

Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire
ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 138 (1996)

Heft: 2

Artikel: RT-PCR : ein Hilfsmittel zur Herstellung von Klonen für die Staupeforschung

Autor: Graber, H.U. / Stettler, M. / Zurbriggen, A.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-589890>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 30.01.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

RT-PCR: Ein Hilfsmittel zur Herstellung von Klonen für die Staupeforschung

H. U. Graber, M. Stettler, A. Zurbriggen

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine adaptierte Methode der reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Dieses Verfahren diente als wichtiges Hilfsmittel zum Klonieren von Gensequenzen, die von Oligodendrozyten und Hundestaupavirus (CDV) stammten. Die erhaltenen Klone wurden unter anderem verwendet, um Sonden für die In-situ-Hybridisation herzustellen und die Nukleotidsequenz der fremden, eingebauten DNS zu bestimmen. Mit diesen molekularbiologischen Techniken war es möglich, die Entstehung der CDV-bedingten Entmarkung und der CDV-Persistenz im Zentralnervensystem besser zu verstehen.

Schlüsselwörter: PCR – Hundestaupavirus – Entmarkung – Pathogenese

RT-PCR: A tool for generating clones to be used in research on canine distemper

In the present work an adapted method of the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is described. This procedure was an important tool for cloning a variety of gene sequences derived from oligodendrocytes and canine distemper virus (CDV). Among other applications, the obtained clones were used to produce probes for in situ hybridization and to sequence the inserted DNAs. Due to these molecularbiological techniques new insights were gained into the pathogenesis of CDV-induced demyelination and CDV-persistence in the central nervous system.

Key words: PCR – canine distemper virus – demyelination – pathogenesis

Einleitung

Das hauptsächliche Forschungsgebiet unseres Labors ist die Pathogenese der Hundestaupe. Insbesondere sind wir an Mechanismen interessiert, welche im Verlaufe der Infektion mit dem Hundestaupavirus (CDV) zu Entmarkung führen, der typischen Veränderung im Zentralnervensystem (ZNS) der erkrankten Tiere. Solche Hirnläsionen treten nicht nur bei der Hundestaupe auf, sondern sind auch charakteristisch für die Multiple Sklerose (MS) des Menschen. Die Staupe gilt daher als Modell zum Studium der MS (Dal Canto und Rabinowitz, 1982), deren Ursache nach wie vor nicht bekannt ist.

Das CDV gehört zu den Morbilliviren und weist als Genom eine einzelsträngige, negativ gerichtete RNS auf, die für das NP-, P-, M-, F-, H- und L-Protein kodiert (Kingsbury, 1990). Das NP-Protein ist mit der genomischen RNS assoziiert und bindet an das M-Protein der Virushülle. Das L- und P-Protein bilden zusammen die RNS-abhängige RNS-Polymerase, die für die Virustranskription und -replikation notwendig ist. Das Oberflächlenprotein H ist verantwortlich für die Adsorption des Virus an die Wirtszelle, die mit Hilfe des F-Proteins penetriert wird. Nach meist aerogener Aufnahme verursacht das CDV eine ausgeprägte, zytolytische Infektion des lymphatischen Gewebes und bewirkt dadurch eine Immunsuppression. Durch die nachfolgende Virämie gelangt das CDV in di-

verse epitheliale Gewebe und dringt in das Zentralnervensystem ein. Dort repliziert es sich vorwiegend in den Astrozyten der weissen Substanz. Das Auftreten von segmentaler Entmarkung (Higgins et al., 1982), aber auch die verschiedenen in vitro- und in vivo-Beobachtungen von Oligodendrozytendegeneration nach CDV-Infektion (Zurbriggen et al. 1987; Blakemore et al., 1989) sprechen jedoch dafür, dass die myelinproduzierenden Zellen auch direkt durch das Virus geschädigt werden. Mittels immunhistochemischer Methoden (Vandeveldt et al., 1985) und Elektronenmikroskopie (Higgins et al., 1982; Summers und Appel, 1987) gelang es aber nur in sehr seltenen Fällen, das CDV in den Oligodendrozyten nachzuweisen. Wir begannen daher mit molekularbiologischen Methoden nach dem CDV in Oligodendrozyten zu suchen. Um solche Untersuchungen, insbesondere den Nachweis von Nukleinsäure mittels in situ Hybridisation (ISH), durchführen zu können, sind Genklone in bakteriellen Wirtsstämmen unentbehrlich, deren Genom CDV-, aber auch oligodendrozytenspezifische Gensequenzen enthalten. Zu deren Herstellung verwendeten wir als ersten Schritt die Methode der reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Dabei wird die gewünschte RNS mittels reverser Transkriptase (RT) in eine komplementäre DNS (cDNS) übersetzt. Diese wird durch PCR verstärkt und anschliessend kloniert.

