

**Aus der Abteilung für Virologie
des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin, Hamburg
Prof. Dr. H. Schmitz**

**Nachweis hantaspezifischer Antikörper gegen die Nucleocapsidproteine der beiden
Hantaviren Puumala und Hantaan
in humanen Seren**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Ole Rathje
aus Kiel**

**Hamburg
2001**

**Nachweis hantaspezifischer Antikörper gegen die
Nucleocapsidproteine der beiden
Hantaviren Puumala und Hantaan
in humanen Seren**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hantaviren – ein geschichtlicher Rückblick	1
1.2	Taxonomie der Hantaviren.....	3
1.3	Epidemiologie der Hantaviren	8
1.4	Pathogenese.....	12
1.5	Diagnose der Hantavirusinfektion.....	15
1.6	Ziel der Arbeit.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.2	Allgemeine molekularbiologische Methoden	35
2.2.1	Aufzucht und Lagerung von Klonen	35
2.2.2	Sterilisieren von Geräten und Lösungen	35
2.2.3	Herstellung kompetenter Zellen	35
2.2.4	Kompetenzbestimmung.....	36
2.2.5	Plasmid-DNA Präparation.....	36
2.2.6	DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen	37
2.2.7	DNA-Ligation.....	37
2.2.8	Transformation	37
2.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.10	Erstellung der Glasmilch	38
2.3	Klonierung der NC.....	38
2.3.1	RNA-Isolierung aus infizierter Vero-E6-Zellkultur	38
2.3.2	Reverse Transkription	38
2.3.3	Polymerasekettenreaktion.....	39
2.3.4	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	40
2.3.5	Elution von DNA aus Agarosegelen	40
2.3.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	40

2.4	DNA-Sequenzierung	41
2.4.1	DNA-Denaturierung	41
2.4.2	Vorbereiten der Sequenzierung	42
2.4.3	Sequenzreaktion	42
2.4.4	Analyse der Sequenzierung	43
2.5	Proteinbiochemische Methoden	43
2.5.1	Präparation von denaturiertem NC-Rohextrakt aus <i>E.coli</i>	43
2.5.2	Chromatographische Aufreinigung von denaturiertem NC-Protein.....	43
2.5.3	Präparation von nativem NC-Rohextrakt aus <i>E. coli</i>	44
2.5.4	Chromatographische Aufreinigung von nativem NC-Protein.....	44
2.5.5	Dialyse und Ultrafiltration des gereinigten NC-Proteins	45
2.5.6	Reaktivierung des Ni ⁺ -Sepharsematerials	45
2.5.7	SDS-Page.....	45
2.5.8	Western Blot - Proteintransfer.....	47
2.5.9	Western Blot - Immunreaktion.....	48
2.5.10	Proteinmengenbestimmung	48
2.5.11	Verdrängung des unspezifischen Hintergrundes bei der Immunreaktion ...	49
2.6	Zellbiologische Methoden.....	49
2.6.1	Zellkultur	49
2.6.2	Generationswechsel der Vero E6-Zellen.....	50
2.6.3	Vero E6-Zellen einfrieren und auftauen.....	50
2.6.4	Vero E6-Zellen mit HTV infizieren	50
2.6.5	Immunfluoreszenztest (IFT, IFA) infizierter Zellkulturen.....	51
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Isolation und Klonierung der codierenden Sequenzen viraler Proteine.....	53
3.2	Isolierung und Amplifikation hantaviraler RNA	53
3.3	Klonierung in einen prokaryontischen Expressionsvektor	57
3.4	Sequenzbestimmung	61
3.5	Expression und Proteinpräparation der rekombinanten Nucleocapsidproteine .	66
3.5.1	Expression der rekombinanten Nucleocapsidproteine	66
3.5.2	Denaturierende Proteinpräparation.....	69
3.5.3	Native Proteinpräparation.....	69

