische Annealingtemperatur (T_A) eines Primers hängt von seiner Länge und von seiner Basenzusammensetzung ab. G/C-Paare bilden durch drei Wasserstoffbrücken

stärkere Bindungen aus als A/T-Paare mit nur zwei Wasserstoffbrücken, daher haben G/C-reiche Oligonucleotide eine höhere T_A als A/T-reiche Paare. Eine hitzestabile Polymerase, die Taq-Polymerase, erstellt – ausgehend vom 3'-OH-Ende des Primers – durch Primer-Extension eine Kopie der DNA-Matrize. Nachdem die gewünschte Sequenz synthetisiert ist, werden die Stränge durch Hitzeeinwirkung voneinander getrennt. Durch erneute schnelle Senkung der Temperatur wird eine spezifische Bindung des Primers an die entstandenen DNA-Stücke ermöglicht. Mittels Primerverlängerung wird dann wieder eine neue Kopie der Template-DNA erstellt. Durch dreißig- bis vierzigfaches Wiederholen dieses Zykluses erreicht man eine exponentielle Vermehrung des definierten DNA-Bereiches zwischen den Primern.

Durchführung:

Ein PCR Standardansatz von 100 μ l wies folgende Zusammensetzung auf (ca. 100 ng „*template*“).

PCR Puffer (10x)	5 μ l
dNTPs (10 mM)	2,5 μ
<i>Plusstrang-primer</i> (100 pmol/ μ l)	0,5 μ l
<i>Minusstrang-primer</i> (100 pmol/ μ l)	0,5 μ l
DNS-„ <i>template</i> “ (50 ng/ μ l)	1-2 μ l
DNS-Polymerase (2,5 U/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	ad 50 μ l

Die Inkubation der Ansätze wurde in einem PCR-Automat T3 Thermocycler von Biometra[®] durchgeführt, wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah:

Schritte	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	4 min	95 °C
Denaturierung		30 s	95 °C
„ <i>Annealing</i> “	30x	30 s	55 °C
„ <i>Elongation</i> “		1 min/kb	72 °C

„Elongation“	1x	4 min	72 °
Pause		Pause	4 °C

2.2.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wurden die Proben auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt bis das Gel submarin vorlag. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet.

PCR-Proben: 5 µl

Probenpuffer: 2 µl

Marker *HyperLadder/lane IV*: 5 µl

H₂O ad 20 µl

Von dem Marker wurden 5 µL eingesetzt, welche mit 8 µL Wasser und 2 µL Probenpuffer verdünnt wurden.

Das Gel lief bei 100 V. Nach Abschluss der Elektrophorese konnte man die entsprechenden Banden durch das Ethidiumbromid unter UV-Licht sehen. Marker und Probenpuffer (5×Loading Buffer) stammten von Bioline[®].

Elektrophoresepuffer: - 20 mL 50×TAE

- 80 µL Ethidiumbromid
auf 1000 mL Wasser

50×TAE – Puffer:

- 242 g Tris
- 18,5 g EDTA
- 20,5 g Natriumacetat
ad 1000 mL Wasser
pH 8,0 mit Essigsäure eingestellt; steril filtriert

Probenpuffer: - 20% Ficoll 400 (o. 40% Saccharose o. 30% Glycerin)

- 25 mM EDTA
- 0,05 % Bromphenolblau

- 0,03 % Xylen Cyanol

2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung aufgereinigter cDNA erfolgte an einem ABI Prism[®] 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems) unter Anwendung des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger *et al.*, 1977.

Durchführung:

Die Sequenzierungsreaktion wird mit dem „ABI Prism[®] Big Dye 3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems) durchgeführt sowohl einem Reaktionsansatz als auch einem geeigneten Temperaturprogramm unterzogen.

Komponente	Volumen
5x Sequenzierpuffer	2µl
Reaktionsmix	2µl
Primer (10 mM)	1µl
cDNA	5µl

Sequenzierungsprotokoll:

Schritt	Anzahl	Dauer	Temperatur
1	1x	2min.	96 °C
2		10s	96 °C
3	25x	5s	55 °C
4		4min.	60 °C
5		Pause	4 °

2.2.6 Klonierung und Transformation

2.2.6.1 Ligation des p16- Genfragment in den pGEM- T- Vektor

Die pGEM-T-Vektor-Systeme sind günstige Systeme für das Klonieren von PCR-Produkten. Die pGEM-T-Klonierungsstrategie bietet eine sehr einfache Möglichkeit,

um die beiden Enden des Vektor mit je einem 3'-terminalen Thymidine zu erhalten und so die Leistungsfähigkeit der Ligation eines PCR Produktes, welches poly-A-Enden aufweist, in diesem Vektor zu erleichtern.

Die gereinigte cDNA wurde als nächstes in den pGEM-T-Vektor ligiert. Bei dem Ansatz der Ligation musste auf das Verhältnis von Vektor und eingesetzter cDNA geachtet werden. Bevorzugt wurde ein 3:1-Optimierung von Insert zu Vektor. Dieses Verhältnis ist allerdings nur ein Orientierungswert. Die Proben wurden wie folgt vorbereitet.

Komponenten	Volumen
2 x Rapid Ligation Buffer	5 µl
Insert(cDNA mit Restriktionsenzymchnittstelle)	1 µl
T4-Ligase	1 µl
pGEM-Vektor	1 µl
Wasser	2 µl

Das Endvolumen betrug immer 10 µL. Nach vorsichtigem Mischen inkubiert man die Ligation über Nacht bei 4 °C.

T4-Ligase (Promega):

- 10 mM Tris-HCl (pH = 7,4)
- 50 mM KCl
- 1 mM DTT (Dithiothreitol)
- 0,1 mM EDTA
- in 50 % Glycerol

2 x Rapid Ligation Buffer:
(Promega)

- 60 mM Tris-HCl (pH = 7,8)
- 20 mM MgCl₂
- 20 mM DTT
- 2 mM ATP
- 10 % Polyethylenglykol

Anschließend wird der Ligationsansatz vorsichtig gemischt (nicht vortexen) und bei 4°C über Nacht inkubiert.

2.2.6.2 Transformationen des ligierten pGEM- T- Vektors in JM109-Zellen

Unter Transformation versteht man in der Gentechnik das Einbringen von DNA in lebende Zellen. Die Transformation des ligierten pGEM-Vektors wird in kompetenten JM109 E. coli Zellen durchgeführt.

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. 50 µl der Zellen und 5 µl ligierter Vektor werden vorsichtig miteinander gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei heftet sich die Plasmid-DNA von außen an die Bakterienzellen an. Um die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zelle zu bewirken, setzt man dieses Gemisch einem Hitzeschock aus, was bedeutet, dass man die Temperatur für kurze Zeit auf exakt 42 °C erhöht und das Gemisch dann schnell wieder auf Eis abkühlt. Anschließend werden 900 µl auf Raumtemperatur erwärmtes SOC-Medium hinzugefügt. Die Proben werden 2 h bei 37 °C in einem Inkubator mit Schüttler (160 rpm) inkubiert.

2.2.6.3 Blau- Weiß- Selektion

Nach Transformationen des ligierten pGEM-T-Vektors in JM109-Zellen werden pro Transformation je zwei auf Raumtemperatur temperierte LB- Ampicillin- Platten durch Verstreichen von je 35 µl XGal (5 % w/v in Dimethylformamid) und 100 µl IPTG (20 % w/v) für die Blau-Weiß-Selektion vorbereitet. Danach werden die Platten ca. eine halbe Stunde bei 37 °C im Inkubator getrocknet. Anschließend werden je 100 µl bzw. 150 µl (2. Platte) der transformierten Bakterien ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Mithilfe der sogenannten "Alpha- Komplementation" können beim Klonieren positive Klone (Bakterien- Zellen, die ein rekombinantes Plasmid enthalten) sehr einfach identifiziert werden. Das System beruht darauf, dass das Gen, welches für das Enzym β -Galactosidase kodiert in zwei Fragmente zerlegt wird: Der N-Terminale Teil (α -Fragment) ist auf dem Plasmidvektor kodiert, der C-terminale Teil (ω -Fragment) liegt auf dem Bakterienchromosom verankert. Durch die gleichzeitige Expression beider Fragmente kann die Aktivität der β -Galactosidase hergestellt werden. Die entsprechenden Kolonien verfärben sich dann in der Gegenwart des β -Galactosidase-Substrates X-Gal blau. X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) ist

normalerweise farblos, wenn es jedoch durch β -Galactosidase gespalten wird, wobei das tiefblaue 5-Brom-4-chlor-indigo entsteht. Befindet sich nun die MCS (multiple cloning site) innerhalb des Plasmid-kodierenden N-Terminus des lac- Z Gens, wird durch die Insertion eines DNA-Fragments in die MCS der Leserahmen des α -Fragments unterbrochen bzw. dessen Funktion zerstört. Es kommt zu keiner α -Komplementation, die entsprechende Kolonie erscheint weiß.

Aus den ausplattierten transformierten Bakterien wurden weiße Kolonien herausgepickt und in 5 ml Ampicillin-haltigem (100 μ l/ml) LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Aus den herangezüchteten Zellen wird nun mittels QIAprep-Kit wieder die Plasmid-DNA extrahiert. Diese Plasmid DNA wird nun ebenso wie der pGEX6P-2-Vektor einem Restriktionsverdau unterzogen. Vor dem Restriktionsverdau kann zur Überprüfung der Vektorsequenz auch noch eine Sequenzierungs-PCR erfolgen.

2.2.6.4 Restriktionsverdau von pGEM mit BamH I und Xho I

Um mit dem klonierten M-Genfragment weiterarbeiten zu können, muss dieses nach der Plasmid-Extraktion aus dem pGEM-Vektor herausgeschnitten werden. Die Restriktion erfolgt mit den beiden Restriktionsenzymen BamH I und Xho I. Die beiden Enzyme schneiden das Genfragment präzise aus dem Vektor heraus, ohne dass das Leseraster verändert wird. Die Restriktionsverdau erfolgte nach folgendem Protokoll:

Komponenten	Volumen
BamH I	1 μ l
Xho I	1 μ l
BSA	0,25 μ l
dH ₂ O	10,25 μ l
Puffer(NEBuffer BamH I)	2,5 μ l
Plasmidpräparation	10 μ l

Der Restriktionsansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Restriktionsverdau erfolgt zunächst eine Agarosegelelektrophorese, womit sichergestellt wird, dass das M-Genfragment aus dem Vektor geschnitten wurde. Dann wird das geschnittene

Genfragment aus dem Gel extrahiert.

2.2.6.5 Restriktionsverdau von pGEX-6P-2 mit BamH I und Xho I

Der Verdau von pGEX wird auf die gleiche Weise wie der Verdau von pGEM vorgennomen. Um eine Eigenligation der linearisierten pGEX-6P-2-Vektoren zu verhindern, werden diese mittels einer alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wird 1 µL alkalische Phosphatase dem Reaktionsansatz beigefügt. Im Anschluss wird der Ansatz für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der alkalischen Phosphatase erfolgt durch Erhitzen des Ansatzes für 15 Minuten bei 85 °C.

2.2.6.6 Ligation des p16- Genfragments in pGEX- 6P-2

Das aus dem Gel extrahierten p16-Genfragment kann in den linearisierten pGEX-6P Vektor ligiert werden. Die Ligation erfolgt auf die gleiche Weise wie bei pGEM. Hier sollte eine 1:5-Optimierung des Vektors zu Insert beachtet werden.

Komponenten	Volumen
pGEX Vektor	1,0 µL
P16-Gen – Fragment	1,0 µL
T4 DNA Ligase	1,0 µL
2x Rapid Ligation Puffer T4 DNA Ligase	2,0 µl
Endvolumen (dH ₂ O)	20,0 µl

Die eingesetzte Menge des p16-Genfragmentes richtete sich nach der Konzentration des eluierten Gens.

2.2.6.7 Transformation des ligierten pGEX- Vektors in kompetente Zellen

Die Transformation des ligierten pGEX-Vektors erfolgt in kompetente Rosetta-(BL21)-Zellen. Diese Transformation ist ähnlich wie die in JM109-Zellen. Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. 50 µl bzw. 100 µl der Zellen und 10 µl ligierter Vektor werden vorsichtig miteinander gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wird das Gemisch kurze Zeit auf 42 °C erhitzt und sofort wieder auf Eis inkubiert. Bei der

Transformation des ligierten pGEX- Vektors werden statt des SOC-Mediums 900 µl auf Raumtemperatur erwärmtes LB-Glukose-Medium hinzugefügt, da die kompetenten Rosetta-Zellen Glukose zum Wachstum benötigen. Im Weiteren verläuft die Transformation wie bei den JM109-Zellen.

2.2.7 Screening-PCR

Um heraus zu finden, welche Zellen den gewünschten Vektor mit dem M-Genfragment aufgenommen haben, wird eine Screening-PCR angesetzt. Ein Blau-Weiß-Screening ist aufgrund des nicht vorhandenen LacZ-Gens bei dem pGEX-Vektor nicht möglich. Für die Screening-PCR werden geeignete Kolonien vorsichtig mit einer Pipettenspitze von den Platten gepickt und in 5 mL LB-Medium bei 37 °C unter schütteln über Nacht inkubiert. Die Screening-PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

Komponenten	Volumen
DEPC- H ₂ O	28,75 µL
Puffer	5,0 µL
dNTP	1,0 µL
Primer A	1,0 µL
Primer B	1,0 µL
Taq- Polymerase	0,25 µL
MgCl ₂	3,0 µL
Plasmid- DNA	10,0 µL

Schritte	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	4min	95 °C
Denaturierung		30s	95 °C
„Annealing“	30x	30s	55 °C
„Elongation“		1min/kb	72 °C
„Elongation“	1x	4min	72 °C
Pause		Pause	4 °C

Nach der PCR wird durch eine Agarosegelelektrophorese ermittelt, ob das M-Genfragment erfolgreich in den pGEX-Vektor aufgenommen worden ist. Anschließend kann bei erfolgreicher Ligation eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt werden, mit der festgestellt wird, ob das M-Genfragment mit der korrekten Basensequenz in den Vektor eingebaut worden ist.

2.2.8 Sequenzierungs-PCR

Ähnlich wie bei einer PCR wird die DNA zunächst vervielfältigt. Hierbei befinden sich jedoch nicht nur Desoxynucleotide (dNTPs) sondern auch Didesoxynucleotide (ddNTPs) im Reaktionsansatz. ddNTPs fehlt die 3'OH-Gruppe an der Ribose. Aufgrund dessen kann dort die Polymerase nicht binden und die Kettenverlängerung ist nicht mehr möglich. Entsprechend der Verwendung von ddATP, ddTTP, ddGTP oder ddCTP bricht die Synthese nach Einbau der Didesoxynucleotide bei einem Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin ab. Der Einbau der ddNTPs folgt statistischen Gesetzen und führt zu unterschiedlich langen DNA-Strängen. Zur Detektion der Nucleotide werden die ddNTPs mit spezifischen Farbstoffen verbunden, der allen Fragmenten mit dem gleichen ddNTP die gleiche Farbe verleiht. Auf diese Weise erhält man eine Lösung mit einer Mischung aus markierten Fragmenten, die jeweils mit einem A bzw. T bzw. G bzw. C enden. Die unterschiedlich langen Fragmente werden nun auf einem Gel aufgetrennt und können mittels Laser detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgt mit Hilfe des Programms MegAlign.

Komponenten	Volumen
DEPC- H ₂ O	10,0 µL
Verdünnungspuffer	1,0 µL
Dye- Terminator Mix	2,0 µL
Primer	1,0 µL
Template	1-6 µL

Standardansatz für Sequenzierungs-PCR

Schritte	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	4 min	96 °C
Denaturierung		30 s	96 °C
„Annealing“	30x	30 s	55 °C
„Elongation“		1 min/kb	72 °C
„Elongation“	1x	4 min	72 °C
Pause		Pause	4 °C

2.2.9 Induktion der Expression

Von den Klonen wurde eine Über-Nacht-Kultur angesetzt. 5 mL LB-Glucose-Medium wurden mit 50 µL der Kultur beimpft. Diese wurde bei 37 °C inkubiert, bis eine OD 600 von 0,5 erreicht wurde. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µL IPTG, um die Expression des M-Proteins zu starten. Die Kultur wurde über Nacht weiterinkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine Kultur mitgeführt, die nicht induziert wurde.

IPTG – Isopropyl-β-D-Thiogalactosid

- 100 mM

2.2.9.1 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Lösungen:	Bindungspuffer 1x PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.3)
	Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM red. Glutathion, pH 8.0)
	GST-Lyse-Puffer (1 % Triton in PBS, 1 Spatelspitze Lysozym)
	PreScission cleavage Puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (DTT), pH 7.5)
Enzyme:	PreScission Protease
Materialien:	Glutathione Sepharose 4B Fast Flow Matrix
	HiTrap 15 ml Protein G Affinitätschromatographie Säulen

Für die Expression des GST-Fusions-M-Proteins wurden die pGEX-Konstrukte in *E. coli* BL 21 transformiert. Das GST-Gene-Fusion-System besteht aus drei verschiedenen Schritten, die die Expression, Reinigung und Detektion von in *E. coli* exprimierten GST-Fusionsproteinen ermöglichen. Für den Ansatz wurde eine uninduzierte Kontrolle mitgeführt, um die Expressionsraten induzierter Bakterienzellen nach Beendigung der Expression mit den Expressionsraten uninduzierter Kontrollen im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel und im Western Blot zu vergleichen.