In der vorliegenden Arbeit geht es darum, die Einzelheiten der RT-PCR, wie wir sie an unserem Institut verwenden, zu beschreiben und kurz eigene Forschungsergebnisse zu präsentieren, zu deren Erlangung die RT-PCR einen wesentlichen Beitrag leistete.

Material und Methoden

Hundehirnzellkulturen

Primäre Hirnzellkulturen von neonatalen Hunden (DBCC) werden hergestellt und unterhalten nach dem Protokoll von Zurbriggen et al. (1984). Eine allfällige Infektion der Kulturen mit dem virulenten CDV-Stamm A75/17 geschieht in der Regel zwischen dem 10. und 14. Tage nach Aussaat.

RNS-Isolation

Die Isolation von totaler RNS aus DBCC wird nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) durchgeführt.

Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

Für die RT-Reaktion (gesamtes Reaktionsvolumen = 25 µl) wird 0,5 µg RNS bei 70 °C während 10 Minuten erhitzt und anschliessend auf Eis abgekühlt. Danach werden dem Reaktionsgemisch die restlichen Substanzen zugegeben, so dass folgende Endkonzentrationen resultieren: 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 mM 1,4-Dithiothreitol, 0,8 U/µl RNase-Inhibitor (Boehringer Mannheim, Rotkreuz), 1 × RT-Puffer (Life Technologies, Basel) sowie 10 U/µl Moloney murine leukemia virus (MoMLV) reverse transcriptase (Life Technologies, Basel). Je nach Anwendung wird zudem der Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (Endkonzentration = 5,5 µM) oder der spezifische downstream-Primer (Endkonzentration = 2 µM) dazugegeben. Nach Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C wird die Reaktion durch Erhitzen (90 °C, 5 Minuten) gestoppt. 10 µl des Reaktionsproduktes werden für die nachfolgende PCR benötigt. Die Endkonzentrationen der übrigen Komponenten im Ansatz (100 µl) betragen 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 1 × Taq Puffer (P.H. Stehelin & CIE AG, Basel), 0,01 U/µl Taq Polymerase (P.H. Stehelin & CIE AG, Basel) und 0,2 µM für die beiden spezifischen Primer. Das Gemisch wird auf Eis hergestellt und anschliessend mit 100 µl Mineralöl (Sigma Chemie, Buchs) überschichtet. Nach einer initialen Denaturierung (94 °C, 5 Minuten) wird während der anschliessenden 30 Zyklen das folgende Temperaturprofil benötigt: 1 Minute 94 °C, 1 Minute 56 °C, 3 Minuten 74 °C. Die PCR wird beendet durch Inkubation bei 74 °C während 10 Minuten und Abkühlen auf 4 °C.

Herstellung der Genklone

In Abhängigkeit von den Primer- und Vektoreigenschaften werden die PCR-Produkte mit der «sticky end»-, «blunt end»- oder «TA cloning»-Methode in die verschiedenen Vektoren (pUC19, pSPT19, pCRTMII) ligiert. Die Ligationsprodukte werden anschliessend mittels Transformation in *E. coli* inkorporiert. Nach Auswahl der neu hergestellten Klone durch Blau/Weiss-Selektion und Restriktionsanalyse wird das Insert durch Sequenzieren überprüft.

Bestimmung der Nukleotidsequenzen

Die Sequenzanalyse erfolgt nach der Methode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung des «Sequense Kit Version 2.0» (USB Lucerna Chem AG, Luzern). Die praktische Durchführung der Sequenzbestimmung ist bei Stettler und Zurbriggen (1995) beschrieben.

