

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	1
2	Abkürzungen	7
3	Veröffentlichter Artikel	12
4	Einleitung	13
5	Zielsetzung	15
6	Literaturübersicht	16
6.1	Genom des BT Virus	16
6.2	Übertragungswege des BT Virus	18
6.3	Pathogenese und klinisches Bild der BTV Erkrankung	19
6.4	BTV epidemisch	21
6.5	BTV Situation Europa	21
6.5.1	BTV-8	21
6.5.2	BTV-4	22
6.5.3	BTV-3/1/16	22
6.5.4	BTV-8 Epidemie Deutschland 2006-2010	22
6.5.5	Risikobewertung Einschleppung der BT 8 und der BT 4 Viren in Deutschland	29
6.6	Zellbiologische Untersuchungsmethoden in der BTV Diagnostik	29
6.6.1	Vermehrung der BT Viren für den diagnostischen Einsatz	29
6.6.2	Virusisolierung in Hühnerembryonen	29
6.6.3	Virusisolierung in Zellkulturen	30
6.6.4	Virusisolierung in Schafen (Versuchstier)	30
6.7	Methode zum direkten Nachweis von BT Viren in der BTV Diagnostik	30
6.7.1	Elektronenmikroskopie	30

6.8	Amtliche Nachweisverfahren BTV	31
6.8.1	Amtliche Methodensammlung Blauzungenkrankheit des FLI	31
6.8.2	Methodensammlung OIE	31
6.9	Nukleinsäurenachweis BTV	31
6.9.1	PCR-Technologie	31
6.9.2	Hybridisierung	32
6.10	Immunologische Untersuchungsmethoden	32
6.10.1	Virusneutralisationstest/Plaqueneutralisationstest	32
6.10.2	Immunfluoreszenz-Verfahren	32
6.10.3	Hämagglutinationstest/Hämagglutinationshemmtest	33
6.10.4	Agargelimmundiffusionstest (AGID)	33
6.10.5	Komplementbindungsreaktion (KBR)	33
6.10.6	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	33
6.10.7	Kompetitiver ELISA (Blocking-ELISA)	34
6.10.8	Polyklonaler Sandwich-ELISA	35
6.10.9	Monoklonaler BTV-8 Sandwich-ELISA	36
7	Material und Methoden	38
7.1	BTV Antigen Herstellung und Aufbereitung	38
7.1.1	BTV Antigen Herstellung	38
7.1.2	Ausfällung der Virusproteine mit Ammoniumsulfat	38
7.1.3	Ultrazentrifugation (PEI)	38
7.1.4	Präzipitation	39
7.1.5	Resolubilisierung	39
7.1.6	Ultrazentrifugation	39
7.2	Antikörperformate	39
7.3	Verwendete Expressionsvektoren	43

7.3.1	Aufbau der Vektoren	43
7.4	Primer	46
7.5	Mutagenese Primer	47
7.6	Zelllinien, Bakterien und Zellkulturen	49
7.7	Zellkulturen	50
7.8	Kultivierung der Zellen	50
7.9	Molekularbiologische Methoden	50
7.9.1	Polymerase-Kettenreaktion	50
7.9.2	Durchführung der PCR	51
7.9.3	Agarose-Gelelektrophorese	52
7.9.4	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts und der Reinheit	52
7.9.5	Sequenzierung	53
7.9.6	Plasmidpräparation	53
7.9.7	Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten	54
7.9.8	Hitzeschocktransformation von E. coli	55
7.9.9	Ortsgerichtete Mutagenese	57
7.10	Proteinbiochemische Methoden	58
7.10.1	Prokaryotische Antikörperexpression	58
7.10.2	Aufreinigung der Antikörperfragmente mittels immobilisiertem Metallchelat	59
7.10.3	Herstellung der scFv-Fc-Fusionsproteine	61
7.10.4	Transfektion scFv-Fusionsprotein kodierender Plasmide in HEK 293T Zellen	62
7.10.5	ELISA-basierende Bindungsanalysen der scFv-Fc-Fusionsproteine	62
7.10.6	Herstellung und Charakterisierung von Fabfragmenten	63
7.11	Phage-Display	64

7.11.1	Tomlinson-Bibliotheken I und J	65
7.11.2	Aufbau der Phagen	65
7.11.3	Helferphage	66
7.11.4	Hyperphage	67
7.11.5	Produktion der scFv-präsentierenden Phagen	67
7.11.6	Panning/Selektion	69
7.12	Polyklonaler ELISA	72
7.13	Monoklonaler ELISA	72
7.14	Aufbau des BTV Sandwich-ELISAs	73
7.15	Validierung der BTV Sandwich-ELISA's	74
7.16	Untersuchung der Serogruppen BTV-1/ BTV-4, BTV-8 und BTV-16 im BTV-8 ELISA auf Bindungsaffinität	74
7.17	Datenanalyse	75
8	Ergebnisse	76
8.1	BT 8 Viruspartikel-Aufreinigung	76
8.2	Polyklonale Analyse der selektierten Antikörperfragmente	76
8.2.1	Graphische Darstellung der Affinitäts- bzw. Bindungs- anreicherung	76
8.2.2	Bestimmung des Input/Output Titers	78
8.3	Monoklonaler Phagen-ELISA	80
8.4	Sequenzierung der Klone	82
8.5	Herstellung der scFv-Fusionsproteine	84
8.6	Eukaryotische Herstellung der scFv-Fusionsproteine	85
8.7	Bindungsanalyse der scFv-Fusionsproteine im ELISA	86
8.8	Ermittlung der BTV-8 Nachweisgrenze der scFc-Fusionsproteine	87
8.9	Nachweis von BTV-8 Viruspartikeln im infizierten Schaf	89
8.10	Produktion von Fabfragmenten	91

8.11	Aufbau der BTV Sandwich-ELISAs	92
8.12	Sandwich-ELISA-Kontrollen	92
8.13	Spezifische Detektion von BT 8 Viren im Schafserum mittels Sandwich-ELISA	95
8.14	Nachweisgrenze des Sandwich-ELISA	97
8.15	Überprüfung der BTV Serogruppen 1/4/8 und 16 im ELISA	100
9	Diskussion	102
9.1	BTV Antikörper	103
9.2	Direkter BTV Nachweis über Sandwich-ELISA	104
9.3	Vorteile beim Einsatz von rekombinanten BTV Sandwich-ELISAs	105
9.4	BTV Nukleinsäurenachweis	107
9.5	Klassische BTV Nachweistechiken	109
9.6	Validierung des BTV Sandwich-ELISAs	112
9.7	BTV Epidemiesituation	112
9.8	Ausblick	117
10	Zusammenfassung	118
11	Summary	119
12	Verzeichnisse	120
12.1	Literaturverzeichnis	120
12.2	Abbildungsverzeichnis	132
12.3	Tabellenverzeichnis	139
13	Anhang	141
13.1	Protokoll BTV Aufreinigung	141
13.2	Verbrauchsmaterialien, Puffer, Nährböden und Lösungen	142
13.3	Reagenzien	146
13.3.1	Antikörper	146
13.3.2	Bakterienstämme	146

13.4	Enzyme	147
13.5	Medien	148
13.6	Molekulargewichtsmarker	148
13.7	Primer	149
13.8	Primer Ortsgerichtete Mutagenese	150
13.9	Puffer und Lösungen	150
13.10	Reaktionskits	152
13.11	Zelllinien	153
13.12	Software	154
13.13	Geräte	154
14	Danksagung	156