Bevor eine Induzierung mit IPTG erfolgt, wurden 50 ml einer Übernachtskultur in 450 ml LB-Amp-Medium gegeben und nach zweistündiger Inkubation bei 30 °C wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1,0 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Dieser Schritt ist erforderlich um eine geringere optische Dichte von 0,6 zu erhalten. Die Kultur wurde drei Stunden geschüttelt. Nach Beendigung der Induktion wurden die Kulturen in ausgewogene Zentrifugenbecher überführt und anschließend wurde 15 min, bei 4 °C und 7700 x g (8000 rpm) abzentrifugiert und das Pellet in 10 ml kaltem PBS aufgenommen. Dieses wurde auf Eis stehend mittels Ultraschall (drei Pulse a 10 sec, 40 Watt) aufgeschlossen, mit 20 % Triton X-100 (Endkonzentration 1 %) versetzt und 30 min bei 4 °C sanft rotiert, anschließend wurde 15 min, bei 4 °C und 12 000 x g abzentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die Überstand in neues Gefäß gegossen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis stehen gelassen. Die Überstände und die Zellpellets wurden für die SDS-PAGE vorbereitet.

Anschließend wurde der Überstand in eine Affinitätschromatographiesäule auf eine Glutathion Sepharose 4B-Fast-Flow-Matrix (Bettvolumen: 1ml) gegeben. Zuvor war die Matrix zweimal mit 10 ml Bindungspuffer equilibriert worden. Zu Folgenden wurde die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion Sepharose mittels mindestens eine Stunde bei Raum Temperatur (RT) sanft rotiert. Dann wurde die Matrix 3-mal gewaschen und die Elution der GST-Fusionsproteine wurde in 5 Schritten durch Inkubation mit einem Volumen Elutionspuffer für je 10 min bei RT erfolgt. Die Säule wurde durch Waschen mit 5 ml 1xPBS, 3,5 M NaCl und 10 ml 1 x PBS wieder regeneriert. Die Abscheidung der GST-Fusionsproteine wurde durch PreScission Protease nach den Angaben des Herstellers Amersham Pharmacia Biotech durchgetrennt. Mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung oder anschließendem Western Blot mit Immunfärbung wurden das rekombinante Matrix-

Protein (recp16) analysiert. Das Protein wurde dialysiert und sterilfiltriert. In einer Bestimmung nach Lowry et al., 1951, wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Das so dargestellte recp16 wurde im *in vitro*-Bindungs-Assay eingesetzt.

2.2.10 Dialyse

Die Abtrennung von hydrophilen Verunreinigungen und Salzen erfolgte durch Dialyse. Hierzu wurden Dialyse-Schläuche (MWCO 6000-8000) vor deren Gebrauch in dest. Wasser mit 10 mM EDTA gekocht und anschließend mehrfach mit dest. Wasser gespült. Die Aufbewahrung vorbehandelter Schläuche erfolgte in EtOH (20 % (v/v)) bei 4 °C. Die Dialyse wurde bei 2 bis 3-maligem Pufferwechsel bei 4 °C für die Dauer von 4-6 h oder über Nacht durchgeführt.

2.2.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Lowry

Die Bestimmung der Konzentrationen des M-Proteins wurde mit dem „Modified Lowry Protein Assay Kit“ von Pierce Inc. nach einer Methode von Lowry, *et al.*, 1951 durchgeführt. Das Prinzip dieses Test beruht auf der Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Tyr/Trp-Reste, Cu^{2+} und Cu^+ sowie Wolframate und Molybdate) durch die mit dem Cu^{2+} komplexierten Proteine. Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau. Durch Redoxprozesse im Reaktionsgemisch wurden farbige Verbindungen gebildet. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt. Die Konzentrationsbestimmung des Proteins wurde nach den Angaben des Herstellers Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

2.2.12 Visualisierung von Proteinen

2.2.12.1 SDS-PAGE

Stammlösungen für das Gelsystem:

Acrylamidstock	30 %	Acrylamid
	0,8 %	Bisacrylamid
Trenngelpuffer	0,8 %	SDS
	1,5 M	Tris, pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,4%	SDS (w/v)
	0,25 M	Tris, pH 6,8
Laufpuffer	0,192 M	Glycin
	0,1%	SDS (w/v)
	0,025 M	Tris, pH 8,3
Probenpuffer	0,1 M	DTT
	5,0%	SDS (w/v)
	10,0%	Glycerin
	0,06 M	Tris, pH 6,8
	0,025 %	Bromphenolblau (w/v)
Färber	0,5 %	Coomassie Blue
	50 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
Entfärber	25 %	Ethanol
	10 %	Essigsäure
Ammoniumpersulfat (APS)	10 %	Ammoniumpersulfat
N,N,N',N'-Tetramethylethylene- diamin (TEMED)	>99 %	TEMED (v/v)
Lösung	5%-iges Sammelgel	15%-iges Trenngel
DDI H ₂ O	5,7 µl	2,4 µl
Acrylamid 30%/ Bisacrylamid 0,8% (Rotiphorese-Gel)	1,7 µl	5,0 µl

Sammelgelpuffer	2,5 µl	
Trenngelpuffer		2,5 µl
10% w/v SDS	0,1 µl	0,1 µl
TEMED (als Katalysator)	50 µl	50 µl
APS (als Radikalbildner)	100 µl	100 µl

Zur Spaltung von Disulfidbrücken wurde 2% β-Mercaptoethanol (v/v) zum Probenpuffer gegeben.

Molekulargewichtsstandard: „*prestained protein marker*“ (Fa. Invitrogen).

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde ein SDS-PAGE System verwendet (Trenngel 15% Acrylamid-Endkonzentration, Sammelgel 5% Acrylamid-Endkonzentration). Die Elektrophoresen wurden mit einer vertikalen Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 µL kaltem PBS-Puffer aufgenommen. Die Proben wurden auf Eis gelagert während das Gel gebaut wurde.

Proteinproben wurden vor dem Auftragen in jeweils gleichem Volumen an Probenpuffer aufgenommen und 5 min. bei 95 °C in Wasserbad erhitzt (die Probe enthält 2% β-Mercaptoethanol um die Protein zum reduziert). Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 60 V im Sammelgel und bei 100 V im Trenngel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel für Silberfärbung (siehe 2.2.12.3) oder Westernblot-Analyse (siehe 2.2.12.5) weiterverwendet.

2.2.12.2 Coomassie-Färbung

Lösungen: Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassieblau, 10% (v/v) Essigsäure, 50 % (v/v) Methanol in H₂O_{bidest} und filtriert.

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Methanol in H₂O_{bidest}.

Das Gel wurde nach Beendigung der Elektrophorese mit Färbelösung für 1 Stunden inkubiert, danach mehrfach mit Entfärbelösung gewaschen und schließlich zwischen zwei Cellophanblättern getrocknet.

2.2.12.3 Silberfärbungen eines SDS-Gels

Die Silberfärbung wird bereits seit 1972 eingesetzt und dient zur hochsensitiven Detektion von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen. Die Methode zeichnet sich durch eine niedrige Nachweisgrenze (ca. 5 ng je Proteinbande, wodurch sie über 40-fach empfindlicher ist als die Coomassie-Färbung) und einen hohen Kontrast aus. Bei der Silberfärbung bilden Ag^+ -Ionen mit den Aminosäureseitenketten Glu, Asp und Cys bei pH-Werten über 10,5 Komplexe aus. Durch den Zusatz von Formaldehyd wird die Ag^+ der Komplexe zu metallischem Silber reduziert.

Lösungen für die Silberfärbung:

Fixierlösung:	40%	Ethanol (v/v)
	10 %	Essigsäure (v/v)
Entwicklungslösung:	3 %	Natriumkarbonat (w/v)
	0,05 %	Formaldehyd (v/v)
	0,0004 %	Natriumthiosulfat (w/v)

Schritt	Verwendete Lösung
Fixieren	40 % Ethanol + 10 % Essigsäure in A. dest
Waschen	30 % (v/v) Ethanol
Waschen	H_2O bidest
Sensibilisierungslösung:	30 % Ethanol + 0,5 ml/ 100 ml Glutaraldehyd (25 %) + 4 ml/ 100 ml Natriumthiosulfat (5 %) + 6,8 % Natriumacetat in A. dest
Waschen	H_2O bidest
Silbernitratlösung	0,2 % Silbernitrat, 40 μl /100 ml Formaldehyd (37 %) in A. dest
Waschen	H_2O bidest

Entwickellösung	2,5 % Natriumcarbonat, 20 µl/100 ml Formaldehyd (37 %)
	in A. dest
Waschen	H ₂ O bidest
Stoplösung	0,5 % (w/v) Glyzin
Waschen	H ₂ O bidest

Die Durchführung:

Das Polyakrylamidgel wurde für 1 h in Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal für je 20 min. mit 30 % (v/v) Ethanol und einmal für 20 min. mit H₂O bidest gewaschen. Nach Inkubation für 1 min. in Sensibilisierungslösung und dreimaligem kurzem Waschen mit H₂O bidest erfolgte die Färbung für 20 min. mit 0,2 % (w/v) Silbernitrat-Lösung. Das Gel wurde dreimal mit H₂O bidest gewaschen, 5 min. unter optischer Kontrolle in Entwicklungslösung inkubiert und zweimal für 1 min. zur langsamen Nachentwicklung mit H₂O bidest gewaschen. Das Gel wurde zum Beenden der Entwicklungsreaktion für 5 min. in 0,5 % (w/v) Glyzin inkubiert, 30 min. mit H₂O bidest gewaschen und in 10 % (v/v) Glycerin gelagert.

2.2.12.4 Ponceau-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen und um bei nicht vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern die Banden zu markieren, wurde die Membran 1-5 min mit Ponceau S angefärbt. Durch kurzes Waschen in TBS mit 0,5 % Tween 20 wurde der Hintergrund entfärbt. Der Farbstoff wurde anschließend durch Waschen der Membran in TBS mit 0,5 % Tween 20 entfernt.

Ponceau Färbelösung: 0,05 % Ponceau-S, Sigma
1% Acetat

2.2.12.5 Western Blot Analyse von Proteinen

Lösungen: Transferpuffer: 25 mM TRIS Base
 192 mM Glycin

		1% SDS
		Aqua dest. ad 1000 ml
	Blockierlösung:	Rotiblock-Lösung (1:10 mit H ₂ O verdünnt)
Material:	PVDF-Membran:	„ <i>pure nitrocellulose</i> “ (Fa. Pall)
Antikörper:		Anti-GST Antikörper speziesspezifischen Antikörper
Reagenzien:	Naphthol-Lösung	Naphthol AS-MX-Phosphat
	Fast Red-Lösung	Fast Red-TR-Hemi-(Zinkchlorid)-Salz
	Tris-Lösung	0,2M Tris; 2 mM MgCl ₂
Geräte:		<i>Tank Blot</i> -Apparatur

Bei dieser Methode werden Proteine, die zuvor in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend immunologisch detektiert.

In diesem Fall wurde das *Tank Blotting*-Verfahren durchgeführt. Dafür werden die in dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran transferiert. Vier Whatman-Papiere sowie die Nitrocellulosemembran wurden auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Dabei muss die Membran zuvor für 2-3 min in Methanol aktiviert werden, um sie so hydrophob zu machen. Der Elektrotransfer der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran wird bei 4 °C für 1h bei einer Spannung von 100 V in einer *Tank Blot*-Apparatur durchgeführt. Um die Immunfärbung vorzubereiten werden die noch freien Bindestellen der Membran mit Hilfe von 1 x konz. Roti-Block-Puffer bei 37 °C für 1 h blockiert. Die Membran wird dreimal für je 5 min in ca. 20 ml Waschpuffer bei Raumtemperatur (RT) gewaschen. Die Immunfärbung der auf eine PVDF-Membran geblotteten Proteine beruht auf der Bindung eines proteinspezifischen Primär-Ak, für dessen Nachweis ein speziesspezifischer, enzymkonjugierter Sekundär-Ak eingesetzt wird. Die für diese Arbeit verwendeten Sekundär-Ak waren AP-konjugiert. Die Membran wird in den Multiscreen-Apparat eingespannt. Jeder Kanal wird dreimal unter Verwendung von je 600 µl Waschpuffer gewaschen. Die Probandenserien werden im Verhältnis 1:30 mit Konjugatpuffer verdünnt und die Kontrollserien im Verhältnis 1:500. Von diesen Verdünnungen werden jeweils 520 µl in den dafür bestimmten Kanal pipettiert. Die Erst-Antikörperinkubation wird bei 37 °C für 1 h durchgeführt. Danach wird erneut

dreimal für je 5 min gewaschen. Die Zweit-Ak-Inkubation wird auch bei 37 °C für 1h mit speziesspezifischen AP-konjugierten IgG-(Fc)-Ak im Verhältnis 1:3000 mit Konjugatpuffer durchgeführt. Als nächstes wird der Waschschrift wie oben beschrieben wiederholt. Die Färbelösung wird immer frisch angesetzt. Dazu werden 4 mg Naphthol *AS-MX*-Phosphate in 10 ml Milliporewasser gelöst. Weiterhin werden 6 mg Fast Red-TR in 10 ml Tris- MgCl₂ Puffer mit MgCl₂ gelöst. Beide Lösungen werden gleichzeitig auf die Membran gegeben und dabei leicht geschwenkt. Anschließend wurde 2-10 min die Farbentwicklung durch Waschen der Membran in Wasser gestoppt.

2.2.13 ELISA (*Enzym-gestützter Immunbindungstest, Enzyme-linked Immuno-Sorbent Assay*)

Die ELISA Methode ist die heute am meisten verwendete Methode für die Bestimmung von Antikörpern und wird in dieser Arbeit eingesetzt zur Bestimmung der Anti-M-Protein-Antikörper.

Zum Nachweis bzw. für die Messung spezifischer Antikörper im Serum wird besonders der indirekte ELISA eingesetzt, bei dem gereinigtes Antigen an eine Mikrotiterplatte aus Polystyrol als feste Phase absorbiert wird. Bei Zugabe von Serum mit kompatiblen Antikörpern kommt es zur kovalenten Antigen-Antikörper-Bindung. Durch einen Waschvorgang wird ungebundenes Material entfernt. Es folgt die Zugabe von mit Enzym gekoppelten, gegen den ersten spezifischen Antikörper gerichteten Immunglobulinen (Konjugat). Nach einer bestimmten Inkubationszeit folgt ein weiterer Waschvorgang, um überschüssiges Konjugat zu entfernen. Zugefügtes Substrat wird vom Konjugat-gekoppelten Enzym umgesetzt, was als Farbreaktion sichtbar wird. Die Farbintensität dieser Reaktion kann photometrisch gemessen werden und ist proportional der Konzentration an Antikörper (Bestimmung der optischen Dichte-OD oder des Prozentsatzes der optischen Dichte-PP).

2.2.13.1 Bestimmungen der Antigenkonzentration und des Kopplungspuffes für einen indirekten ELISA

Eine optimale Konzentration des benutzen rekombinanten M-Proteins entsprach den von Briese et al. (1995) beschriebenen Angaben. Für diese optimale Konzentration wurden 10 ng/100 µl per Kavität des M-Proteins hineinpipettiert.

Lösungen	Kopplungspuffer	0.02 M PBS pH 7.2 0.1 M CO ₃ pH 9.5
Antigen	rec p16 Protein	10 ng/100µl
Geräte	ELISA-Washer SLT Tecan 96 PW (Fa. Tecan) Multikanalphotometer SLT Spectra (Fa. Tecan) Mikrotiterplatten MaxiSorp F96 Immuno Module	

Um den optimalen Kopplungspuffer zu finden, wurde die Blockierung mit Rotiblock[®] in einer Verdünnung 10 ml Rotiblock[®] + 90 ml A. bidest durchgeführt. Von dieser Lösung 100 µl in jede Kavität pipettieren. Anschließend wurde 100µl verschiedene Kopplungspuffer (0.02 M PBS, pH 7.2, versus 0.1 M CO₃, pH 9.5) per Kavität bei 4 °C, übernacht inkubiert. Pro Mikrotierplatte wurden insgesamt 10 ml Volumen benötigt. Die Auswertung erfolgte mit der Messung der Absorptionswerte bei $\lambda = 405$ nm im Multikanalphotometer.

2.2.13.2 Probandenserien

2.2.13.2.1 Tierseren

Alle Seren von Pferden (211 Seren) und Katzen (26 Seren) wurden von Herrn Professor Dr. H. Ludwig, Institut für Virologie, Freie Universität, Berlin zur Verfügung gestellt. Der Anteil symptomfreier Pferde wurde mit 65 % angegeben und 35 % der Seren stammten von Pferden mit Symptomen (Bewegungsstörung, Verhaltensänderung, Kopfschütteln). Bei Katzen stammten 43 % der Seren von symptomatischen Tieren und 57 % von symptomfreien.

2.2.13.2.2 Humanseren

Die Humanseren (130 Seren) wurden von Frau Priv. Doz. Dr. Liv Bode, Robert Koch Institut (RKI) zur Verfügung gestellt und stammten aus dem Virchow-Klinikum Berlin.