Herstellung von nichtradioaktiven Sonden für In-situ-Hybridisation

Zu diesem Zweck werden die PCR-Produkte in den pSPT19- (Boehringer Mannheim, Rotkreuz) oder pCRTMII-Vektor (Invitrogen, San Diego, USA) kloniert. Diese Vektoren enthalten Promotoren für die T7- und SP6-Polymerasen, die benutzt werden, um aus der klonierten DNS Digoxigenin-markierte RNS-Sonden zu synthetisieren. Die Details der Herstellung sind bei Graber et al. (1993) beschrieben.

In-situ-Hybridisation

Die ISH zur Bildung von RNS-RNS-Hybriden erfolgt nach publizierten Protokollen (Graber et al., 1993; Graber et al., 1995). Danach werden die Digoxigenin-markierten Sonden unter wenig stringenten Bedingungen hybridisiert. Die überschüssige, einzelsträngige RNS wird anschliessend mittels RNasen digestiert und schwach haftende Hybride durch stringentes Waschen entfernt. Für die Farbreaktion wird ein anti-Digoxigeninantikörper gebraucht, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Boehringer Mannheim, Rotkreuz). Durch die katalytische Reaktion dieses Enzyms entsteht aus Nitro Blue Tetrazolium und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat ein violettes Präzipitat. Die Auswertung erfolgt mittels Lichtmikroskopie, zum Teil unter densitometrischer Auswertung des ISH-Reaktionsproduktes (Graber et al., 1995).

Resultate

Im folgenden soll an drei Beispielen gezeigt werden, wozu Genklone unter anderem benötigt werden können. Zu deren Herstellung gelangte als wichtiger Teilschritt stets die RT-PCR zur Anwendung.

Legende zu Figur 1

A) Paraffinschnitt: Nachweis von Hundestaupevirus (CDV) in der Hirnrinde eines staupekranken Hundes. Massive Virusinfektion in grauer und weisser Substanz. Nichtradioaktive *in situ* Hybridisation (ISH) mit einer RNS-Sonde, die spezifisch die P-mRNS des CDV erkennt (150 \times).

B) - D) Zellkulturen

B) Primäre Hundehirnzellkulturen 14 Tage nach Infektion mit CDV: Ansammlung von infizierten Zellen. Nichtradioaktive ISH mit einer RNS-Sonde spezifisch für die P-mRNS des CDV. Differentialinterferenz-Kontrastmikroskopie (DIC, 250 \times).

C) Primäre Hundehirnzellkulturen 40 Tage nach Aussaat: stark markierte Oligodendrozyten. Nichtradioaktive ISH unter Verwendung einer RNS-Sonde spezifisch für Proteolipid Protein-mRNS (DIC, 100 \times).