3.6	Metallchelatchromatographische Proteinaufreinigung	70
3.6.1	Aufreinigung von denaturiertem NC-Protein	71
3.6.2	Aufreinigung von nativem NC-Protein	72
3.7	Einsatz der erstellten Proteine in Blotverfahren.....	74
3.7.1	Darstellung der NC-Proteine aus infizierter Vero E6-Zellkultur und der rekombinanten NC-Proteine durch Kontrollseren im Western Blot	74
3.7.2	Nachweis von Antikörpern gegen Hantaviren mit rekombinanten Nucleocapsidproteinen im Western Blot.....	77
3.7.3	Nachweis von HTV-spezifischen Antikörpern im Dot Blot-Verfahren.....	79
4	Diskussion	85
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung eines Bunyaviruspartikels.	5
Abb. 2:	Schematische Übersicht über den Aufbau der S-Segmente der beiden HTV-Serotypen PUU Hällnäs B1 und HTN 76-118	7
Abb. 3:	geographisches Verbreitungsgebiet der Brandmaus und Rötelmaus.....	9
Abb. 4:	Auftreten von HTV-Infektionen in Deutschland	12
Abb. 5:	SDS-Page der kompletten NC-Proteine NC HTN II und NC PUU II.....	47
Abb. 6:	PUUV-infizierte Vero E6-Zellkultur im IFT	52
Abb. 7:	Klonierungsstrategie exemplarisch für das HTN-Nucleocapsidprotein	54
Abb. 8:	PCR der kompletten codierenden Sequenz der NC-Proteine	55
Abb. 9:	PCR der N-terminalen 348 bp der codierenden Sequenz der NC-Proteine....	56
Abb. 10:	Schematische Übersicht über den Aufbau des Plasmids pET22b.	57
Abb. 11:	Gelelektrophoretische Trennung der Fragmente der Expressionskonstrukte pPUUII und pHTNII nach Restriktionsverdau	59
Abb. 12:	Gelelektrophoretische Trennung der durch Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente der Expressionskonstrukte NC PUU 348 und NC HTN 348.....	60
Abb. 13:	Schematische Darstellung der Sequenzierungsstrategie für die NC-Proteine der beiden Serotypen HTN und PUU	61
Abb. 14:	cDNA-Sequenz des Klons pPUUII.....	62
Abb. 15:	cDNA-Sequenz des Klons pPUU348	63
Abb. 16:	cDNA-Sequenz des Klons pHTNII, bzw. pHTN348.	63
Abb. 17:	Expression der beiden kompletten NC-Proteine NCHTNII und NCPUII...66	
Abb. 18:	Expression der beiden trunkierten NC-Proteine NC HTN348 und NC PUU348.....	67
Abb. 19:	Elektronenmikroskopische Darstellung der <i>inclusion bodies</i>	68
Abb. 20:	Darstellung der denaturierenden Proteinpräparation exemplarisch für das NC PUU II.	69
Abb. 21:	Darstellung der nativen Proteinpräparation exemplarisch für das Nucleocapsidprotein NC HTN II.....	70
Abb. 22:	metallchelatchromatographische Aufreinigung der nativen trunkierten NC-Proteine NC HTN348 und NC PUU348	73
Abb. 23:	Western Blot der Expressionskulturen NC HTN II und NC PUU II.....	75
Abb. 24:	Western Blot der Expressionskulturen NC HTN 348 und NC PUU 348	75

Abb. 25: Western Blot infizierter Vero E6-Zellkulturen	76
Abb. 26: Western Blot einer mit PUUV infizierten Vero E6-Zellkultur, Nachweis der G-Proteine	77
Abb. 27: Streifen-Western Blot der kompletten NC-Proteine	78
Abb. 28: Streifen-Western Blot der trunkierten NC-Proteine.	79
Abb. 29: Aufbau eines Dot Blot-Streifens	80
Abb. 30: Dot Blot-Versuchsreihe mit 31 Patientenseren.....	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bunyaviridae	3
Tabelle 2: Hantavirus-Serotypen	3
Tabelle 3: genusspezifische Konsensus-Sequenzen der S-, M- und L-Segmente exemplarisch aufgeführt für das Hantaan-Virus	6
Tabelle 4: Wichtige Vertreter der HTV und ihre Hauptwirte	8
Tabelle 5: Ablauf der PCR der vollständigen NC-Proteine	55
Tabelle 6: Ablauf der PCR der trunkierten NC-Proteine	56
Tabelle 7: Nukleotidaustausche und daraus resultierende Aminosäureaustausche in den jeweiligen Nucleocapsidproteinen/-fragmenten	65
Tabelle 8: Homologien der erstellten Klone im Vergleich zu den publizierten Originalsequenzen PUU Hällnäs B1 und HTN 76-118.	65
Tabelle 9: aufgereinigte Proteinmenge aus einem 500ml-Kulturansatz	74
Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse des Blindversuchs	83