2.2.13.3 Optimale Serumverdünnungen

Gerät	Multikanalphotometer SLT Spectra (Fa. Tecan) ELISA-Washer SLT Tecan 96 PW (Fa. Tecan)
Waschpuffer	TBS-T, pH 8,0: 2,4 g Tris; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,5 g Tween 20; pH 8,0 mit HCl; <i>ad</i> 1 l H ₂ O bidest.
Serum	RD58 (Anti-BDV-Serum Kaninchen). RD65 (Anti-BDV-Serum Kaninchen). RKI-Nr. 25867 (humane Serum) AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Fc-Fragment- spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories. AffiniPure Goat Anti- Human IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories.
Antigen	rec p16

Zur Bestimmung der optimalen Serumverdünnung wurden folgende zwei BDV-positive Serum und ein negatives Serum verwendet. Die Verdünnung wurde von 1:2 bis zu einer Verdünnung von 1:64 eingesetzt. Für die optimale Serumverdünnung wurden jede Kavität einer Mikrotiterplatte mit Ausnahme der Leerproben mit 10 ng recp16 per Kavität mit 100 µl Serum, 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl AP-konjugierten anti-Kaninchen-IgG(Fc)-Antikörpern (1:3000 in TBS-T, pH 8.0) in jede Kavität, mit Ausnahme der Leerproben, wurde die Platte für 1 h bei 37 °C inkubiert und dreimal mit Waschlösung gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Substratlösung in alle Kavitäten wurde die Farbreaktion nach ca. 3-5 min unter optischer Kontrolle mit 50 µl 3 M NaOH-Lösung gestoppt. Die Auswertung erfolgte mit der Messung der Absorptionswerte bei $\lambda = 405$ nm im Multikanalphotometer.

2.2.13.4 Kreuzreaktionen gegen mögliche Kontaminanten

Die Kreuzreaktionen der verwendeten Kontrollen Serums gegen mögliche Kontaminanten wurden mittels einer Mikrotiterplatte mit GST Proteinen und Rotiblock[®] analysiert. Eine induzierte Expressionsplasmid pGEX-6P-2 transformierte *E.coli*-Kolonie, die kein Insert (p16) enthielt, wurde für die Expression von GST Protein verwendet. Die Expression und Purifikation wurden mittels GST Gene Fusion System (siehe 2.2.34) weiterverwendet.

2.2.14 Indirekte ELISA zum Detektion von Antikörpern in Serum verschiedener Spezies

Das Prinzip eines ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) beruht auf der hochspezifischen Wechselwirkung von Antigen und Antikörper und deren Detektion erfolgt durch einen enzymkatalysierten Farbumschlag.

Folgende drei Faktoren soll man in einen indirekten ELISA beachten:

- Die optimale Antigensverdünnung
- Die optimale Antiserumverdünnung
- Die optimale Konjugatverdünnung

Für die Bestimmung des Antikörpertiters gegen das spezifische Antigen wurde eine indirekte ELISA benutzt. Der spezifische Antikörper wird an den Antigenen gebunden. In einer zweiten Reaktion wurde ein speziesspezifischer Antikörper mit gekoppeltem Enzym hinzugegeben, welcher mit dem ersten Antikörper reagiert.

Gerät:	Multikanalphotometer SLT Spectra (Fa. Tecan) ELISA-Washer SLT Tecan 96 PW (Fa. Tecan)
Waschpuffer:	TBS-T, pH 8,0: 2,4 g Tris; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 0,5 g Tween 20; pH 8,0 mit HCl; <i>ad</i> 1 l H ₂ O bidest.
Blockierungspuffer:	Rotiblock [®]
Kontrollserum:	RD58 (Anti-BDV-Serum Kaninchen).
Probenserum:	equinen Probandenseren (211) humanen Probandenseren (130)

	katzen Probandenseren (26)
speziesspezifischen Antikörper:	AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories. AffiniPure Goat Anti-Cat IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories. AffiniPure Goat Anti-Horse IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories. AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, Fc-Fragment-spezifisches AP Konjugat Jackson Immuno Research Laboratories.
Antigen:	recp16

Für den indirekten ELISA wurden die Mikrotiterplatten mit 10 ng recp16 in Beschichtungspuffer (100 µl/Kavität) zugesetzt und die Mikrotiterplatten Übernacht bei 4°C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt und dem darauffolgenden dreimaligen Waschschrift mit Waschpuffer wurden die Mikrotiterplatten mit Rotiblock[®] (10 ml Rotiblock[®] + 90 ml A. bidest) blockiert. Die zu untersuchenden Seren wurden in einer Verdünnung 1:32 in PBS-T (100 µl/Kavität) zugegeben und die Mikrotiterplatten für 1 h bei 37°C inkubiert. Positiv- und Negativkontrolle wurden in einer Verdünnung von 1:32 im Doppelansatz mitgeführt. In die beiden Kavitäten für den Leerwert wurden jeweils 100 µl reine Verdünnungspuffer pipettiert. Anschließend wurden die ELISA-Mikrotiterplatten nochmals mit Waschpuffer dreimal gewaschen und die speziesspezifischen Antikörper (1:3000) in die Kavitäten der ELISA-Mikrotiterplatten je 100 µl pipettiert. Dann wurden die Mikrotiterplatten für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Mikrotiterplatten dreimal gewaschen und für eine Mikrotiterplatte 5 mg p-NPP-Substrattabletten in 10 ml Substratpuffer (ohne Salzzusatz) aufgelöst. Die Platte wurde bei Raumtemperatur bis zur Vermessung der optischen Dichte inkubiert. Das Stoppen der enzymatischen Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl Stopplösung (3 N NaOH) in alle Kavitäten hinzugefügt. Die Vermessung des Signals erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm.

2.2.15 Western Blot

Lösungen:	Transferpuffer:	25 mM TRIS Base 192 mM Glycin 1% SDS Aqua dest. ad 1000 ml
	Blockierlösung:	Rotiblock-Lösung (1:10 mit H ₂ O verdünnt)
Material:	PVDF-Membran:	„pure nitrocellulose“ (Fa. Pall)
Antikörper:	Primärantikörper:	RD58 (Anti-BDV-Serum Kaninchen) humanes Serum (RKI-Nr. 25867) Serumproben (Pferden, Katzen, Human)
	Sekundärantikörper:	Anti-Horse IgG Anti-Human IgG Anti-Cat IgG Anti-Kaninchen IgG
Reagenzien:	Naphthol-Lösung	Naphthol AS-MX-Phosphat
	Fast Red-Lösung	Fast Red-TR-Hemi-(Zinkchlorid)-Salz
	Tris-Lösung	0,2M Tris; 2 mM MgCl ₂
Geräte:		Tank Blot-Apparatur

Mit dem Western-Blot können sehr geringe Mengen eines bestimmten Antikörpers gegen M-Protein bei Serumproben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des ELISA wurde in einen Bestätigungstest auf Western Blot reproduziert und bestätigt. Der Western Blot wurde mittels der bereits beschriebenen Methodologie (siehe 2.2.12.5) durchgeführt.

2.2.16 N-terminale Aminosäure-Bestimmung (Edman-Abbau)

Der Edman-Abbau ist eine von Pehr Edman entwickelte Methode zur Sequenzierung von Aminosäuren in einer Peptid-Kette durch wiederholte Endgruppen-Bestimmung (Edman P, 1949). Die Peptidkette wird dabei schrittweise am N-Terminus abgebaut. Durch Zugabe von Phenylisothiocyanat (PITC) in einem basische Milieu (pH 8,0) wird die N-terminale Aminosäure (AS) des Peptids markiert als ein Phenylthioharnstoff-Derivat. Nach Herstellung eines sauren Milieus durch Trifluoressigsäure wird die

Peptidbindung hinter dieser PITC-markierten N-terminalen Aminosäure gespalten. Unter diesen schwach sauren Bedingungen wird nur die endständige Aminosäure als zyklisches Derivat abgespalten, ohne dass der Rest des Peptids hydrolysiert wird. Die Reaktionsprodukte sind die endständige, zyklisierte Phenylthiohydantoin-Aminosäure (PTH-AS) und das Restpeptid. Dieser Degradationszyklus lässt sich nun mit dem Restpeptid mehrfach wiederholen und automatisieren. Mittels HPLC-Analyse lassen sich nun die jeweiligen PTH-AS und somit die AS-Sequenz N-terminal bestimmen.

Allerdings sind nur ungefähr 20 Zyklen möglich, da die PTH-AS-Abauprodukte aus den vorangegangenen Zyklen das Reaktionsgemisch dermaßen verunreinigen, dass nur noch schwerlich nachvollziehbar ist, welche PTH-AS in dem aktuellen Zyklus (*subsequent cycle*) abgespalten wurde oder welche von vorherigen Zyklen (*prior cycles*) stammen. Dadurch ist die Grenze dieser Sequenzierungsmethode erreicht, was jedoch für eine N-terminale Ansequenzierung zur Peptididentifizierung vollkommen ausreichend ist.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung des für das M-Protein kodierenden Gens mittels RT-PCR

Um die starke phylogenetische Beziehung in der Sequenz des M-Proteins zu beobachten, wurden mit drei M-Genfragment von verschiedenen Spezies gearbeitet. Die für das M-Protein kodierende DNA von BDV Stämmen, die aus verschiedenen Spezies isoliert wurden (V: Laborstamm; Hu-H₂: Mensch; Eq. A24: Pferd) wurde mittels RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) generiert. Zu diesem Zweck wurde ein Primer-Paar angewandt, welches die 5' bzw. 3' Enden des M-Protein Gens flankiert. Gesamt-RNA aus infizierten OL/TL-Zellen diente als Template der cDNA-Synthese. Mit den gewählten Primern konnte, aus Zellen, die mit den verschiedenen Stämmen infiziert waren, ein PCR-Produkt amplifiziert werden, das der Größe des M-Genfragment entspricht (460 Basenpaaren), und somit ein Fragment des ORF III wiedergibt (Abbildung 1). Die Spezifität des Amplifikates lässt sich dadurch bestätigen, dass in der Probe, die als Negativkontrolle diente, kein PCR-Produkt zu erkennen war. Zusätzlich zu dem PCR-Produkt von M-Protein cDNA wurden keine kleineren Fragmente amplifiziert, was darauf hinweist, dass keine unspezifischen PCR-Produkte in der Reaktion vorhanden sein sollten. Die Größe (der positiven Banden) wurde über den Vergleich mit dem Marker *Ready-Load 100 bp DNA Ladder* bestimmt. Dies gibt ein Fragment des ORF III wieder.

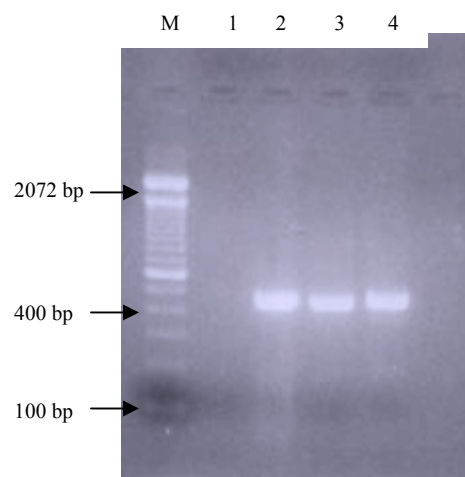


Abbildung 1. Nachweis der Amplifikation der Matrixprotein-cDNA 460 bp in Agarose-Gel-Elektrophorese. Die RT-PCR-Produkte wurden auf ein 4%iges Agarosegel zusammen mit dem Marker *Ready-Load 100 bp DNA Ladder* (M); Spur 1 = no template control (NTC); Spur 2 = cDNA Stamm V; Spur 3 = cDNA Stamm Hu-H₂; Spur 4 = cDNA Stamm Eq. A24.

3.1.1 Ermittlung der Identität des RT-PCR-Amplifikates mittels Sequenzierung

Die Größe der per RT-PCR amplifizierten Fragmente deutet darauf hin, dass es sich um die cDNA des M-Proteins handelt. Allerdings soll die Identität dieser Produkte verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde die direkte Sequenzierung der PCR-Amplifikate durchgeführt.

Die Ergebnisse aus der Sequenzierung wurden mit den in der Datenbank BLAST niedergelegten Sequenzen verglichen, und ergab die Bestätigung, dass es sich bei diesem Amplifikat eindeutig um die M-Protein Sequenz von jedem BDV Stamm handelt. Mit Hilfe des Programms MegAlign konnte die Homologie der drei Sequenzen bestimmt werden (Abbildung 2).

str.V	atg	aat	tca	aaa	cat	tcc	tat	gtg	gag	ctc	aag	gac	aag	gta	atc	gtc	cct	gga	tgg	ccc	aca	ctg	atg	ctt	gag	ata	gac	ttt	gta	ggg	ggg	
	M	N	S	K	H	S	Y	V	E	L	K	D	K	V	I	V	P	G	W	P	T	L	M	L	E	I	D	F	V	G	G	
HU_H2
eq.A24
str.V	act	tca	cgg	aac	cag	ttc	ctt	aac	atc	cca	ttt	ctt	tca	gtg	aaa	gag	cct	ctg	cag	ctt	cca	cgc	gag	aag	aag	ttg	acc	gac	tac	ttt	act	
	T	S	R	N	Q	F	L	N	I	P	F	L	S	V	K	E	P	L	Q	L	P	R	E	K	K	L	T	D	Y	F	T	
HU_H2	agg	
	R	
eq.A24
str.V	att	gac	gta	gaa	cca	gca	ggt	cat	tcc	ctg	gtc	aat	ata	tac	ttc	cag	att	gac	gac	ttc	ttg	ctc	cta	aca	ctc	aac	tca	cta	tct	gtg	tac	
	I	D	V	E	P	A	G	H	S	L	V	N	I	Y	F	Q	I	D	D	F	L	L	L	T	L	N	S	L	S	V	Y	
HU_H2	ggc	tat	
eq.A24	ggc	tat	
str.V	aag	gac	ccg	att	aga	aaa	tac	atg	ttc	cta	cgc	ctc	aac	aag	gac	cag	agc	aag	cac	gca	atc	aat	gca	gcc	ttc	aat	gtc	ttt	tct	tat	cgg	
	K	D	P	I	R	K	Y	M	F	L	R	L	N	K	D	Q	S	K	H	A	I	N	A	A	F	N	V	F	S	Y	R	
HU_H2	agg	gaa	gct	
	agg	E	gct	
eq.A24	agg	E	gct	
str.V	ctt	cgg	aac	att	ggt	ggt	ggc	cct	ctc	ggc	ccg	gac	att	cga	tct	tca	ggg	cct	t													
	L	R	N	I	G	V	G	P	L	G	P	D	I	R	S	S	G	P	X													
HU_H2	
eq.A24	

Abbildung 2. Vergleich der Nukleotid- und der korrespondierenden Aminosäuresequenzen des Matrixproteins der Stämme Hu-H₂ und Eq.A24 mit dem bereits publizierten BDV-Referenzstamm Str. V (Briese et al., 1994). Bei den Stämmen HU-H₂ und eq.A24 sind die stillen Mutationen als Tripletts dargestellt (nt 64, 90, 183, 207, 227, 294, 351) und einer echten Mutation als kodierte Aminosäure in der Peptidsequenz (nt 324 mit aa 108, D→E). Beim Stamm Hu-H₂ existiert zusätzlich noch eine weitere echte Mutation mit Aminosäureaustausch: nt 167 mit aa 56 (K→R).

Die Sequenzierung des Matrixproteins von BDV, amplifiziert aus dem Stamme V, Hu-H2 und Eq. A24, zeigte eine hohe phylogenetische Homologie zu dem von einem erkrankten Pferd stammenden Referenzstamm, Stamm V. Der Vergleich von Stamm V mit Hu-H2 zeigte 7 stille Mutationen und 2 veränderte Aminosäuren, während die Sequenzen des Eq. A24 7 stille Mutationen und eine veränderte Aminosäure zeigte. Die Genomsequenzen unterscheiden sich also jeweils um weniger als 2.1 % (Hu-H2) und 1.9 % (Eq. A24) (Tabelle 1).

Stamm	Rang (%) von:
	Divergenz der Sequenzen in Vergleich mit Stamm V
Hu-H2	2.1
Eq. A24	1.9

Tabelle 1. Prozentuale Divergenzen der Sequenzen von Hu-H2 und Eq. A24 auf Nukleotidebene im Vergleich zu der Sequenz des Stamm V.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass sich die drei Proteine auf Aminosäureebene kaum unterschieden (aa 108: D → E). Aus diesem Grund wurde mit der cDNA des M-Proteins vom Stamm Eq. A24 weitergearbeitet.

3.2 Klonierung, Expression und Aufreinigung des M-Proteins mit einem prokaryotischen Expressionssystem.

In früheren Arbeiten konnte es gezeigt werden, dass das M-Protein in prokaryotischen Zellen (*E.coli*) als lösliches Protein vorliegt. Der erste Ansatz zur Expression der M-Proteine von BDV war die Etablierung eines bakteriellen Expressionssystems. Um rekombinantes M-Protein vom Stamm Eq. A24 in *E. coli* darstellen zu können, wurde die cDNA in den bakteriellen Expressionsvektor pGEX-6P-2 kloniert. Mit diesem Vektor wird das klonierte Gen als Fusionsprotein am C-Terminus der Glutathion S-Transferase (GST) exprimiert. Die GST erhöht die Löslichkeit des zu exprimierenden Proteins, und aufgrund ihrer hohen Affinität zu Glutathion erlaubt sie die spätere Affinitätsreinigung durch immobilisiertes Glutathion. Dann kann das exprimierte Protein von GST abgespaltet werden, da sich eine Spaltsstelle für die PreScission-Protease direkt nach GST befindet. Die Protease bleibt an GST gebunden und kann aus dem gespaltenen Protein über eine Glutathion-Matrix entfernt werden. Die durch PCR gewonnene cDNA wurde mit Restriktionsenzymen verdaut und in den pGEX-6P-2 ligiert, der genauso behandelt wurde. Da sich die „multiple cloning site“ in diesem

Vektor direkt nach GST befindet, soll das M-Protein als Fusionsprotein am C-Terminus von GST, nach Induktion der Proteinexpression, exprimiert werden.