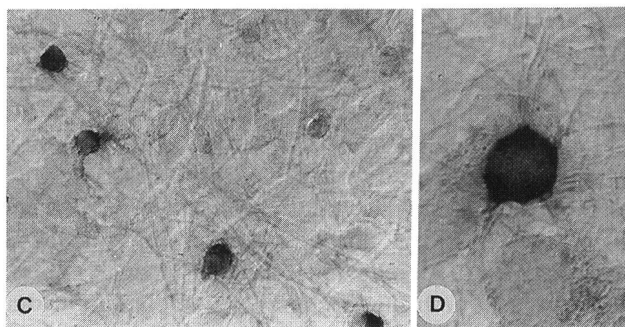
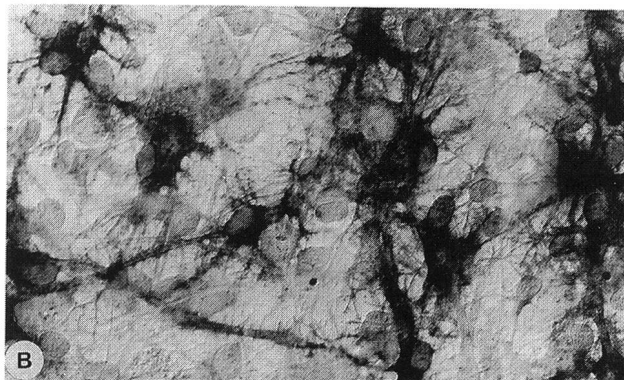
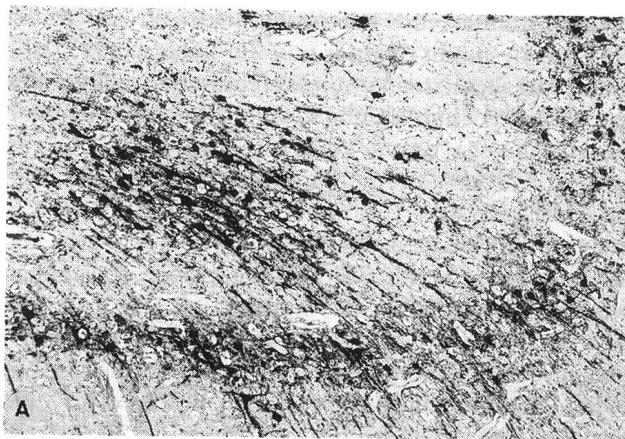
D) Primäre Hundehirnzellkulturen 40 Tage nach Aussaat: Stärkere Vergrößerung eines Oligodendrozyten mit deutlicher Markierung des Zytoplasmas, nicht aber der Zellfortsätze. Nichtradioaktive ISH wie bei C) (DIC, 1250 \times).

Restriktive Oligodendrozyteninfektion

Durch ISH unter Verwendung von RNS-Sonden konnte *in vitro* erstmals die Präsenz von CDV-Nukleinsäure in Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Zurbriggen et al., 1993). Spätere Untersuchungen zeigten überdies, dass das gesamte Virusgenom in diesen Zellen vorhanden ist (Graber et al., 1995). Der Nachweis von Virus-mRNS in Oligodendrozyten belegt zudem, dass das CDV in diesen Zellen transkribiert wird (siehe auch Figur 1A und 1B). Interessanterweise wiesen aber nur 1% der CDV-infizierten Oligodendrozyten virusspezifische Antigene auf. Auch gelang es mittels Elektronenmikroskopie nur in sehr seltenen Fällen, in diesen Zellen CDV-Partikel nachzuweisen (Higgins et al., 1982; Summers und Appel, 1987). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass das CDV in Oligodendrozyten eine restriktive Infektion verursacht. Diese Art der Zellinfektion ist möglicherweise dafür mitverantwortlich, dass das CDV im Zentralnervensystem persistiert. Auch spielt sie wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei allen chronisch verlaufenden, entzündlichen Entmarkungskrankheiten, die durch Viren induziert werden.

Myelingenexpression

Mittels densitometrischer Auswertung der ISH-Produkte konnten wir zeigen (Graber et al., 1995), dass durch die restriktive Infektion die Oligodendrozyten *in vitro* deutlich geringere Mengen von mRNSs herstellen, die für



myelinspezifische Proteine wie Proteolipid Protein (PLP) oder Myelin Basisches Protein (MBP) kodieren (siehe auch Figur 1C und D). Dieser Rückgang tritt auf, lange bevor morphologische Veränderungen sichtbar werden. Die vorgestellten Resultate sprechen stark dafür, dass die Entmarkung, wie sie bei der Hundestaube vorkommt, durch die restriktive CDV-Infektion der Oligodendrozyten verursacht wird. Dadurch wird die Expression diverser zellulärer Gene (insbesondere der Myelingene) deutlich vermindert. Als Folge davon sind die infizierten Zellen nicht mehr in der Lage, alle Membranbestandteile herzustellen, die notwendig sind, um die strukturelle Integrität aufrechtzuerhalten.