1 Einleitung

1.1 Hantaviren – ein geschichtlicher Rückblick

Der Überbegriff Hantavirus-Erkrankung, bzw. *Hantavirus Disease* (HTVD) umfaßt die von Hantaviren (HTV) hervorgerufenen Krankheitsbilder *Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom* (HFRS), *Nephropathia Epidemica* (NE) und *Hanta Pulmonales Syndrom* (HPS).

1.1.1 Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom (HFRS)

Das Krankheitsbild des HFRS wurde erstmals 1913 erwähnt, als russischen Wissenschaftlern im Amur-Flußtal teilweise sporadisches, aber auch endemisches Auftreten von Fieber, in Verbindung mit generalisierten Hämorrhagien und akutem Nierenversagen, aufgefallen war (Warner, 1996).

In den 40er Jahren injizierten japanische Wissenschaftler menschlichen Testpersonen und Affen bakterienfreies Serum von Patienten mit HFRS-Symptomatik. Die Probanden zeigten daraufhin das typische HFRS-Krankheitsbild. Dieser Versuch lieferte den Beweis, daß es sich bei der zum damaligem Zeitpunkt als *epidemisches hämorrhagisches Fieber* (EHF) bezeichneten Erkrankung um eine virale Infektionskrankheit handeln mußte (Kasahara et al., 1943).

Im Koreakrieg (1950-1953) erkrankten mehrere Tausend Soldaten und Zivilisten an einer Krankheit, die als *Koreanisches Hämorrhagisches Fieber* (KHF) bezeichnet wurde. Der Erreger konnte 20 Jahre später im Lungengewebe der Brandmaus (*Apodemus agrarius koreae*) nachgewiesen werden und wurde nach dem Grenzfluß *Han* zwischen Nord- und Südkorea als *Hantaan-Virus* bezeichnet (Lee et al., 1978).

Das KHF, wie auch das *epidemisches hämorrhagische Fieber* (EHF), die *haemorrhagische Nephroso-Nephritis* und weitere durch Hantaviren hervorgerufene hämorrhagische Erkrankungen mit Nierenbeteiligung (Hart und Bennett, 1994) werden heute einheitlich unter dem Begriff HFRS zusammengefaßt.

1.1.2 Nephropathia epidemica (NE)

Das erstmals 1934 in Skandinavien beschriebene und seit 1945 als *Nephropathia Epidemica* (NE) bezeichnete Krankheitsbild zeigt sowohl klinisch als auch epidemiologisch Gemeinsamkeiten mit dem HFRS. 1979 gelang es Lee und Mitarbeiter über Kreuzreaktionen im Immunfluoreszenz Assay (IFT) die vermutete

Verwandtschaft des *Hantaan-Virus* (HTNV) mit dem später als *Nephropathia Epidemica Virus* (NEV), bzw. *Puumala-Virus* (PUUV) bezeichneten Erreger der NE zu belegen (Lee et al., 1979). Ein Jahr später konnte dieses Virus erstmals im Lungengewebe von Rötelmäusen (*Clethrionomys glaerolus*) nachgewiesen werden, indem mit Seren von Patienten die an der NE erkrankt waren an Lungengewebeproben von Rötelmäusen ein IFT durchgeführt worden ist (Brummer-Korvenkontio et al., 1980).

In der heutigen Literatur wird die NE häufig nicht als eigenständige Erkrankung angesehen, sondern als milde Ausprägungsform des HFRS bezeichnet und ihr untergeordnet.