3.2.1 Expression vom Matrixprotein des Stamms Eq. A24 mit dem GST-Gene-Fusion-System.

Mit dem erhaltenen Plasmid wurden dann *E. coli* Bakterien, Stamm *BL21(DE3)* transformiert. Dieser Stamm bringt verschiedene Vorteile, die zu einer erfolgreichen Proteinexpression beitragen. *BL21(DE3)* Zellen fehlen bestimmte Proteasen, was die Stabilität des rekombinanten Proteins erhöht. Andererseits enthält dieser Stamm ein Plasmid, welches für prokaryotischen Zellen selten auftretende tRNAs kodiert.

Die Expression des GST-Fusionsproteins wurde durch Zugabe von 0,1 M IPTG induziert und bei 30 °C während 3 h durchgeführt. Durch eine PreScission-Protease wurde das Protein dann von der Glutathion-S-Transferase getrennt und kann dann mittels geeigneter Waschpuffer von der Säule eluiert werden. Anschließend wurden die Bakterien vom Überstand durch Zentrifugation abgetrennt.

3.2.1.1 Reinigung rekombinanter Fusionsproteine

Zuerst wurde bestimmt, ob sich das exprimierte Protein in der nicht löslichen oder löslichen Fraktion befindet. Zu diesem Zweck wurden die pelletierten Bakterien beschalt um die zelluläre Wand aufzuschließen. Anschließend wurden die im Überstand vorhandenen löslichen Proteine von den Unlöslichen durch Zentrifugation abgetrennt. Ein Aliquot jeder Fraktion wurde im Western Blot mit einem anti-GST mAk analysiert und es wurde festgestellt, dass etwa 80% des Proteins löslich blieb. Die lösliche Eigenschaft des Fusionsproteins ermöglichte die Reinigung unter nativen Bedingungen, die die Interaktion der GST mit dem Glutathion begünstigen.

Das Fusionsprotein wurde dann aus dem löslichen Material über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierbei wurde mit dem Lysat eine Glutathion-Sepharose-4-Fast Flow-Säule beladen und Kontaminationen mit bakteriellen Proteinen wurden durch mehrere Waschschrte entfernt. Anschließend erfolgte die Elution des GST-Matrixproteins von der Matrix durch Zugabe von Glutathion. Die Proteine aus

einem Aliquot jeder Fraktion und vom Durchfluss wurden in SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt (Abbildung 3). In dem Durchfluss war kein Protein in der Größe des GST-M Proteins erkennbar. Das deutet darauf hin, dass die im Lysat vorhandene Proteinmenge vollständig an die Glutathion-Matrix gebunden hat. Nachdem die Säule gewaschen wurde, konnte ein Protein eluiert werden, dessen Molekulargewicht dem von einem GST-M Protein Fusionsprotein entspricht (43 kDa).

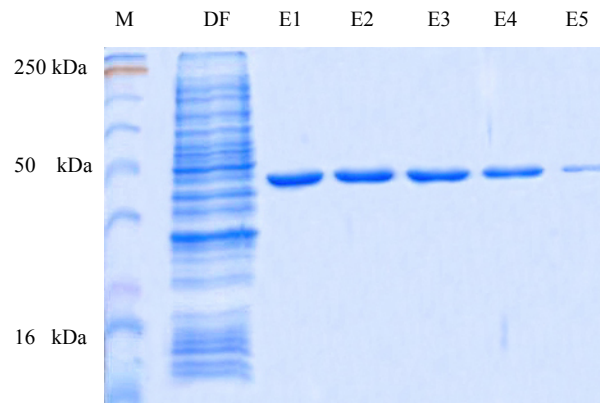


Abbildung 3. Visualisierung der Reinigung der Expressionsprodukte von GST-p16 Fusionsproteinen mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. (M) Marker SeeBlue[™]Plus2; (DF) Durchflussfraktion; (E1-E5) Eluate.

Um die Identität des gereinigten Proteins zu überprüfen, wurden die mit Coomassie Blau gefärbten Proben mit einem anti GST monoklonalen Antikörper im Western Blot getestet. Eine positive Reaktion des ersten Antikörpers wurde durch einen anti Spezies Antikörper nachgewiesen, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Der anti-GST Antikörper erkannte ein Protein in jeder Fraktion, die in der Höhe des kalkulierten Molekulargewichtes (43kDa) des GST-M-Proteins aufgetrennt wurde (Abbildung 4). In der Probe vom Durchfluss ist kein Signal zu sehen, was die Ergebnisse der Coomassie Färbung bestätigen. Da keine kleineren Produkte erkennbar sind, ist davon auszugehen, dass keine Degradation des gereinigten Proteins stattfindet.

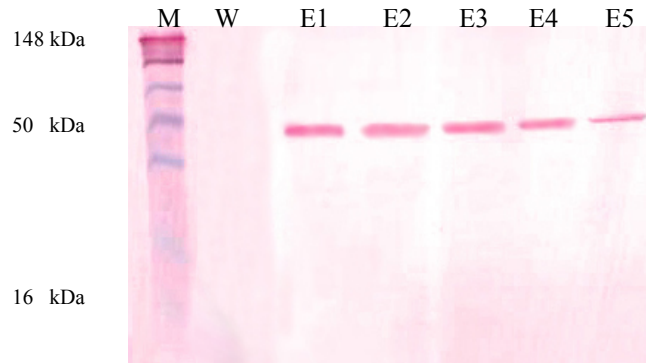


Abbildung 4. Western Blot Analyse von Fraktionen aus der Reinigung vom GST-M Protein mit anti-GST-monoklonalem Antikörper. (M) Marker SeeBluetmPlus2; (W) Durchflussfraktion; (E1-E5) Eluate.

Die Fraktionen 1 bis 5 wurden vereinigt und das Protein wurde dann mit der PreScission Protease inkubiert um die GST vom M Protein zu trennen. Die PreScission-Protease und die freie GST wurden dann über eine Gluthation Matrix entfernt. Im Durchfluss soll sich nur das gesplattene M Protein befinden. Die Färbung von Proteinen mit Silbernitrat ist um Faktor 20 empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Ein Aliquot vom gereinigten M Protein nach der Protease Spaltung wurde in SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Silbernitrat angefärbt (Abbildung 5). Nachdem die Reaktion mit Silbernitrat gestoppt wurde, war nur die Bande des gereinigten M Proteins zu sehen. Somit konnte die Anwesenheit von GST und Protease in dem Präparat ausgeschlossen werden. Die Integrität des M-Proteins wurde auch erhalten, da keine Abbauprodukte beobachtet wurden. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Protein-Assays bestimmt, und betrug 0,2 µg/ml. Mit dem etablierten Proteinexpressions- bzw. -reinigungssystem konnten 2 mg aus 1 Liter Bakterienkultur gewonnen werden.

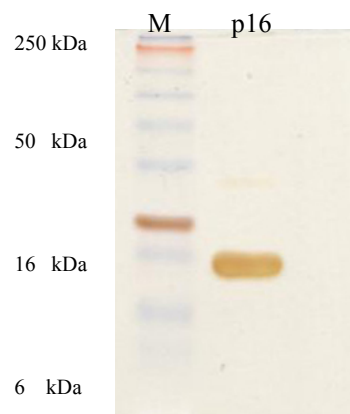


Abbildung 5. Silberfärbung des Matrixproteins nach Spaltung mit PreScission Protease. (M) Marker SeeBluetmPlus2; (p16) Matrixprotein.

3.2.1.2 N-terminale Aminosäure-Bestimmung des recM-Fusionsproteins (Edman-Abbau)

Für die Durchführung dieser Analyse wird der Arbeitsgruppe E/(H) ein großer Dank ausgesprochen, besonders Herrn Dr. Werner Schröder, Institut für Chemie und Biochemie - Biochemie, Freie Universität Berlin Thielallee 63, Raum 225, 14195 Berlin.

Zur vollständigen Bestätigung, dass das GST/BDV-recM-Fusionsprotein tatsächlich das erwünschte Peptidprodukt ist, wurde das gereinigte Produkt der automatisierten Edman-Degradation mit anschließender HPLC-Analytik unterzogen. Diese Analyse wurde unter Mithilfe des Instituts für Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Abbildung 6 zeigt das Ergebnis der N-terminalen Ansequenzierung. Dabei wurden die ersten 11 Aminosäuren des BDV-M-Proteins identifiziert (MNSKHSYVELK), wobei die unterstrichenen Aminosäuren eindeutig in dem HPLC-Chromatogramm zu identifizieren waren. Die vorangehenden 5 Aminosäuren stammen C-terminal als Fusionsteil vom GST-Protein nach der PreScission-Hydrolyse und Säulenreinigung. Von diesem Fusionsanteil (GPLGS) sind wiederum die unterstrichenen Aminosäuren eindeutig identifizierbar.

Das rekombinant dargestellte Protein kann somit exakt als BDV-M-Protein nachgewiesen und für alle weiteren diagnostischen Untersuchungen benutzt werden.

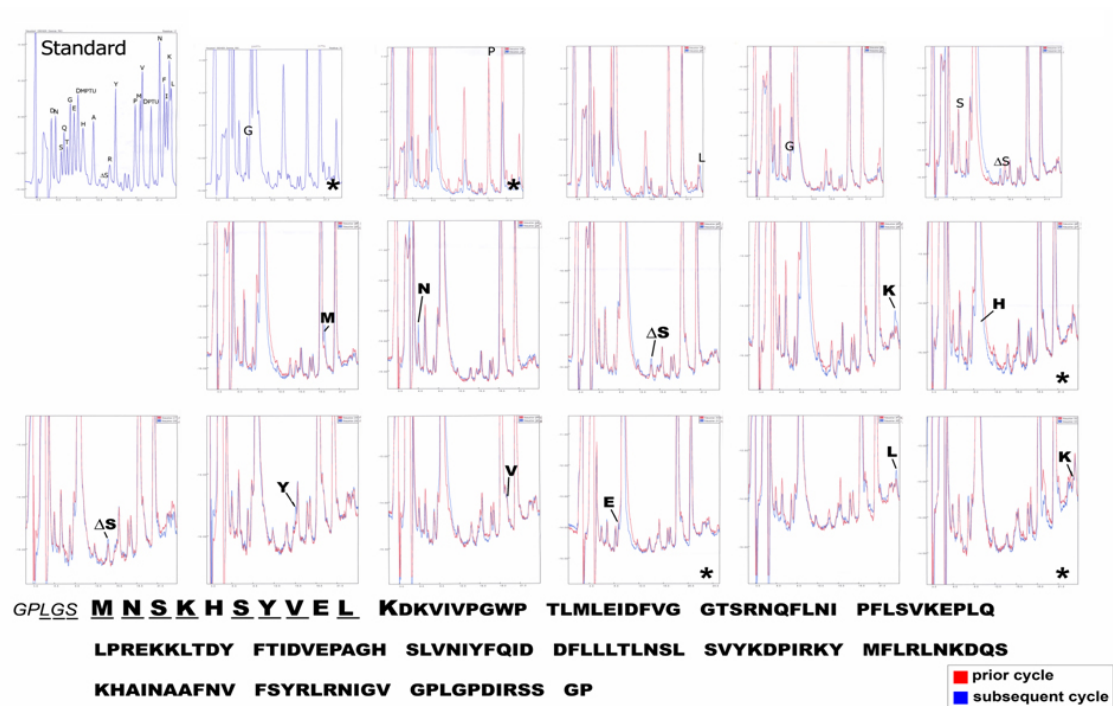


Abbildung 6. Automatisierte, N-terminale Edman-Degradation mit anschließender HPLC-Analytik der hydrolysierten Aminosäurederivate des gespaltenen und gereinigten GST/rec-M-Fusionsproteins als ORF III-Expressionsprodukt des BDV-Stammes Eq.A24. Die N-terminal identifizierte Aminosäuresequenz ist GPLGS MNSKHSYVELK, wobei der Anteil in Fett- und Großdruck vom M-Protein stammt. Der Anteil an Fett- und Kleindrucktem ist der Fusionsanteil vom GST. Nur die unterstrichenen Aminosäurereste konnten eindeutig im Chromatogramm identifiziert werden. Die mit * versehenen Chromatogramme zeigen nicht eindeutig zuweisbare Aminosäurereste.

3.3 Antikörpernachweis im indirekten Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (indirekte ELISA)

Der indirekte ELISA stellt eine spezifische und sensitive serologische Methode zur Charakterisierung der Seroprävalenz bei einer BDV-Infektion verschiedener Tierspezies und des Menschen dar (Briese *et al.*, 1995). In einer BDV-Infektion ist das virale Protein p16 an den ersten Schritten des Infektionsprozesses beteiligt. Das M-Protein spielt zusammen mit dem Protein G (p57) eine entscheidende Rolle bei der Induktion von virusneutralisierenden Antikörpern. Um diese Antikörper in Seren von verschiedenen Spezies nachzuweisen, wurde ein indirekter ELISA entwickelt, bei dem die Fläche einer mit 96 Vertiefungen bestückten Platte mit hoher Bindungsfähigkeit mit BDV rekombinantem M-Protein (recp16) beschichtet wird. Die im Serum vorhandenen und gegen dieses Protein gerichteten Antikörper werden gebunden und können in einem

nächsten Schritt über den mit enzymkonjugiertem (alkalischer Phosphatase) sekundären Antikörper mittels eines Substratumsatzes detektiert werden. Die geeigneten Bedingungen für den spezifischen Nachweis der Antikörper mussten erst optimiert werden. Anschließend wurde der indirekte ELISA eingesetzt, um die Seroprävalenz von anti M-Protein Antikörpern bei verschiedenen Mammalier-Spezies zu bestimmen, die eine natürlicher Bornavirus Infektion aufweisen.

3.3.1 Optimale Antigenkonzentration und Kopplungspuffer.

Bei der Optimierung eines ELISAs stellen die Antigenkonzentration und der Kopplungspuffer zwei wichtige Parameter dar. Das gereinigte M-Protein wurde in einer Konzentration von 10 ng/100 µl per well benutzt. Die optimale Konzentration des benutzten Proteins entsprach der von Briese et al. (1995) beschriebenen. Mit dieser Konzentration, wurden die M-Proteine erfolgreich in dem ELISA angewandt. Da der Kopplungspuffer einen direkten Einfluss auf die Adsorption des Proteins hat, wurden zwei Kopplungspuffer getestet, die sich sowohl in ihrer Zusammensetzung als auch in ihrem pH Wert unterscheiden, nämlich 0.02 M PBS (pH 7.2) und 0.1 M Carbonat (pH 9.5). Der Einfluss vom Kopplungspuffer auf die Adsorption des rekombinanten Proteins war sehr gering. Allerdings wurde das rekombinante M-Protein in 0.02 M PBS (pH 7.2) verdünnt, da der Kopplungspuffer 0.1 M Carbonat (pH 9.5) einen leicht höheren Hintergrund zeigte als die Verdünnung in 0.02 M PBS (pH 7.2) (Abbildung 7).

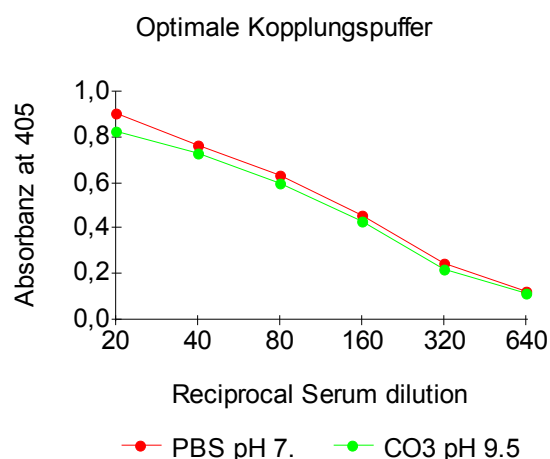


Abbildung 7. Einfluss von verschiedenen Kopplungspuffern (0.02 M PBS pH 7.2; 0.1 M Carbonat pH 9.5) und pH auf die Adsorption des Antigens.

3.3.2 Bestimmung des „Cut-off“-Wertes des indirekten ELISAs.

Bei dem „Cut-off“ eines indirekten ELISAs zur Antikörperdetektion handelt es sich um den OD Wert ab dem eine Probe als positiv eingestuft wird. Zur Bestimmung des „Cut-offs“ wurden ein BDV-Antikörper-negatives Serum und zwei -positive Seren eingesetzt. Der OD Wert, von der höchsten Verdünnung bei der sich beide Seren eindeutig unterscheiden soll den „Cut-off“ dieses Tests darstellen. Auf diese Weise soll die unspezifische Bindung, sog. Hintergrund, von Antikörpern reduziert werden. Die Seren von Kaninchen, Katze, Mensch und Pferd zeigten ähnliche Hintergrundwerte bei anderen bereits etablierten serologischen Tests (Bode *et al.*, 1995). Aus diesem Grund, wurden Kaninchen Seren genommen, die gut charakterisiert waren, um eine geometrische Verdünnungsreihe durchzuführen. Die gebundenen Antikörper wurden mit dem entsprechenden sekundären Antikörper nachgewiesen. Die ODs der Seren zeigten die typische Sigmoidalkurve in der Titration der positiven Seren. Das Serum RD65 zeigte eine geringere Reaktivität als das Serum RD58 und einen höheren Hintergrund (Abbildung 8).