Sequenzuntersuchungen

Untersuchungen *in vitro* deuteten darauf hin, dass das NP-Protein (Hamburger et al., 1991) und möglicherweise das M-Protein des CDV eine wichtige Rolle spielen bei der Entstehung der persistenten Infektion des ZNS. Aus

diesem Grunde wurde vorerst die Nukleotidsequenz des NP-Gens bestimmt (Stettler und Zurbriggen, 1995) und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz mit derjenigen eines CDV-Impfstammes (OP-CDV) verglichen, von dem bekannt ist, dass er keine persistente Infektion verursacht. Von den 22 Aminosäureänderungen (total 523 Aminosäuren) traten 10 in der N-terminalen und 12 in der C-terminalen Region auf. Im hoch konservierten Mittelteil dagegen waren keine Unterschiede feststellbar. Nur die Mutationen im C-terminalen Bereich, insbesondere das Austauschen von Valin gegen Prolin, führten zu bedeutenden Änderungen der Sekundärstruktur. Wir vermuten daher, dass diese Region des Proteins eine wichtige Rolle spielt bei der Entstehung der Persistenz. Hingegen scheint das M-Protein eher wenig zur Bildung einer persistenten CDV-Infektion des ZNS beizutragen, denn von den 335 Aminosäuren traten beim virulenten Virus nur 13 Modifikationen auf, die sich über die ganze Proteinelänge verteilten. Zudem beeinflussten die Änderungen nur geringgradig die Sekundärstruktur des Proteins.

Diskussion

Verglichen mit der Herstellung einer cDNS library und anschliessender, langwieriger Selektion der Klone (Huynh et al., 1985), bietet die RT-PCR als Hilfsmittel für das Klonieren von gewünschten Gensequenzen deutliche Vorteile. Dies rührt vor allem daher, dass durch PCR und entsprechende Primer nur der spezifische Genabschnitt ausgewählt und vermehrt wird, wodurch sich die nachträgliche Suche nach den gewünschten Klonen beträchtlich vermindert. Ein wesentlicher Teil der Selektion wird somit bereits mit der PCR vorgenommen. Zudem wird durch die hochgradige Amplifikation der spezifischen Gensequenz deren Einbau in einen Vektor deutlich bevorzugt und erleichtert (Sambrook et al., 1989). In unserem Labor konnten wir die Klonierungseffizienz zusätzlich noch erhöhen, seitdem wir das «TA Cloning™»-System verwenden (Invitrogen, San Diego, USA). Zu den Vorteilen dieses Kits gehören unter anderem, dass dessen Komponenten aufeinander abgestimmt und getestet sind. Eigene, zum Teil aufwendige Optimierungen und Qualitätskontrollen entfallen somit. Der wesentliche Vorteil liegt jedoch in den Eigenschaften des mitgelieferten pCR™II-Vektors. Dieser liegt bereits in linearisierter Form vor und weist an beiden 3'-Enden einen Überhang von einem Desoxythymidin-Nukleotid auf. Bedingt durch die Eigenschaft der Taq-Polymerase, am 3'-Ende der neu gebildeten DNS ein zusätzliches Desoxyadenosin-Nukleotid anzuhängen (Clark, 1988), gestaltet sich der Einbau des PCR-Produktes in den Vektor leicht. Zusätzlich verfügt dieser Vektor über Promotoren für die DNS-abhängigen SP6- und T7-RNS-Polymerasen. Dadurch ist für die Herstellung von RNS-Sonden eine Umklonierung nicht mehr notwendig. Nach Rappolee (1990) hängt die Sensitivität der RT-PCR von der RNS-Ausgangsmenge, der eigentlichen PCR und

insbesondere von der Effizienz der RT-Reaktion ab. Diese ist gering, wenn die RNS gehäuft Sekundärstrukturen aufweist, so dass die reverse Transkription durch herkömmliche Enzyme bei 40 °C kaum möglich ist (Rolfs et al., 1992). Kürzlich wurde jedoch die hitzestabile, «recombinant *Thermus thermophilus* (rTth) DNA Polymerase» entdeckt (Perkin Elmer, Rotkreuz), die unter speziellen Reaktionsbedingungen zusätzlich eine hohe RT-Aktivität aufweist. Die erhöhte Inkubationstemperatur für dieses Enzym führt nicht nur zur Destabilisierung vieler RNS-Sekundärstrukturen, sondern auch zu grösserer Spezifität der Primerhybridisation und der anschliessenden Kettenreaktion.