1.1.3 Hanta Pulmonales Syndrom (HPS)

1993 erkrankten in der *Four Corner Region* in der sich die Grenzen der 4 US-Bundesstaaten New Mexico, Arizona, Colorado und Utah treffen mehrere Ureinwohner gleichzeitig an dem *Adult Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), einer schwer verlaufenden Erkrankung der Lunge. Trotz der im Vergleich zur HFRS und der NE andersartigen Symptomatik wurde als Erreger ein Virus identifiziert, welches genomisch eindeutig den *Hantaviren* zugeordnet werden konnte. Es erhielt 1995 den Namen *Sin Nombre Virus* (SNV, vormals *Muerto Canyon Virus* (MCV) oder *Four Corner Virus* (FCV)), die Erkrankung wurde nachfolgend als Hanta Pulmonales Syndrom, bzw. *Hanta Pulmonary Syndrom* (HPS) bezeichnet.

Neben dem SNV konnten seit 1993 in Nordamerika noch weitere Serotypen der Hantaviren isoliert werden, die ein dem HPS ähnliches, jedoch meist milderes Krankheitsbild hervorrufen und daher als SN-ähnliche Viren bezeichnet werden (siehe Kap. 1.2.2, Tabelle 2).

Nachdem 1996 das in Südamerika beheimatete HPS-auslösende *Andes Virus* (ANDV) aus Patienten isoliert werden konnte (López et al., 1996), kam es Ende 1996 in der argentinischen Kleinstadt El Bolsón zu einer ungewöhnlicher Hantavirusepidemie mit diesem Serotyp. Anhand epidemiologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß bei diesem Ausbruch wahrscheinlich die Übertragung von Mensch-zu-Mensch eine entscheidene Rolle spielte. Dieser Übertragungsweg ist bislang für kein anderes Hantavirus beobachtet worden (Wells et al., 1997).

1.2 Taxonomie der Hantaviren

1.2.1 Bunyaviridae

Die mehr als 350 Virusarten umfassende Familie der *Bunyaviridae* setzt sich zusammen aus 5 übergeordneten Genera (Gonzalez-Scarano und Nathanson, 1990 und 1996) und ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Bunyaviridae

Familie	Bunyaviridae
Genera	Bunyaviren
	Nairoviren
	Phleboviren
	Uukuviren
	Hantaviren

1.2.2 Hantaviren

Dem Genus *Hantaviren* zugeordnet sind die in Tabelle 2 aufgeführten Serotypen.

Tabelle 2: Hantavirus-Serotypen

Genus	Hantaviren	Abkürzung
Serotypus	Hantaan	HTN
	Puumala	PUU
	Seoul	SEO
	Sin Nombre	SN
	Dobrova	DOB
	Tula	TUL
	Black Canal Creek	BCC
	Bayou	BAY
	New York	NY
	Prospect Hill	PH
	Andes	AND
	El Moro Canyon	ELMC
	Thottapalayam	TPM
	Thailand	THAI
	Rio Segundo	RIOS
	Rio Mamore	RIOM
	Khabarovsk	KBR
	Tobetsu	TOB
	Topografov	TOP
	Isla Vista	ISL
Bloodland Lake	BLL	
Laguna Negra	LN	

1.2.3 Serotypen und Quasispecies

Zu den wichtigsten Serotypen sind verschiedene, genetisch identifizierte, Subtypen bekannt. So kennt man für das PUUV u.a. die Subtypen Hällnäs B1, Berkel, Sotkamo und Udmurtia. Für das HTNV sind beispielsweise die Subtypen mit der Bezeichnung 76-118, Hojo und Lee beschrieben (NCBI Gendatenbank). Innerhalb der Subtypen findet man eine Vielzahl von Quasispecies, die sich auf RNA-Genomebene untereinander aber nur in wenigen Basenpaaraustauschen unterscheiden und daher nicht genauer beschrieben werden. Die Identifizierung solcher Quasispecies beruht meist nur auf der Sequenzierung von kleinen, wenige Hundert Basenpaar großen, cDNA-Fragmenten viraler RNA (Rollin et al., 1995). Erschwert wird die Charakterisierung eines neuen Virus durch die Tatsache, daß es in vielen Fällen nicht isoliert und in einer Zellkulturlinie etabliert werden konnte.