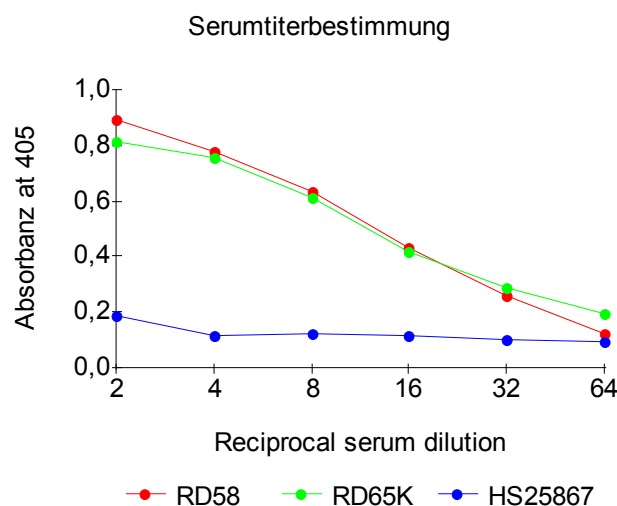


Abbildung 8. Bestimmung des „Cut-offs“ mittels geometrischer Verdünnung von positivem und negativem Serum. (RD58) Positives Serum; (RD65K) Positives Serum und (HS25867) Negatives Serum.

Bei der Verdünnung 1:32 zeigte sich immer noch eine deutliche Unterscheidung zwischen dem negativen Serum und den zwei positiven. Aus diesem Grund wurden Seren mit einer $OD \geq 0,25$ bei einer 1:32 Verdünnung als positiv eingestuft. Die Bewertung der photometrischen Ergebnisse (Absorptionswerte) erfolgte nach folgender Tabelle 2.

Cut off: 0,12 Extinktion	
$\leq 0,12 = \text{negativ}$	$> 0,3 - 0,6 = ++$
$> 0,12 - 0,2 = \text{(fraglich)}$	$> 0,6 - 1,0 = +++$
$> 0,2 - 0,3 = +$	$> 1,0 = ++++$

Tabelle 2. Die Auswertung der photometrischen Ergebnisse (Absorptionswerte) erfolgte mit der Messung der Absorptionswerte bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ im Multikanalphotometer.

3.3.3 Kreuzreaktionen

Um Kreuzreaktionen der Positivseren und Negativseren gegen mögliche Kontaminanten der rekombinanten M-Proteine auszuschließen, wurden die Seren auf Reaktivität gegen die GST und das Blockierungsmittel (Rotiblock[®]) getestet. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* Bakterien mit dem Vektor pGEX transformiert und die GST aus der löslichen Fraktion gewonnen, wie es für die Reinigung vom M-Protein erfolgte. Die Fläche der Vertiefungen einer ELISA-Mikrotiterplatte wurden mit GST oder Rotiblock[®] gesättigt, beide Seren wurden 1:32 verdünnt und gegen jedes Protein getestet. Die, von dem Seren erreichten OD-Werte waren in keinem Fall höher als die OD Werte, die bei dem negativen Serum mit dem M-Protein festgestellt wurden.

3.3.4 Beschreibung der Serumproben

Sobald die Bedingungen, zur Detektion von Antikörpern mit dem ELISA Test optimiert worden waren, wurden Seren von verschiedenen mammalier Spezies untersucht. Die Proben stammten von Tieren oder Menschen, die ein klinisches Bild zeigten, das auf die Infektion mit dem Virus der Bornaschen Krankheit hinwies (z.B. chronische Müdigkeit, Persönlichkeits- und Reaktive Störungen, Depression). Von den 367 Probandenseren betrug der Anteil der equinen Probandenseren 57,5 % (211 Pferdeseren), der Anteil der humanen Probandenseren 35,5 % (130 humane Seren) und der Anteil der Katzen-Probandenseren 7 % (26) (Abbildung 9).

Prozentanteile Pferde/Menschen/Katzen

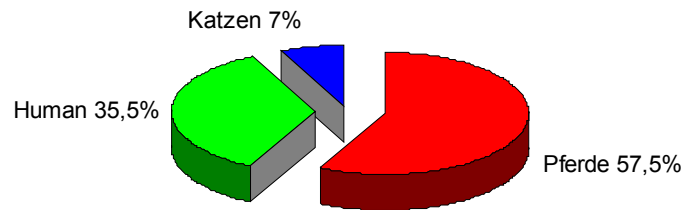


Abbildung 9. Prozentanteile von Pferd/Mensch/Katze an den Gesamtsprobenseren.

3.3.5 Indirekte ELISA- Auswertung

In meiner Arbeit wurden 367 Serumproben von infizierten Pferden (n= 211), sowie von infizierten Humanpatienten (n= 130) und infizierten Katzen (n=26) analysiert. Die untersuchten Seren waren nicht zufällig ausgewählt, sondern waren schon früher von den Arbeitsgruppen Bode (Robert Koch Intitut) und Ludwig (Intitut für Virologie, FUB) auf BDV-reaktive Antikörper als positiv getestet worden. Der indirekte ELISA der Proben im Rahmen dieser Arbeit, bei der M-Protein als Antigen verwendet wurde, bestätigte das Vorkommen von BDV-reaktiven Antikörpern in 109 (29,7%) der 367 Probenseren. Von diesen 109 indirekten ELISA-positiven Seren stammten 3 von den Katzenseren, 29 von den Humanseren und 77 von den Pferdeseren. Die Prozentanteile sind in Abb. 10 wiedergegeben.

Prozentanteile positive BDV-Seren

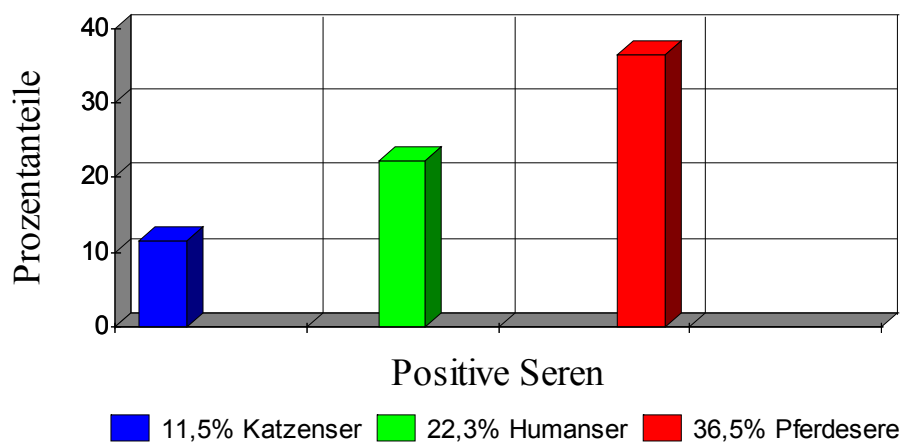


Abbildung 10. Prozentanteil positiver BDV-Seren beim M-Protein in verschiedenen infizierten Spezies.

3.4 Bestätigung von Serumproben (Pferde, Human, Katzen) auf Antikörper gegen Bornaviruskrankheit mittels Western Blot-Analyse.

Um die Ergebnisse des ELISAs in einem anderen Testsystem zu vergleichen und zu bestätigen, wurden ELISA positive und negative Proben im Western-Blot getestet. Die Ergebnisse konnten ohne Ausnahme bestätigt werden. Die Detektion von Anti-BDV-M-Ak in Pferdeseren, Humanenseren und Katzenseren erfolgte im Western-Blot mittels rekombinanten M-Proteins. Als Negativ- bzw. Positivkontrollen dienten diejenigen, die in dem ELISA verwendet wurden

Für die Western-Blot-Analyse der BDV-reaktiven Probenseren wurde rekombinantes M-Protein mit einer Konzentration von 8 ng pro mm Gel in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde in den Multiscreen-Apparat eingespannt und diese mit den zu untersuchenden Seren in einer Verdünnung von 1:32 inkubiert. Als Positivprobe wurde das Kontrollserum RD58 (Kaninchen) in einer Verdünnung von 1:32 jeweils an der ersten Position der gesamten Blot Membrane und als negatives Serum wurde das Humanserum Nr. 25867 an die letzte Position der gesamten Blot Membrane mitgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente See Blue[®] Plus 2 (Invitrogen). Der Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels AP-konjugiert, und Naphthol-AS-TR/FastRed-TR-Hemi(zinkchlorid)salz diente als Farb-Substrat-Mix (siehe auch Western-Blot). Bei jeder Spezies wurde der entsprechende Sekundärantikörper eingesetzt, der mit Peroxidase gekoppelt war. Bei dem positiven Serum ist die Bande in der Größe des M-Proteins eindeutig zu sehen, während das negative Serum das Protein nicht erkannte.

Bei der Untersuchung der jeweiligen Serumproben aller Spezies zeigten sich folgende Ergebnisse: Die Untersuchung der negativen und positiven Serumproben im ELISA ergab mittels Western-Blot auch positiv und negativ für die drei Spezies (Tabelle 3). Die positive Kontrolle detektierte eine Bande mit einem Molekulargewicht von 16 kD in allen Western-Blot-Untersuchungen. In der negativen Kontrolle wurden durchgängig im Western-Blot keine Banden nachgewiesen.

Sp/Serum	ELISA	WB	Ak-Prävalenz
Pferde (n=211)	(n=77) +	(n=83) +	39,3 %
Menschen (n=130)	(n=29) +	(n=31) +	23,8 %
Katzen (n=26)	(n=3) +	(n=3) +	11,5 %

Tabelle 3. Seroprävalenz von Anti-BDV-M-Antikörpern in Pferden, Katzen und Menschen mittels ELISA und Western-Blot in den untersuchten Serumproben.

Es war auch von Interesse zu bestimmen, ob Proben, die im ELISA als fraglich eingestuft wurden, in der Western Blot-Analyse positiv oder negativ beurteilt werden konnten. Bei der Untersuchung von verdächtigen Pferdenserum im ELISA wurden 6 Serumproben als positiv im Western Blot bestätigt. Bei Proben von Humanserum waren 4 Proben verdächtig im ELISA, von denen 2 mittels Western Blot als positiv bestätigt wurden. Die Untersuchung mittels Western Blot eines im ELISA verdächtigen Katzenserums, ergab einen negativen Befund (Tabelle 3; Abbildung 11).



Abbildung 11. Western-Blot Analyse von verdächtigen Seren gegen rekombinantes M-Protein. (M) Marker SeeBlue™Plus2; (PK) Positiv-Kontrolle; (P1 – P6) Pferdenserum; (K1) Katzenserum; (H1 – H2) Humanserum; (NK) Negativ-Kontrolle.

Um die Reproduzierbarkeit der Western-Blot-Ergebnisse zu überprüfen, wurde aus jeder Gruppe eine Serumprobe willkürlich ausgewählt. Die Seren wurden in drei aufeinander folgenden Western Blot-Analysen untersucht. Hierbei bestätigte sich jeweils das erste Ergebnis. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Nachweis von Anti-BDV-M-AK für Pferde-, Katzen- und Menschenserum im Western-Blot

erfolgreich war, um in diesem Testsystem Ergebnisse zu reproduzieren und zu bestätigen.

4 Diskussion

Das Matrixprotein des Borna Disease war wegen seiner Funktion als Initiator des Infektionsvorgangs seit langem von großem Interesse (Stoyloff et al., 1995; Kliche et al., 1994). Daher soll die Entwicklung einer einfach zu handhabenden Diagnostikmethode eine entscheidende Hilfe zum Verständnis der Antikörpergenerierung bei natürlicher Infektion und zum Aufdecken der Seroprävalenz der betroffenen Populationen sein. Meine Untersuchungen gliederten sich daher in drei eng miteinander verbundene Themengebiete:

- (1) Darstellung des rekombinanten Proteins und dessen Überexpression,
- (2) Reinigung, Charakterisierung und Identifikation,
- (3) Aufbau und Einsatz eines spezifischen und sensitiven ELISA-Systems.

Die Grundlagen der Punkte (1) und (2) sind im folgenden Arbeitsdiagramm vorgestellt (Abb. 12).

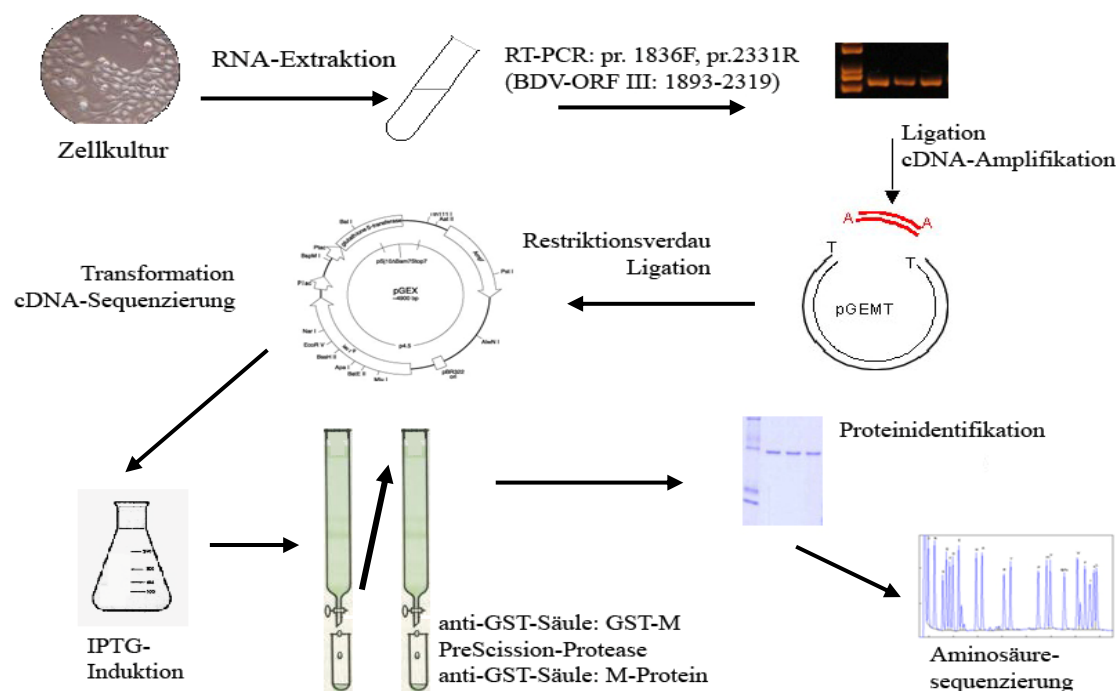


Abbildung 12. Arbeitsdiagramm zur Darstellung des recBDV-M-Proteins (Rodriguez-Chong C & Stoyloff R, 2005). Von der Genisolierung (BDV-ORF III) über Insertion des Gens in pGEMT, cDNA-Amplifikation, Ligation in pGEX zur Transformation und IPTG-Induktion zur Aufreinigung des GST-(BDV-M)-Fusionsproteins und schließlich des BDV-M-Proteins mit anschließender Proteinidentifikation mittels SDS-PAGE, Immunoblot und N-terminale Aminosäuresequenzierung (Edman-Abbau).

4.1 Darstellung des rekombinanten Proteins und dessen Überexpression

Allgemein sind virale Matrixproteine für die Auskleidung der Innenseite der viralen Membran verantwortlich und besitzen daher Membranassoziation. Ferner sind Matrixproteine auch für die Erhaltung der Virusform verantwortlich. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass diese als molekulares Verbindungsglied zwischen den Ribonukleoproteinen (RNP) und den Hüllglykoproteinen eine wichtige Rolle spielen. (Garoff et al., 1998). Wie beim Influenzavirus gezeigt, sind Matrixproteine an der Regulierung der viralen Replikation und am Transport des Nukleokapsids in den Nukleus der Wirtszelle verantwortlich (Martin & Helenius, 1991). Ferner wird bei HIV, Ebola und Lassa Virus beschrieben, dass Matrixproteine für eine aktive Freisetzung der viralen Partikel zuständig sind (Martin-Serrano et al., 2001; Strecker et al., 2003). Durch die funktionelle Eigenschaft des BDV-M-Proteins als Faktor oder Co-Faktor bei den Initialschritten der Virusinfektion (Stoyloff, 1996) ist dessen antigener Charakter von entscheidender Bedeutung.

Der Sequenzvergleich auf Nukleotidebene der beiden verwendeten BDV-Stämme zeigte zum Referenzstamm V folgende Homologien Hu-H2 (97.9 %) und Eq.A24 (98,1 %) (Tabelle 1). Vermutungen über hier auftretende Mutationen könnten funktionell mit der Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA zusammenhängen, wodurch Veränderungen in der Sequenz auf bestimmte Nukleotide beschränkt sind (Staeheli et al., 2000). Aufgrund der hohen Konservierung des M-Proteingens (de la Torre et al., 1996; Planz et al., 1999; Vahlenkamp et al., 2002) wurde von den beiden sequenzierten Genen, dasjenige mit der kleinsten Rate an Aminosäureaustausch ausgewählt, Eq.A24 (0,70 %). Dazu passend zeigt sich, dass das Matrixprotein bei den folgenden analysierten Stämmen (Hu-H2, Eq. A24) hoch konserviert ist, nämlich auf Genomebene zu etwa 90% und auf Proteinebene sogar zu 99% identisch.

Aufgrund des funktionellen Charakters des BDV-M-Proteins muss dessen biologische Kapazität auf Aminosäureebene phylogenetisch erhalten bleiben und sich in den isolierten Stämmen von Mensch und Tier widerspiegeln (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994). Mittels eines M-Protein-ELISA-Systems können in menschlichen und tierischen Populationen serologische Prävalenzstudien durchgeführt werden, die über

das Potential einer Immunantwort von neutralisierenden Antikörpern Aufschluss zur molekularen Epidemiologie geben.

