

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-gestützter 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 Probandenseren.....	48
2.2.13.2.1 Tierseren.....	48
2.2.13.2.2 Humansenen.....	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