1.2.4 Genomische Struktur

Die *Hantaviren* besitzen wie alle anderen Mitglieder der Familie der *Bunyaviridae* ein in 3 Segmente aufgeteiltes einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Polarität (ssRNA⁻) (Schmaljohn et al., 1983). Die einzelnen RNA-Segmente der Hantaviren werden aufgrund ihrer Größe als *S* (small, ca. 1.7 kb), *M* (medium, ca. 3.6 kb) und *L* (Large, ca. 6.5 kb) bezeichnet (Abb. 1).

Das *S*-Segment codiert für das 48-54 kD große Nucleocapsidprotein (NC) (Schmaljohn et al., 1986). Dieses Protein wird von der Wirtszelle mit etwa 2100 Kopien pro Viruspartikel in exzessiven Mengen synthetisiert und stellt das immundominante Protein der Hantaviren dar (Zöller et al., 1989). Im Virion ist das Nucleocapsidprotein an die Virus-RNA assoziiert (Gött et al., 1993).

Das *M*-Segment codiert für 2 stark glykosylierte Proteine mit der Bezeichnung G1 (70 kD) und G2 (55 kD) (Schmaljohn et al., 1983). Diese Proteine werden im Verlauf der Virusreplikation in die Doppel-Lipidmembran des Wirtszell-Golgiapparates eingelagert, wo auch das *Virus-Budding* stattfindet (Murphy et al., 1973; Dubois-Balcq et al., 1984). Die Liberation der Viruspartikel zur Zelloberfläche vollzieht sich durch vesikuläre Transportmechanismen (Elliott, 1994).

Auf dem noch am wenigsten im Blickpunkt des wissenschaftlichen Interesses stehenden *L*-Segment liegt die Information für die viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase. Dieses Enzym ist in der Lage sowohl minus-Strang-RNA in plus-Strang-RNA als auch plus-Strang-RNA in minus-Strang-RNA umzuschreiben.

Desweiteren besitzt dieses Enzym Endonucleaseaktivität und ist in der Lage, zelluläre mRNA-Caps als Primer für die RNA-abhängige RNA-Synthese zu rekrutieren (Garcin et al., 1995).

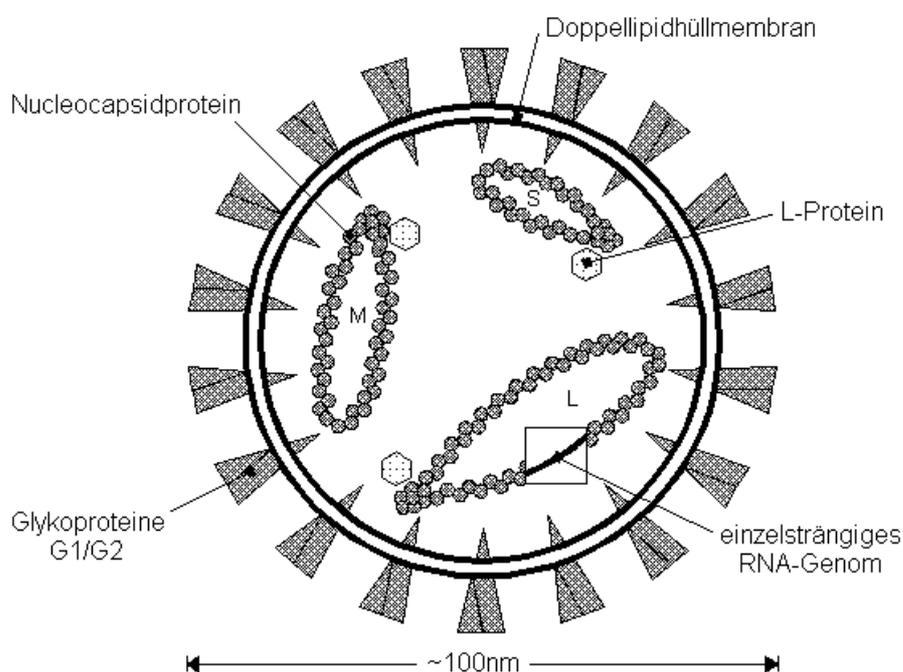


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Bunyaviruspartikels. Die Virushülle besteht aus einer Doppellipidmembran, in die beim *Virus-Budding* am Golgiapparat die beiden Glykoproteine G1 und G2 eingelagert werden. Im Virion befinden sich drei zirkuläre Nucleocapside, die sich aus den nicht-kovalent geschlossenen Einzelstrang-Minus-RNA-Segmenten L, M und S, den Nucleocapsidproteinen und dem L-Protein zusammensetzen.