Die Wahl des Expressionssystem wurde durch die kompatiblen Restriktionsstellen des relevanten cDNA-Fragments vom BDV-M-Protein durch den Vektor (pGEX-6P-2) entschieden. Dadurch konnte das M-Protein in Prokaryotenzellen (*E. coli* (BL21)) exprimiert werden, indem das *Gluthathione S-Transferase Gene Fusion System* (GST-GFS) hierzu verwendet wurde. Dieses System eignet sich besonders für die Darstellung rekombinanter Proteine mit dem Beibehalt der biologischen Aktivität des abgespaltenen Zielpeptids, das zuvor mittels anti-GST-monoklonaler Antikörper einer einfachen Säulenaufreinigung unterzogen wurde (Hattori et al., 2007). Mit dieser Methode wurde eine quantitative Ausbeute an BDV-recM-Protein von 2 mg pro 1 Liter Bakterienkultur erreicht.

4.2 Reinigung, Charakterisierung und Identifikation

Das aufgereinigte rekombinante BDV-M-Protein konnte mittels überentwickelter Silberfärbung als sauber bezeichnet werden. In Abb. 5 wird eine starke Bande des hydrolysierten Zielpeptids von 16 kDa sichtbar. Der GST-Fusionsanteil wird zuvor im Immunoblot gezeigt, und zwar in einer Größe von 43 kDa (Abb. 4). Kliche et al., (1994) und Kraus et al. (2001) benutzten ebenfalls jeweils eine gereinigte Version von rekombinanten Expressionsprodukten des BDV-M-Proteins für ihre weiteren Studien. Allerdings wird in dieser Arbeit die Bestätigung des gewünschten Produktes mittels der automatisierten, N-terminalen Edman-Degradation gegeben. Um die Zuverlässigkeit der folgenden immunologischen Ergebnisse als eindeutigen Beweis zu untermauern, dass tatsächlich das BDV-M-Protein eingesetzt wurde, dienten hier als Ausgangsmaterial das vollständige BDV-ORF III-Expressionprodukt, und nicht wie bei Kliche et al., 1994, nur Cyanbromid-generierte Peptidfragmente, die zu Heterogenität und Artefakten bei den Sequenzierungsreaktionen zu neigen scheinen (Franklin & Frangione, 1971).

4.3 Aufbau und Einsatz eines spezifischen und sensitiven ELISA-Systems

Die Grundlage von indirekten ELISA-Systemen wird geboten durch den Einsatz von Antigenen als Testwerkzeuge, die sowohl nativ als auch rekombinant vorliegen können.

Dabei ist es möglich, dass rekombinante Proteine von der biologisch aktiven Form abweichen. Während die Primärstruktur eines Proteins durch die Reihenfolge der Aminosäuren festgelegt ist, geben Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur die räumliche Auffaltung des Moleküls an, die die native Form des Proteins ausmachen, welche bei rekombinanten Proteinen nicht unbedingt gewährleistet sein muss. Somit können bei der Immunodetektion nicht lineare Epitope verloren gehen, und das Protein ist wegen Epitopverlust verändert oder überhaupt nicht mehr immunologisch detektierbar.

Bei der BDV-Detektion haben Briese et al., 1995 ausschließlich rekombinante Proteine als Antigen im ELISA verwendet (N-, P-, M-Proteine). Jedoch ist bei einer persistierenden BDV-Infektion bei Tier und Mensch der eindeutige Nachweis über Verwendung von nativen Proteinen im ELISA-System von Vorteil (Bode et al., 1990; Bode et al., 2001).

Diese Arbeit hatte nicht die Absicht, eine neue immundiagnostische Methode für BDV zu entwickeln, da bereits ein sensiblen und spezifischen diagnostischen Triple-EIA etabliert worden war (Bode et al., 2001). Durch eben erwähnte Blutplasmauntersuchungen können alle drei Parameter der BDV-Infektion mit Minimalaufwand zugleich quantifiziert werden, und zwar BDV-spezifisches Plasma-Antigen (pAg), zirkulierende Immunkomplexe (circulating immune complexes, CIC) und Antikörper (Ak), die speziell auf die N- und P-Proteine BDV-infizierter Individuen ausgerichtet sind. Diese Methode ist eine Weiterentwicklung der bereits früher entwickelten Methoden zur Antikörperdetektion von BDV-p40 und -p23 in Seren und CSFs in natürlich und experimental infizierten Spezies (Ludwig et al., 1977; Ludwig & Thein, 1977; Ludwig et al., 1988).

In diese Arbeit sollte vielmehr eine Studie zur Bestimmung von Antikörpern gegen das M-Protein bei natürlich BDV-infizierten Tieren und Menschen mittels des hier neu entwickelten indirekten ELISAs vorgestellt werden. Dabei spielten die Wichtigkeit dieses Proteins bei der Diagnostik und eventuell epidemiologische Untersuchungen bezüglich der natürlich entstehenden, neutralisierenden Antikörper eine große Rolle.

Die M-Protein-ELISA-Resultate sind kongruent mit denen für BDV-N- und P-Protein, denn die Seren von experimentell mit BDV infizierten Kaninchen sowie natürlich BDV-

infizierten Pferden, Katzen und Menschen erkannten das BDV-spezifische rekombinante M-Proteine in diesem neuartigen indirekten ELISA. Dagegen waren die Immunreaktion der Seren von nicht BDV-infizierten Tieren eindeutig negativ. Als Bestätigung wurde ein Western Blot mit Immunfärbung als Vergleichsverfahren herangezogen. Die im indirekten ELISA-positiven Proben waren zu 100% ebenfalls im Western Blot positiv; und alle im indirekten ELISA untersuchten Seren mit negativem Ergebnis erschienen auch im Western Blot negativ. Ähnliche Resultate konnten Briese et al., 1995 in experimentellen Studien erlangen. Von hohen Antikörpertitern gegen recp16 wurden in der chronischen Phase in experimentell mit BDV infizierten Ratten berichtet (Hatalski et al., 1995; Briese et al., 1995). Obwohl durch die bestehende Methodik die Rolle des Matrixproteins in der Diagnostik natürlicher Infektionen bislang nicht klar war, kann mit dem hier entwickelten ELISA eine Verlaufskontrolle des M-Proteingehalts während BDV-bedingter Krankheitsphasen etabliert werden.

Die Resultate, die man in den untersuchten Seren erhalten hat, zeigen bei natürlich infizierten Individuen (Katzen, Pferde, Menschen) eine deutliche Prävalenz der Antikörper gegen das M-Protein (Tabelle 3).

Bei Katzen schwankt diese Prävalenz zwischen 8 und 44% (Lundgren et al., 1993). Die Daten des hier verwendeten indirekten BDV-M-Protein-ELISA zeigen sich mit 11,5 % Ak-Prävalenz kongruent zu anderen Studien. In Schweden wurde bei Katzen mit neurologischen Symptomen eine hohe Seroprevalenz von BDV (44 %) gefunden und bei zufällig ausgewählten Katzen in Deutschland eine Seroprävalenz von 7-13 % (Lundgren et al., 1993; Lundgren & Ludwig, 1993; Bode et al., 1999). In Japan wurde eine Seroprävalenz von 8,4 % gefunden, wobei auch die virale RNA in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) nachgewiesen werden konnte (Nakamura et al., 1996).

Nishino et al., 1999, beobachteten bei asymptomatischen Katzen eine Prävalenz von 21,9 %. Die Prävalenz von Antikörpern gegen BDV bei asymptomatischen Katzen und bei Katzen mit neurologischen Krankheiten variiert von Land zu Land, was auch mit der verwendeten Diagnostikmethode zusammenhängen könnte (Kamhieh & Flower, 2006). Durch diese serologisch positiven Befunde bei Katzen eröffnet sich die Möglichkeit

einer breiteren Studie, um der epidemiologischen Bedeutung des M-Proteins bei der Bornakrankheit der Katzen weiter nachzugehen.

Die Bornasche Krankheit ist bei Pferden und Schafen seit mehr als 100 Jahren als eine Krankheit bekannt, die Verhaltens- und Bewegungsstörungen verursacht. Kao et al., (1993) entdeckten hierbei spezifische equine BDV-Antikörper im Serum und im Liquor cerebrospinalis. Es bestand die Annahme, dass eine subklinische Form der Bornaschen Krankheit mit einer langen Inkubationszeit existiert (Kao et al., 1993). Hierzu berichteten Nakamura et al., (1995) über den Nachweis von BDV-RNA in PBMCs gesunder Pferde. Die Seroprävalenz von BDV bei Pferden schwankt in Deutschland zwischen 30 und 40% (Herzog et al., 1994; Bode & Ludwig, 1997), was wiederum kongruent mit dieser Studie ist, bei einer repräsentativen Seroprävalenz von 39,3 % (83 positive von 211 Proben) für Antikörpern gegen das BDV-M-Protein. Diese hohe Seroprävalenz könnte im Zusammenhang mit der oben beschriebenen subklinischen Krankheitsform stehen, in dem sich die Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme befanden.

Die hier erhaltenen Resultate im ELISA demonstrieren eine hohe Seroprävalenz von 23,8 % von BDV-Antikörpern gegen p16 in den untersuchten Humanseren (Tabelle 3). Abhängig von der untersuchten Bevölkerung und den verwendeten Methoden (ELISA, RT-PCR Western Blot, Immunofluoreszent) schwankt die Prävalenz von Antikörpern in den Seren von Humanpatienten mit psychiatrischen Erkrankungen, wie Schizophrenie oder affektiven Störungen, zwischen 4 und 23 % (Bode, 1995). Infolgedessen stimmen die M-Protein-ELISA-Daten damit überein. Alle Publikationen beziehen sich allerdings immer wieder auf die BDV-Hauptantigene des N- und P-Proteins. Diesbezüglich zeigen andere, vorangegangene Studien ebenfalls eine hohe Seroprävalenz von BDV bei psychiatrischen Humanpatienten (Rott et al., 1985; Bechter et al., 1992; Nakamura et al., 2000).

Doch hierbei werden vielfach humane BDV-reaktive Antikörper mit niedriger Avidität und humane BDV-Infektionen kontrovers diskutiert (Allmang et al., 2001; Billich et al., 2002; Schwemmler & Billich, 2004; Kinnunen et al., 2007). Als Gründe für diese teilweise deutliche Diskrepanz können hier die Variabilität zwischen den Laboratorien angeführt werden, weiterhin der Unterschied in den analysierten Bevölkerungen, die

Krankheitsphase, Aufbereitung von Antigenen und nicht zu letzt die verwendeten experimentellen Diagnostiktechniken.

BDV-M-reaktive Antikörper wurden von Hatalski et al., (1995) und Kraus, (2002) gezeigt. Dabei wurde von Hatalski et al., (1995) demonstriert, dass sich die neutralisierende Wirkung von Seren BDV-infizierter Ratten von der akuten Phase des Infektion (5 Wochen p.i.) bis zur chronischen Krankheit (15 Wochen p.i.) signifikant erhöhte. Die Kapazität der neutralisierenden Antikörper war spezifisch für p16. Die Zeit bis zur Bildung dieser Antikörper scheint in Korrelation mit der Immunreaktivität von p16 zu stehen. Eine Depletion dieser p16-Antikörper führt zu einer erheblichen Abnahme des neutralisierenden BDV-Titers (NT). Im Gegensatz dazu erfolgt keine Beeinflussung des NTs durch BDV-Proteine p23 und p40.

In dieser Arbeit konnte die bei der Verwendung der Bedeutung des BDV-M-Proteins für epidemiologische Untersuchungen und seine mögliche Anwendung in der Diagnostik erstmalig detailliert dargestellt werden. Der Befund, dass Seren von kranken Tierspezies sowie des human Antikörper gegen das BDV M-Protein enthalten, unterstreicht die Wichtigkeit dieses Proteins für weitere Studien. Des weiteren konnten, meine Untersuchungen über das M-Protein das breite Spektrum der Bornavirus Infektion, nicht nur in den verschiedensten Tierspezies, sondern auch für den Menschen bestätigen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Versuche zum Nachweis von Antikörpern gegen das Matrixprotein in Seren von Menschen und verschiedenen Spezies durchgeführt, die mit dem Virus der Bornaschen Krankheit natürlich infiziert waren. Folgende Ergebnisse ergaben sich:

1. Die Sequenzierung des Matrixproteins bei verschiedenen Stämmen zeigt eine starke phylogenetische Homologie. Die Resultate bestätigten eine hohe erneute Stabilität des M Proteins bei der Vermehrung von Bornaviren in Zellen und eine starke Konservierung dieses Matrix Proteins in den Virusisolaten von Mensch und Tier.
2. Das Gen des Matrixproteins wurde in einen prokaryotischen Expressionsvektor kloniert, das das Matrixprotein in Bakterien (*E. coli*) überexprimiert und durch *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) stark gereinigt wurde. Dieses Protein fand nun Anwendung als Antigen zur Detektion von spezifischen Serum Antikörpern. Damit stellt es die Basis für einen neuen ELISA-Bindungsassays dar.
3. Die immunologischen Eigenschaften dieses Antigens wurden in verschiedenen Testsystemen geprüft und damit auch charakterisiert. Die Antikörper gegen das BDV-Matrixprotein können lineare- und konformationsepitope erkennen. Die spezifische Antikörperreaktivität gegen die Epitope auf diesem rekombinanten Matrixprotein wurde mittels indirektem ELISA und Western Blot gezeigt.
4. Antikörper gegen Matrixprotein bei Seren von verschiedenen natürlich infizierten Mammalier-Spezies zeigte eine signifikante Seroprävalenz, was dieses Protein für die seroepidemiologischen Studie der Bornaschen Krankheit in chronischem Stadium von Interesse ist.
5. Die hohe Prävalenz von Antikörpern gegen das BDV-Matrixprotein des in humanen Seren bestätigt die Existenz des Virus beim Menschen, sowie die starke Virusaktivität und die klinische Relevanz der Bornavirus Infektion für die genannte Krankheitssymptomatik.

6 Summary

“Studies of antibodies against the protein p16 (matrix protein) in species naturally infected with the Borna Disease Virus.”

In the present study experiments were conducted to detect antibodies against the matrix protein in sera of humans and other species being naturally infected with the Borna Disease Virus. The following results were achieved:

1. Sequencing of the matrix protein of different strains shows a strong phylogenetic relationship. These results confirm the stability of the virus after passages in tissue cell culture and furthermore show that the matrix protein isolated from men and animals is highly conserved.
2. The gene encoding the BDV matrix protein was cloned in a prokaryotic expression vector. The matrix protein was over-expressed in bacteria (*E. coli*) and purified by *Immobilized Metal Affinity Chromatography* (IMAC) in high yields. The protein proved to be useful as antigen for the detection of antibodies in sera and by this constitutes the basis of an ELISA.
3. The immunological properties of this antigen were characterized using different assays. Antibodies against the matrix protein recognize conformational as well as linear epitopes. The analysis of the antibody reactivity against these epitopes of the recombinant matrix protein was demonstrated by ELISA and Western Blot.
4. A significant seroprevalence of antibodies against the BDV matrix protein was found in naturally infected mammalian species. This fact indicates that the matrix protein can be useful in seroepidemiological studies of infected animals during a chronic phase of the disease.
5. The high seroprevalence of antibodies against the matrix protein of Borna Disease Virus in human sera confirms the existence of infection in humans showing viral activity and significance of BD in men.

7 Präsentationen

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits an anderer Stelle präsentiert:

Rodriguez-Chong C, Mauel S, Stoyloff R, Bode L, Ludwig H (2004):

Properties of the matrix protein sequenced from different Borna disease virus strains.
Poster, Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie (GfV), Tübingen, 17.-20.03.2004.

Sendegeya JL, Heller T, Dieckhöfer R, Wenta N, Reckwald P, Leiskau T, Rodriguez-Chong C, Stoyloff R, Ludwig H, Bode L (2004):

Bornavirus: Virusinfektion bei Tieren und Menschen.
Präsentation beim „Tag der Offenen Tür“ am Institut für Virologie (Fakultät für Veterinärmedizin) der Freien Universität Berlin, 26.06.2004.

Rodriguez-Chong C, Stoyloff R (2005):

Amplifikation und Klonierung des ORF III von Bornavirus und in vitro-Expression des Matrixproteins von Human- und Pferdewildvirus.
Vortrag, Robert Koch-Institut, Berlin, 23.05.2005.

8 Literatur

Allmang, U., Hofer, M., Herzog, S., Bechter, K., Staeheli, P. (2001). Low avidity of human serum antibodies for Borna disease virus antigens questions their diagnostic value. *Mol Psychiatry* 6(3): 329-33.

Anzil, A. P., Blinzinger, K., Mayr, A. (1973). Persistent Borna virus infection in adult hamsters. *Arch Gesamte Virusforsch* 40(1): 52-7.

Autenrieth, C.F. (1823). *Über die hitzige Kopf-Krankheit der Pferde. Auf Verlangen des Münsinger-Vereins zur Beförderung der Pferdezucht auf der Alp, und zunächst für diese Gegend.* bey Heinrich, Laupp, Tübingen.

Bahmani, M. K., Nowrouzian, I., Nakaya, T., Nakamura, Y., Hagiwara, K., Takahashi, H., Rad, M.A., Ikuta, K. (1996). Varied prevalence of Borna disease virus infection in Arabic, thoroughbred and their cross-bred horses in Iran. *Virus Res* 45(1): 1-13.

Bechter, K., Herzog, S., Schüttler, R., Rott, R. (1989). MRI in psychiatric patients with serum antibodies against Borna disease virus. *Psychiatry Res* 29: 281-282.

Bechter, K., Schüttler, R., Herzog, S. (1992). Borna disease virus: possible causal agent in psychiatric and neurological disorders in two families. *Psychiatry Res* 42(3): 291-4.

Berg, M., Johansson, M., Montell, H., Berg, A.L. (2001). Wild birds as a possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiol Infect* 127(1): 173-8.

Billich, C., Sauder, C., Frank, R., Herzog, S., Bechter, K., Takahashi, K., Peters, H., Staeheli, P., Schwemmler, M. (2002). High-avidity human serum antibodies recognizing linear epitopes of Borna disease virus proteins. *Biol Psychiatry* 51(12): 979-87.