In unserem Labor hat sich die beschriebene Methode der RT-PCR bewährt, war sie doch ein wichtiges Hilfsmittel für die Erzeugung einer beträchtlichen Anzahl von Klonen. Diese Klone verwendeten wir unter anderem zur Herstellung von Sonden für die ISH und zur Nukleotidsequenzbestimmung von CDV-Genen (NP- und M-Gen). Kürzlich haben wir auch Klone von *E. coli* produziert, die es gestatten, das ganze oder Teile des NP zu exprimieren. Diese molekularbiologischen Techniken erlaubten es, neue Einblicke in die Entstehung der CDV-induzierten Entmarkung und der Viruspersistenz im ZNS zu erlangen, möglicherweise von Bedeutung für das Verständnis der Multiplen Sklerose.

Literatur

- Blakemore W.E., Summers B.A., Appel M.G. (1989): Evidence of oligodendrocyte infection and degeneration in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 77, 550-553.
- Chomczynski P. und Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Clarc J.M. (1988): Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* 20, 9677-9686.
- Dal Canto M.C., Rabinowitz S.G. (1982): Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system. *Ann. Neurol.* 11, 109-127.
- Graber H.U., Zurbriggen A., Vandeveld M. (1993): Identification of canine glial cells by nonradioactive in situ hybridization. *J. Vet. Med.* 40, 665-671.
- Graber H.U., Müller C.F., Vandeveld M., Zurbriggen A. (1995): Restricted infection with canine distemper virus leads to downregulation of myelin gene transcription in oligodendrocytes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 90, 312-318.
- Hamburger D., Griot C., Zurbriggen A., Örvell C., Vandeveld M. (1991): Loss of virulence of canine distemper virus is associated with a structural change recognized by a monoclonal antibody. *Experientia* 47, 842-845.
- Higgins R.J., Krakowka S.G., Metzler A.E., Koestner A. (1982): Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalitis in gnotobiotic dogs. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 58, 1-8.
- Huynh T.V., Young R.A., Davis R.W. (1986): Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. In *DNA cloning: a practical approach*. (Glover D.M., ed.) Vol 1, pp. 49-78. IRL Press Limited, Oxford.
- Kingsbury D.W. (1990): Paramyxoviridae and their replication. In *Virology*. 2nd ed. (Fields B.N., ed.) pp. 945-962. Raven Press, New York.

Rappolee D.A. (1990): Optimizing the sensitivity of RT-PCR. Amplifications: A Forum for PCR Users 4, 5-7.

Rolfs A., Schuller I., Finckh U., Weber-Rolfs I. (1992): 9. Reverse Transcription PCR (RT-PCR). In PCR: clinical diagnostics and research. pp. 99-111. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): Strategies for cloning in plasmid vectors. In Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed., pp. 1.53-1.67. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

Stettler M., Zurbriggen A. (1995): Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. Vet. Microbiol., 44, 211-217.

Summers B.A., Appel M.J. (1987): Demyelination in canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. J. Neurocytol. 16, 871-881.

Vandeveld M., Zurbriggen A., Dumas M., Palmer D. (1985): Canine distemper virus does not infect oligodendrocytes in vitro. J. Neurol. Sci. 69, 133-137.

Zurbriggen A., Vandeveld M., Beranek C.F., Steck A. (1984): Morphological and immunocytochemical characterisation of mixed

glial cell cultures derived from neonatal canine brain. Res. Vet. Sci. 36, 270-275.

Zurbriggen A., Vandeveld M., Dumas M., Griot C., Bollo E. (1987): Oligodendroglial pathology on canine distemper virus infection in vitro. Acta Neuropathol. (Berl.) 74, 366-373.

Zurbriggen A., Yamawaki M., Vandeveld M. (1993): Restricted canine distemper virus infection of oligodendrocytes. Lab. Invest. 68, 277-284.

Dank

Die Autoren danken Dr. R. Fatzer für die kritische Überprüfung des vorliegenden Beitrages.

Die Arbeit wurde unterstützt durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Gesuchsnummer 31-29332.90) und durch das Bundesamt für Veterinärwesen (Gesuchsnummer 012.92.4).

Korrespondenzadresse: PD Dr. A. Zurbriggen, Institut für Tierneurologie, Bremgartenstrasse 109a, CH-3012 Bern