Für alle Mitglieder der Familie der *Bunyaviridae* ist ferner charakteristisch, daß an allen segmentterminalen Enden jeweils typische, hochkonservative, nahezu komplementäre Basensequenzen vorliegen. Diese in Tabelle 3 dargestellten, sog. *Panhandle*- oder *Konsensus*-Sequenzen bewirken, daß die einzelnen RNA-Segmente aufgrund komplementärer Basenpaarungen der Enden plasmidartige Strukturen ausbilden (Schmaljohn et al., 1986). Desweiteren sind die jeweils aus 3 gleichen Triplets bestehenden Anfangssequenzen 5'-AUCAUCAUC für einen *prime-and-realign* Mechanismus bei der Replikation erforderlich (Garcin et al., 1995).

Tabelle 3: genusspezifische Konsensus-Sequenzen der S-, M- und L-Segmente exemplarisch aufgeführt für das Hantaan-Virus

Segment	Panhandle-Sequenz ssRNA						
S	5'-	1	4	7	10	13	16
		AUC	AUC	AUC	UGA	GG.	..
							↙
3'-	UAG	UAG	UAU	GCU	CC.	..	
M	5'-	1	4	7	10	13	16
		AUC	AUC	AUC	UGA	GGC	...
							↙
3'-	UAG	UAG	UAU	GCU	CCG	...	
L	5'-	1	4	7	10	13	16
		AUC	AUC	AUC	UGA	GGC	...
							↙
3'-	UAG	UAG	UAU	GCU	CCG	...	

Grau markierte Nukleotide (■) zeigen nichtkomplementäre Paarungen.

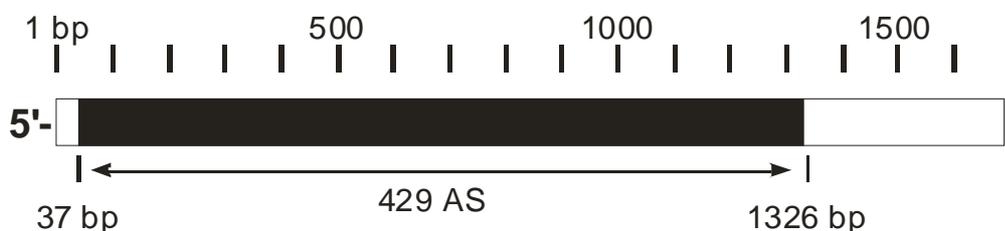
1.2.5 Unterschiede im Hantavirusgenom innerhalb der Serotypen

Durch Sequenzierung der drei Segmente unterschiedlicher Serotypen konnte gezeigt werden, daß das *S*-Segment vor dem *M*-Segment den variabelsten Abschnitt des Virusgenoms darstellt. Am höchsten konserviert sind die polymerasecodierenden *L*-Segmente (Xiao et al., 1994; Plyusnin et al., 1996; Antic et al., 1992).

Im Gegensatz zu den *M*- und *L*-Segmenten differiert die Größe der *S*-Segmente innerhalb der Serotypen sehr stark. Die Größenunterschiede treten vorwiegend in der sehr variablen 3'-nicht-codierenden Region (*non-coding-region*, NCR) auf (Plyusnin et al., 1996), so daß die Größe der NC-Proteine verschiedener Serotypen relativ konstant bleibt (Abb. 2).