Bilzer, T., Grabner, A., Stitz, L. (1996). Immunopathology of Borna disease in the horse: clinical, virological and neuropathologic findings. *Tierarztl Prax* 24(6): 567-76.

Binz, T., Lebelt, J., Niemann, H., Hagenau, K. (1994). Sequence analyses of the p24 gene of Borna disease virus in naturally infected horse, donkey and sheep. *Virus Res* 34(3): 281-9.

Bode, L., Riegel, S., Ludwig, H., Amsterdam, J.D., Lange, W., Koprowski, H. (1988). Borna disease virus-specific antibodies in patients with HIV infection and with mental disorders. *Lancet* II, 689.

Bode, L., Riegel, S., Reckwald, P., Ludwig, H. (1990). Improved and rapid serodiagnosis of Borna disease virus infections in animals and man. *Abstr VIIIth Int Congr Virol*, August 26-31, Berlin, Germany, P31-064, p. 302.

Bode, L., Dürrwald, R., Ludwig, H. (1994). Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. *Vet Rec* 135(12): 283-4.

Bode, L. (1995). Human infections with Borna disease virus and potential pathogenic implications. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 103-30.

Bode, L., Zimmermann, W., Ferszt, R., Steinbach, F., Ludwig, H. (1995). Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. *Nature Med* 1 (3): 232-236.

Bode, L., Dürrwald, R., Rantam, F.A., Ferszt, R., Ludwig, H. (1996). First isolates of infectious human Borna disease virus from patients with mood disorders. *Mol Psychiatry* 1(3): 200-12.

Bode, L. and Ludwig, H. (1997). Clinical similarities and close genetic relationship of human and animal Borna disease virus. *Arch Virol Suppl* 13: 167-82.

Bode, L. (1999). Borna Disease Virus – natürliche Infektion und Krankheit bei Mensch und Tier. Wissensstand und Neubewertung von Diagnostik, Pathogenese und Epidemiologie unter Einbeziehung eigener Studien. Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für Virologie und Infektiologie am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Habilitation 22.05.2000. weblink: http://www.diss.fu-berlin.de/2002/250/bode_habil.pdf

Bode, L., Stoyloff, R., Dietrich, D.E., Ludwig, H. (1999). Human Bornavirus and amantadine (Abstract) In: Proc. 11th International Congress of Virology, 9-13. August Sydney. International Union of Microbiological Societies, Sydney, p.98

Bode, L., Reckwald, P., Severus, W.E., Stoyloff, R., Ferszt, R., Dietrich, D.E., 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(4): 481-91.

Bode, L., Riegel, S., Severus, W.E., Stoyloff, R., Ferszt, R., Dietrich, D.E., Ludwig, H. (1992). Human infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients with chronic diseases and healthy individuals. *J Med Virol* 36(4): 309-15.

Bode, L., Steinbach, F. and Ludwig, H. (1994). A novel marker for Borna disease virus infection. *Lancet* 343(8892): 297-8.

Bode, L. and Ludwig, H. (2003). Borna disease virus infection a human mental-health risk. *Clin Microbio Rev* 16: 534-545.

Bode, L., Dietrich, D.E. and Ludwig H. (2005). Borna disease virus – impact on mood and cognition (Chapter 23). In: *Biology of Depression: from novel insights to therapeutic strategies* (J. Licinio and M.-L. Wong, eds), Wiley-VCH, Weinheim, pp 583-616.

Bode, L. (2008). Human bornavirus infection-- towards a valid diagnostic system. *APMIS Suppl.* (124): 21-39.

- Boucher, J. M., Barbillon, E., Cliquet, F. (1999). Borna disease: a possible emerging zoonosis. *Vet Res* 30(6): 549-57.
- Briese, T., de la Torre, J. C., Lewis, A., Ludwig, H., Lipkin, W.I. (1992). Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(23): 11486-9.
- Briese, T., Schneemann, A., Lewis, A.J., Park, Y.S., Kim, S., Ludwig, H., Lipkin, W.I. (1994). Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(10): 4362-6.
- Briese, T., Hatalski, C. G., Kliche, S., Park, Y.S., Lipkin, W.I. (1995). Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to Borna disease virus-specific proteins. *J Clin Microbiol* 33(2): 348-51.
- Caplazi, P. and Ehrensperger, F. (1998). Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Vet Immunol Immunopathol* 61(2-4): 203-20.
- Caplazi, P., Melzer, K., Goetzmann, R., Rohner-Cotti, A., Bracher, V., Zlinszky, K., Ehrensperger, F. (1999). Borna disease in Switzerland and in the principality of Liechtenstein. *Schweiz Arch Tierheilkd* 141(11): 521-7.
- Carbone, K. M., Moench, T. R., Lipkin, W.I. (1991). Borna disease virus replicates in astrocytes, Schwann cells and ependymal cells in persistently infected rats: location of viral genomic and messenger RNAs by in situ hybridization. *J Neuropathol Exp Neurol* 50(3): 205-14.
- Chalmers, R. M., Thomas, D. R., Salmon, R.L. (2005). Borna disease virus and the evidence for human pathogenicity: a systematic review. *QJM* 98(4): 255-74.
- Chase, G., Mayer, D., Hildebrand, A., Frank, R., Hayashi, Y., Tomonaga, K., Schwemmler, M. (2007). Borna disease virus matrix protein is an integral component of the viral ribonucleoprotein complex that does not interfere with polymerase activity. *J Virol* 81(2): 743-9.
- Compans, R. W., Melsen, L. R., de la Torre, J.C. (1994). Virus-like particles in MDCK cells persistently infected with Borna disease virus. *Virus Res* 33(3): 261-8.
- Cubitt, B. and de la Torre, J. C. (1994). Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. *J Virol* 68(3): 1371-81.
- Cubitt, B., Oldstone, C., de la Torre, J. C. (1994). Sequence and genome organization of Borna disease virus. *J Virol* 68(3): 1382-96.
- Cubitt, B., Oldstone, C., Valcarcel, J, de la Torre, J.C. (1994). RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. *Virus Res* 34(1): 69-79.

Danner, K., Heubeck, D. and Mayr, A. (1978). In vitro studies on Borna virus. I. The use of cell cultures for the demonstration, titration and production of Borna virus. *Arch Virol* 57(1): 63-75.

Danner, K. (1976). Laboratory diagnosis of Borna disease. Demonstration of antibodies in the central nervous system. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1976 Dec; 23(10):865-7.

de la Torre, J. C. (1994). Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J Virol* 68(12): 7669-75.

de la Torre, J. C., Bode, L., Dürrwald, R., Cubitt, B., Ludwig, H. (1996). Sequence characterization of human Borna disease virus. *Virus Res* 44(1): 33-44.

de la Torre, J. C., Bode, L., Carbone, K.M., Dietzschold, B., Ituka, K., Lipkin, W.I., Ludwig, H., Richt, J.A., Staeheli, P., Stitz, L. Family Bornaviridae. (2000). *Virus taxonomy*. Academic Press, London, England; 531 – 538

Deuschle, M., Bode, L., Heuser, I., Schmider, J., Ludwig, H. (1998). Borna disease virus proteins in cerebrospinal fluid of patients with recurrent depression and multiple sclerosis. *Lancet* 352(9143): 1828-9.

Dietrich, D.E. and Bode, L. (2008). Human Borna disease virus-infection and its therapy in affective disorders. *APMIS Suppl* (124): 61-5.

Dinter, E. (1879). Meningitis cerebrospinalis bei Pferden. *Ber Vet Wes Sachsen* 24:121

Dürrwald, R. (1993). Die natürliche Borna-Virus-Infektion der Einhufer und Schafe. Untersuchungen zur Epidemiologie, zu neueren diagnostischen Methoden (ELISA, PCR) und zur Antikörperkinetik bei Pferden nach Vakzination mit Lebendimpfstoff. Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin, Germany.

Edman, P. (1949): A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* 22(3): 475.

Elford, W.J. and Galloway, I.A. (1933). Filtration of the virus of Borna disease through graded collodion membranes. *Br J Exp Pathol* 14:196-205.

Flower, R. and Ludwig, H. (2006). Presence of Borna disease virus (BDV)-specific structural components in human blood plasma. *J Clin Virol* 36(4): 312-3; author reply 314.

Flower, R.L., Kamhieh, S., McLean, L., Bode, L., Ludwig, H., Ward, C.M. (2008). Human Borna disease virus infection in Australia: serological markers of infection in multi-transfused patients. *APMIS Suppl* (124):89-93.

Franklin, E.C. and Frangione, B. (1971). The Molecular Defect in a Protein (CRA) Found in γ 1 Heavy Chain Disease, and Its Genetic Implications. *PNAS* 68(1): 187-191.

Fu, Z. F., Amsterdam, J. D., Kao, M., Shankar, V., Koprowski, H., Dietzschold, B. (1993). Detection of Borna disease virus-reactive antibodies from patients with affective disorders by western immunoblot technique. *J Affect Disord* 27(1): 61-8.

Galiberti, J. B. (1660). "Reitgebanter Tümmelplatz...Gestüttordnung." zitiert nach Dürrwald R. und Ludwig H. Borna Disease Virus (BDV), a (Zoonotic?) Worldwide Pathogen. A Review of the History of the Disease and the Virus Infection with Comprehensive Bibliography (1997) *J Vet Med B* (44), Frontispiz und S.42.

Garoff, H., Hewson, R. and Opstelten, D.J.E. (1998). Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4):1171-90.

Gies, U., Bilzer, T., Stitz, L., Staiger, J.F. (1998). Disturbance of the cortical cholinergic innervation in Borna disease prior to encephalitis. *Brain Pathol* 8(1): 39-48.

Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Grasser, F.A., de la Torre, J.C. (1997). Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry. *J Virol* 71(4): 3208-18.

Gosztanyi, G., Kao, M., Dietzschold, B., Rupprecht, C.R., Ludwig, H., Koprowski, H. (1994): Interaction between viral proteins and neurotransmitter receptors directs and modulates transsynaptic virus spread within the central nervous system. *Brain Pathol* 4: 383.

Gosztanyi, G. and Ludwig, H. (1995). Borna disease--neuropathology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 39-73.

Gosztanyi, G. and Ludwig, H. (2001). Interactions of viral proteins with neurotransmitter receptors may protect or destroy neurons. *Curr Top Microbiol Immunol* 253: 121-44.

Gosztanyi, G. (2008). Natural and experimental Borna disease virus infections--neuropathology and pathogenetic considerations. *APMIS Suppl* (124): 53-7.

Grabner, A. and Fischer A. (1991). Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years. *Tierärztl Prax* 19(1): 68-73.

Hatalski, C. G., Kliche, S., Stitz, L., Lipkin, W.I. (1995). Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J Virol* 69(2): 741-7.

Hattori, K., Hirayama, M., Suzuki, H., Hamamoto, H., Sekimizu, K., Tamura, H. (2007). Cloning and expression of a novel sulfotransferase with unique substrate specificity from *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem* 71(4):1044-1051.

Herzog, S., Frese, K., Richt, J.A., Rott, R. (1994). Ein Beitrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit des Pferdes. *Wien Tierärztl Wschr* 81:374-9.

Herzog, S., Pfeuffer, I., Haberzettl, K., Feldmann, H., Frese, K., Bechter, K., Richt, J.A. (1997). Molecular characterization of Borna disease virus from naturally infected animals and possible links to human disorders. *Arch Virol Suppl* 13: 183-90.

Hirano, N., Kao, M., Ludwig, H. (1983). Persistent, tolerant or subacute infection in Borna disease virus-infected rats. *J Gen Virol* 64 (7): 1521-30.

Hübner, J., Bode, L. and Ludwig, H. (2001). Borna disease virus infection in FIV-positive cats in Germany. *Vet Rec* 149: 152.

Ihlenburg, H. (1966). Experimentelle Prüfung der Empfänglichkeit der Katze für das Virus der Bornaschen Krankheit. *Arch Exp Veterinärmed* 20: 859-864.

Ikuta, K., Ibrahim, M. S., Kobayashi, T., Tomonaga, K. (2002). Borna disease virus and infection in humans. *Front Biosci* 7: d470-95.

Joest, E. und Degen, K. (1909): Über eigentümliche Kerneinschlüsse der Ganglienzellen bei der enzootischen Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde. *Z. Infkrkh. Haustiere* 6: 348-356.

Kamhieh, S. and Flower, R. L. (2006). Borna disease virus (BDV) infection in cats. A concise review based on current knowledge. *Vet Q* 28(2): 66-73.

Kamhieh, S., Hodgson, J.L., Bode, L., Ludwig, H., Flower, R.L. (2008). Borna disease virus: evidence of naturally-occurring infection in cats in Australia. *APMIS Suppl.* (124): 50-2.

Kao, M., Hamir, A. N., Rupprecht, C.E., Fu, Z.F., Shankar, V., Koprowski, H., Dietzschold, B. (1993). Detection of antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. *Vet Rec* 132(10): 241-4.

Katz, J. B., Alstad, D., Jenny, A.L., Carbone, K.M., Rubin, S.A., Waltrip, R.W. 2nd. (1998). Clinical, serologic, and histopathologic characterization of experimental Borna disease in ponies. *J Vet Diagn Invest* 10(4): 338-43.

Kinnunen, P. M., Billich, C., Ek-Kommonen, C., Henttonen, H., Kallio, R.K., Niemimaa, J., Palva, A., Staeheli, P., Vaheri, A., Vapalahti, O. (2007). Serological evidence for Borna disease virus infection in humans, wild rodents and other vertebrates in Finland. *J Clin Virol* 38(1): 64-9.

Kistler, A.L., Gancz, A., Clubb, S., Skewes-Cox, P., Fischer, K., Sorber, K., Chiu, C.Y., Lublin, A., Mechani, S., Farnoushi, Y., Greninger, A., Wen, C.C., Karlene, S.B., Ganem, D., DeRisi, J.L. (2008). Recovery of divergent avian bornaviruses from cases of proventricular dilatation disease: identification of a candidate etiologic agent. *Virol J.* 31(5):88.

Kliche, S., Briese, T., Henschen, A.H., Stitz, L., Lipkin, W.I. (1994). Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18. *J Virol* 68(11): 6918-23.

- Kliche, S., Stitz, L., Mangalam, H., Shi, L., Binz, T., Niemann, H., Briese, T., Lipkin, W.I. (1996). Characterization of the Borna disease virus phosphoprotein p23. *J Virol* 70(11): 8133-7.
- Kobayashi, T., Kamitani, W., Zhang, G., Watanabe, M., Tomonaga, K., Ikuta, K. (2001). Borna disease virus nucleoprotein requires both nuclear localization and export activities for viral nucleocytoplasmic shuttling. *J Virol* 75(7): 3404-12.
- Kobayashi, T., Shoya, Y., Koda, T., Takashima, I., Lai, P.K., Ikuta, K., Kakinuma, M., Kishi, M. (1998). Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 243(1): 188-97.
- Kobayashi, T., Watanabe, M., Kamitani, W., Tomonaga, K., Ikuta, K. (2000). Translation initiation of a bicistronic mRNA of Borna disease virus: a 16-kDa phosphoprotein is initiated at an internal start codon. *Virology* 277(2): 296-305.
- Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Kurane, I., Sano, K., Nakai, M. (1999). Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus. *J Virol* 73(1): 760-6.
- Kraus, I., Eickmann, M., Kiermayer, S., Scheffczik, H., Fluess, M., Richt, J.A., Garten, W. (2001). Open reading frame III of Borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J Virol* 75(24): 12098-104.
- Kraus, I. (2002). Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit. *Humanbiol. Diss.*, Philipps-Universität Marburg.
- Kraus, I., Bogner, E., Lilie, H., Eickmann, M., Garten, W. (2005). Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus. *FEBS Lett* 579(12): 2686-92.
- Krey, H., Ludwig, H. and Rott, R. (1979). Spread of infectious virus along the optic nerve into the retina in Borna disease virus-infected rabbits. *Arch Virol* 61(4): 283-8.
- Lange, H., Herzog, S., Herbst, W., Schliesser, T. (1987) Seroepidemiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit (Ansteckende Gehirn-Rückenmarkentzündung) des Pferdes. *Tierärztl Umschau* 42: 938-46.
- Li, Q., Wang, Z., Zhu, D., Xu, M., Chen, X., Peng, D., Iwata, Y., Xie, P. (2009). Detection and analysis of Borna disease virus in Chinese patients with neurological disorders. *Eur J Neurol* 16(3):399-403.
- Lipkin, W. I., Travis, G. H., Carbone, K.M., Wilson, M.C. (1990). Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(11): 4184-8.
- Lipkin, W. I. & Briese, T. (2006). *Bornaviridae*, p. 1829-1851. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus

(ed.), Fields virology, 5th ed., **vol. II**. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1): 267-275.

Ludwig, H. und Becht, H. (1977). Borna disease - a summary of our present knowledge. Slow virus infections of the central nervous system. Investigational approaches to etiology and pathogenesis of these diseases. V. Ter Meulen, & M. Katz. New York, Springer: 75-83.

Ludwig, H. and Bode, L. (1997). The neuropathogenesis of Borna disease virus infections. *Intervirology* 40(2-3): 185-97.

Ludwig, H., Bode, L. and Gosztonyi, G. (1988). Borna disease: a persistent virus infection of the central nervous system. *Prog Med Virol* 35: 107-151.

Ludwig, H. and Bode, L. (2000). Borna disease virus: new aspects on infection, disease, diagnosis and epidemiology. *Rev Sci Tech off Inf Epiz* 19(1): 259-88.

Ludwig, H., Furuya, K., Bode, L., Klein, N., Dürrwald, R., Lee, D.S. (1993). Biology and neurobiology of Borna disease viruses (BDV), defined by antibodies, neutralizability and their pathogenic potential. *Arch Virol Suppl* 7: 111-33.

Ludwig, H., Koester, V., Pauli, G., Rott, R. (1977). The cerebrospinal fluid of rabbits infected with Borna disease virus. *Arch Virol* 55(3): 209-23.

Ludwig, H., Kraft, W., Kao, M., Gosztonyi, G., Dahme, E., Krey, H. (1985). Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice. *Tierarztl Prax* 13(4): 421-53.

Ludwig, H. and Thein, P. (1977). Demonstration of specific antibodies in the central nervous system of horses naturally infected with Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol* 163(4): 215-26.

Ludwig, T. H., Becht, H. and Groh, L. (1973). Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus. *Med Microbiol Immunol* 158(4): 275-89.

Ludwig, H. (2008). The Biology of Bornavirus. *APMIS Suppl* (124): 14-20.

Lundgren, A. L., Czech, G., Bode, L., Ludwig, H. (1993). Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. *Zentralbl Veterinarmed B* 40(4): 298-303.

Lundgren, A. L. and Ludwig, H. (1993). Clinically diseased cats with non-suppurative meningoencephalomyelitis have Borna disease virus-specific antibodies. *Acta Vet Scand* 34(1): 101-3.

- Martin, K. and Helenius, A. (1991). Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* 65(1): 232-44.
- Martin-Serrano, J., Zang, T. and Bieniasz, P.D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7(12): 1313-9.
- Metzler, A., Frei, U. and Danner, K. (1976). Virologically confirmed outbreak of Borna's disease in a Swiss herd of sheep. *Schweiz Arch Tierheilkunde* 118(11): 483-92.
- Metzler, A., Ehrensperger, F. and Danner, K. (1979). Bornavirus Infektion bei Schafen: Verlaufsuntersuchungen nach spontaner Infektion, unter besonderer Berücksichtigung der Antikörperkinetik im Serum und Liquor cerebrospinalis. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 121:37-48.
- Miranda, H. C., Nunes, S. O., Calvo, E.S., Suzart, S., Itano, E.N., Watanabe, M.A. (2006). Detection of Borna disease virus p24 RNA in peripheral blood cells from Brazilian mood and psychotic disorder patients. *J Affect Disord* 90(1): 43-7.
- Nakamura, Y., Asahi, S., Nakaya, T., Bahmani, M.K., Saitoh, S., Yasui, K., Mayama, H., Hagiwara, K., Ishihara, C., Ikuta, K. (1996). Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *J Clin Microbiol* 34(1): 188-91.
- Nakamura, Y., Kishi, M., Nakaya, T., Asahi, S., Tanaka, H., Sentsui, H., Ikeda, K., Ikuta, K. (1995). Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. *Vaccine* 13(12): 1076-9.
- 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, J.C., Ikuta, K. (2000). Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J Virol* 74(10): 4601-11.
- Nishino, Y., Funaba, M., Fukushima, R., Mizutani, T., Kimura, T., Iizuka, R., Hirami, H., Hara, M. (1999). Borna disease virus infection in domestic cats: evaluation by RNA and antibody detection. *J Vet Med Sci* 61(10): 1167-70.
- Nowotny, N., Kolodziejek, J., Jehle, C.O., Suchy, A., Staeheli, P., Schwemmler, M. (2000). Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol* 74(12): 5655-8.
- Nübling, M., Löwer, J., Kurth, R., and the Bornavirus study group. (1999). Ringversuche zu PCR-bzw. Serologischen Methoden für den Nachweis von Bornavirus. Abstract. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen, March 9-12.
- Ouchi, A., Kishi, M., Kobayashi, T., Lai, P.K., Malik, T.H., Ikuta, K., Mochizuki, M. (2001). Prevalence of circulating antibodies to p10, a non-structural protein of the Borna disease virus in cats with ataxia. *J Vet Med Sci* 63(12): 1279-85.

- Patti, A.M., Vulcano, A., Candelori, E., Ludwig, H., Bode, L. (2008). Borna disease virus infection in the population of Latium (Italy). *APMIS Suppl.* (124): 74-6.
- Perez, M., Watanabe, M., Whitt, M.A., de la Torre, J.C. (2001). N-terminal domain of Borna disease virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry. *J Virol* 75(15): 7078-85.
- Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Winkler, T., Büttner, M., Rziha, H.J., Stitz, L. (1999). Pathogenesis of Borna disease virus: granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *J Virol* 73(8): 6251-6.
- Pyper, J. M., Clements, J. E. and Zink, M.C. (1998). The nucleolus is the site of Borna disease virus RNA transcription and replication. *J Virol* 72(9): 7697-702.
- Pyper, J. M. and Gartner, A. E. (1997). Molecular basis for the differential subcellular localization of the 38- and 39-kilodalton structural proteins of Borna disease virus. *J Virol* 71(7): 5133-9.
- Reeves, N. A., Helps, C. R., Gunn-Moore, D.A., Blundell, C., Finnemore, P.L., Pearson, G.R., Harbour, D.A. (1998). Natural Borna disease virus infection in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 143(19): 523-6.
- Richt, J. A., Fürbringer, T., Koch, A., Pfeuffer, I., Herden, C., Bause-Niedrig, I., Garten, W. (1998). Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J Virol* 72(5): 4528-33.
- Richt, J. A., Schmeel, A., Frese, K., Carbone, K.M., Narayan, O., Rott, R. (1994). Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med* 179(5): 1467-73.
- Roggendorf, W., Sasaki, S. and Ludwig, H. (1983). Light microscope and immunohistological investigations on the brain of Borna disease virus-infected rabbits. *Neuropathol Appl Neurobiol* 9(4): 287-96.
- Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W., Koprowski, H. (1985). Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science* 228(4700): 755-6.
- Rott, R., Herzog, S., Bechter, K., Frese, K. (1991). Borna disease, a possible hazard for man? *Arch Virol* 118(3-4): 143-9.
- Rott, R. and Becht, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 190: 17-30.
- Rubin, S. A., Sierra-Honigmann, A. M., Lederman, H.M., Waltrip, R.W. 2nd, Eiden, J.J., Carbone, K.M. (1995). Hematologic consequences of Borna disease virus infection of rat bone marrow and thymus stromal cells. *Blood* 85(10): 2762-9.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA* 74:5463-5467.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York., Cold Spring Harbor Press.

Sauder, C., Müller, A., Cubitt, B., Mayer, J., Steinmetz, J., Trabert, W., Ziegler, B., Wanke, K., Müller-Lantzsch, N., de la Torre, J.C., Grässer, F.A. (1996). Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J Virol* 70(11): 7713-24.

Sauder, C., Mizutani, T., Yamaguchi, K. Laboratory Diagnosis. In: Carbone KM, editor. *Borna disease virus and its role in neurobehavioral disease*. Washington DC: ASM Press: 2002. p. 45-85.

Schädler, R., Diringer, H. and Ludwig, H. (1985). Isolation and characterization of a 14500 molecular weight protein from brains and tissue cultures persistently infected with Borna disease virus. *J Gen Virol* 66 (Pt 11): 2479-84.

Schneemann, A., Schneider, P. A., Kim, S., Lipkin, W.I. (1994). Identification of signal sequences that control transcription of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. *J Virol* 68(10): 6514-22.

Schneemann, A., Schneider, P. A., Lamb, R.A., Lipkin, W.I. (1995). The remarkable coding strategy of Borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. *Virology* 210(1): 1-8.

Schneider, P.A., Briese, T., Zimmermann, W., Ludwig, H., Lipkin, W.I. (1994). Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J Virol* 68(1): 63-8.

Schneider, U., Naegele, M., Staeheli, P., Schwemmler, M. (2003). Active Borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* 77(21): 11781-9.

Schüppel, K. F., Reinacher, M., Lebelt, J., Kulka, D. (1995). Bornasche Krankheit bei Primaten. *Erkrankungen der Zootiere: Verhandlungsbericht des 37. Internationalen Symposiums*. 37:115-120.

Schwemmler, M. (1999). Progress and controversy in Bornavirus research: a meeting report. *Arch Virol* 144(4): 835-40.

Schwemmler, M. and Billich, C. (2004). The use of peptide arrays for the characterization of monospecific antibody repertoires from polyclonal sera of psychiatric patients suspected of infection by Borna Disease Virus. *Mol Divers* 8(3): 247-50.

Schwemmler, M., Salvatore, M., Shi, L., Richt, J., Lee, C.H., Lipkin, W.I. (1998). Interactions of the Borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications. *J Biol Chem* 273(15): 9007-12.

Sierra-Honigsmann, A. M., Rubin, S. A., Estafanous, M.G., Yolken, R.H., Carbone, K.M. (1993). Borna disease virus in peripheral blood mononuclear and bone marrow cells of neonatally and chronically infected rats. *J Neuroimmunol* 45(1-2): 31-6.

Sprockhoff, H. (1954). Untersuchungen über die Komplementbindungsreaktion bei der Bornaschen Krankheit. *Zbl Vet Med* 1: 494-503.

Solon, J., Gareil, O., Bassereau, P., Gaudin, Y. (2005). Membrane deformations induced by the matrix protein of vesicular stomatitis virus in a minimal system. *J Gen Virol* 86: 3357-3363.

Stitz, L., Krey, H. and Ludwig, H. (1980). Borna disease in rhesus monkeys as a model for uveocerebral symptoms. *J Med Virol* 6: 333-340.

Stitz, L. (1991). Immune intervention in Borna disease. *Tierärztl Prax* 19(5): 509-14.

Stitz, L., Soeder, D., Deschl, U., Frese, K., Rott, R. (1989). Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. *J Immunol* 143(12): 4250-6.

Stoyloff, R., Briese, T., Borchers, K., Zimmermann, W., Ludwig, H. (1994). N-glycosylated protein(s) are important for the infectivity of Borna disease virus (BDV). *Arch Virol* 137(3-4): 405-9.

Stoyloff, R. (1996). Borna-Virus-Infektion und Glykoproteine: Biochemische und biologische Untersuchungen zu Struktur und Funktion von GP17. *Biochem. Diss.*, Freie Universität Berlin. Cuvillier-Verlag, Göttingen, 1996.

Stoyloff, R., Strecker, A., Bode, L., Franke, P., Ludwig, H., Hucho, F. (1997). The glycosylated matrix protein of Borna disease virus is a tetrameric membrane-bound viral component essential for infection. *Eur J Biochem* 246(1): 252-7.

Stoyloff, R., Bode, L., Borchers, K., Ludwig, H. (1998). Neutralization of Borna disease virus depends upon terminal carbohydrate residues (α -D-Man, β -D-GlcNAc) of glycoproteins gp17 and gp94. *Intervirology* 41(2-3): 135-40.

Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Klenk, D. H., Garten, W., Lenz, O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles. *J Virol* 77(19): 10700-5.

Suchy, A., Weissenböck, H., Waller, R., Schmidt, P., Nowotny, N. (1997) Nachweis der Bornaschen Krankheit bei einem Pferd in Österreich. *Wien Tierärztl Mschr* 84:317-21.

- Terayama, H., Nishino, Y., Kishi, M., Ikuta, K., Itoh, M., Iwahashi, K. (2003). Detection of anti-Borna Disease Virus (BDV) antibodies from patients with schizophrenia and mood disorders in Japan. *Psychiatry Res* 120(2): 201-6.
- Thiedemann, N., Presek, P., Rott, R., Stitz, L. (1992). Antigenic relationship and further characterization of two major Borna disease virus-specific proteins. *J Gen Virol* 73 (Pt 5): 1057-64.
- Thierer, J., Riehle, H., Grebenstein, O., Binz, T., Herzog, S., Thiedemann, N., Stitz, L., Rott, R., Lottspeich, F., Niemann, H. (1992). The 24K protein of Borna disease virus. *J Gen Virol* 73 (Pt 2): 413-6.
- Trichtern, V. (1716). Pferd-Anatomie, oder Neu auserlesen vollkommen verbessert und ergänztes Roß Arzney Buch. *In* Verlegung des Autors. Gedruckt zu finden in Frankfurt und Leipzig bey A. J. Felßenecker 192-203.
- Vahlenkamp, T. W., Konrath, A., Weber, M., Müller, H. (2002). Persistence of Borna disease virus in naturally infected sheep. *J Virol* 76(19): 9735-43.
- VandeWoude, S., Richt, J. A., Zink, M.C., Rott, R., Narayan, O., Clements, JE. (1990). "A Borna virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioral diseases." *Science* 250(4985): 1278-81.
- Wagner, K., Ludwig, H. and Paulsen, J. (1968). Fluorescence serological demonstration of Borna virus antigen. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 81(19): 395-6.
- Walker, M. P., Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lipkin, W.I. (2000). Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol* 74(9): 4425-8.
- Wehner, T., Ruppert, A., Herden, C., Frese, K., Becht, H., Richt, J.A. (1997). Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues. *J Gen Virol* 78 (Pt 10): 2459-66.
- Weissenbock, H., Nowotny, N., Caplazi, P., Kolodziejek, J., Ehrensperger, F. (1998). Borna disease in a dog with lethal meningoencephalitis. *J Clin Microbiol* 36(7): 2127-30.
- Wensman, J.J., Berg, M. and Berg, A.L. (2008). Experiences of Borna disease virus infection in Sweden. *APMIS Suppl* (124): 46-9.
- Winkler (1883). Über die Ursachen der subakuten Gehirnentzündung. *Arch Wiss Prakt Tierhk* 9: 419-446.
- Zimmermann, W., Durrwald, R., Ludwig, L. (1994). Detection of Borna disease virus RNA in naturally infected animals by a nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 46: 133-43.

Zwick, W. and Seifried, O. (1925): Übertragbarkeit der seuchenhaften Gehirn- und Rückenmarksentzündung des Pferdes (Borna'schen Krankheit) auf kleine Versuchstiere (Kaninchen). Berl. Tierärztl. Wochenschr. 41: 129-132.

Zwick, W. (1939): Über die Bornasche Krankheit. Z Infkrkh Haustiere 54: 1-7.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hanns Ludwig für seine hervorragende Betreuung zur Thematik und Durchführung meiner Arbeit. Neben der hilfreichen fachlichen Unterstützung hat er mir durch seine Erfahrung in der Virologie und auf dem Bornavirus-Gebiet wertvolle Erkenntnisse mit auf den Weg gegeben.

Frau Privat-Dozentin Dr. Liv Bode vermochte mir, neben der Eingrenzung des Themas Ihren Erfahrungsschatz zur Serodiagnostik der Bornavirus Infektion zu vermitteln. Sie stellte mir freundlicherweise aus Ihrem Fachgebiet Serodiagnostik am Robert Koch-Institut über 130 definierte Humanseren zur Verfügung. Für ihre Kooperations- und Einsatzbereitschaft, die zahlreichen Anregungen und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung, möchte ich mich ganz herzlich danken.

Dr. Roman Stoyloff, der mich durch sein fachliches Wissen und seine ermutigenden Worte stets unterstützte, danke ich ebenfalls recht herzlich, insbesondere aber für seine Diskussionsbereitschaft und seine ansteckende Begeisterung, die stark zu der guten Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe, vor allem am RKI, beigetragen hat.

Frau Patrizia Reckwald sei besonderer Dank gesagt für die vielen technischen Hinweise und Frau Gülsüm Baykal, sowie Frau Christine Berndt, für die stetige freundschaftliche Betreuung im Labor.

Inga, Steffen, Niko, Thilo, Dennis und Steffi danke ich für viel einzelne Hilfestellungen und Ihren Beitrag zu einer wohltuenden Atmosphäre im Labor.

A mi familia en Cuba, a mis padres, que siempre han confiado en mí y me dieron la libertad de hacer de mi vida, todo lo que he querido. A mi hermano Osmel, que gracias a él, he podido vivir lejos de nuestros padres. Gracias nene por cuidar de los viejos. Para tí nene, que eres una de las cosas más grande que tengo en esta vida, van también mis mayores agradecimientos. Gracias.

Al Flaco Gleyder y al Gordo Wilfre, dos hermanos que me regaló la vida. Muchísimas gracias por el apoyo que siempre me han dado y por estar ahí cada vez

que los necesitos, eso, es tener una fortuna. Un abrazo.

A mi negrita y mi gallega linda, por la amistad que hemos construido en estos años, gracias Amarilis e Izarra, por el apoyo y por soportarme tanto.

Iris Marzinek, die mich immer unterstützt hat und diese Dissertation gewissenhaft korrigierte. Vielen, vielen Dank für alles.

Meiner deutschen Familie, Papa, Mama, Bianca und Anja spreche ich große Dankbarkeit aus für die Hilfe und Unterstützung in meinem Leben, für die Liebe und Geborgenheit, die sie mir geben und mich damit wie zu Hause fühlen lassen.

Meiner Perezosa danke ich für Ihr Vertrauen in mich, für ihre Liebe und ihr Verständnis, dann da zu sein, wenn ich ihre Hilfe brauchte. Mehr Unterstützung und Liebe sind kaum denkbar, dafür danke ich dir, Daniela, von Herzen. Mir ist bewusst, dass meine Worte immer noch zu wenig sind, um dir meine Liebe und Dankbarkeit zum Ausdruck zu bringen.

Nicht zuletzt möchte ich der Arbeitsgruppe von Prof. Ludwig am Institut für Virologie der FU Berlin, sowie der Bornavirus-Projektgruppe von Frau Dr. Bode am Robert Koch-Institut für die angenehme Zusammenarbeit, sowie die umfassende fachliche Unterstützung ganz herzlich danken.

Selbständigkeitserklärung

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 mündliche Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.