Anhand der bekannten Teilsequenzen der *S*-Segmente konnte ein phylogenetischer Stammbaum ermittelt werden, der, wie schon in serologischen Untersuchungen beobachtet, alle Hantaviren in die zwei großen Gruppen PUU und PUU-ähnliche Viren sowie HTN und HTN-ähnliche Viren einteilt (Elgh et al., 1997).

S-Segment HTN 76-118



S-Segment PUU Hällnäs-B1

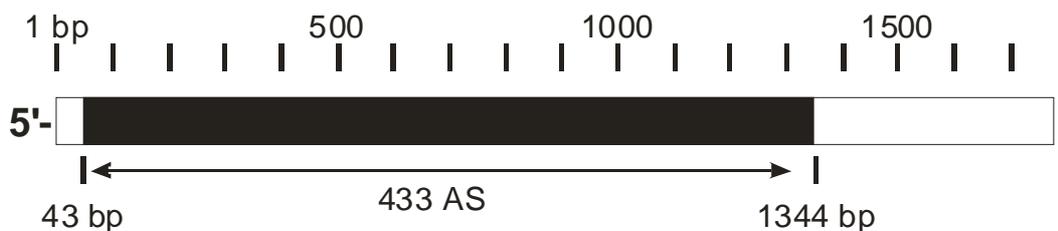


Abb. 2: schematische Übersicht über den Aufbau der *S*-Segmente der beiden HTV-Serotypen HTN 76-118 und PUU Hällnäs B-1. Die NC-codierenden Sequenzen sind schwarz markiert.

1.3 Epidemiologie der Hantaviren

1.3.1 Das Reservoir

Hantaviren werden im Gegensatz zu allen anderen Mitgliedern der Familie der *Bunyaviridae* nicht durch Arthropoden, sondern durch Säugetiere der Gattungen Rodentia (Nagetiere) und Insektivora (Insektenfresser, nur Serotyp Thottapalayam) übertragen. In diesen Tieren kommt es zu einer chronisch-persistierenden Hantavirusinfektion. Infizierte Nagetiere scheiden trotz Bildung neutralisierender Antikörper (Cosgriff, 1989) wahrscheinlich lebenslang (Kolakofsky, 1991), zumindest über einen mehrmonatigen Zeitraum (Henttonen et al., 1996), Viruspartikel aus.

In infizierten Tieren lassen sich Hantaviren in nahezu allen Organen, vor allem aber in der Niere und der Lunge, nachweisen (Wünschmann, 1993).

1.3.2 Der Hauptwirt

Die Isolierung von Hantaviren aus Nagetieren ergab eine enge Beziehung der verschiedenen HTV-Serotypen zu jeweils einem spezifischen Hauptwirt (Henttonen et al., 1996; Tabelle 4).

Tabelle 4: Wichtige Vertreter der HTV und ihre Hauptwirte

Hantavirus	Hauptwirt
Hantaan	<i>Apodemus agrarius</i> (Brandmaus) (Lee et al. 1978)
Puumala	<i>Clethrionomys glaeolus</i> (Rötelmaus) (Brummer-Korvenkontio et al., 1980)
Seoul	<i>Rattus ssp.</i> (Wanderratte, Hausratte) (Lee et al., 1982)
Tula	<i>Microtus arvalis</i> (Feldmaus) (Pluysnin et al., 1994)
Dobrova	<i>Apodemus flavicollis</i> (Gelbhalsmaus) (Avsic-Zupanc et al., 1992)
Thottapalayam	<i>Suncus murinus</i> (Spitzmaus) (Carey et al., 1971; Xiao et al., 1994)

Aus der Koevolution und der engen Virus-Wirt-Beziehung ergibt sich, daß das Verbreitungsgebiet eines Hantavirus sich eng mit der geographischen Verbreitung seines Hauptwirtes deckt (Abb. 3). Tatsächlich wird von Fällen der NE nahezu nur aus den Ländern berichtet, in denen die Rötelmaus heimisch ist. Auch finden sich die Serotypen SNV, PH, BAY nur auf dem amerikanischen Kontinent, da die natürlichen Wirte der SN-ähnlichen Hantaviren, die sigmodontinen Nager, nur in der *neuen Welt* beheimatet sind (Childs et al., 1994; Johnson et al., 1997).

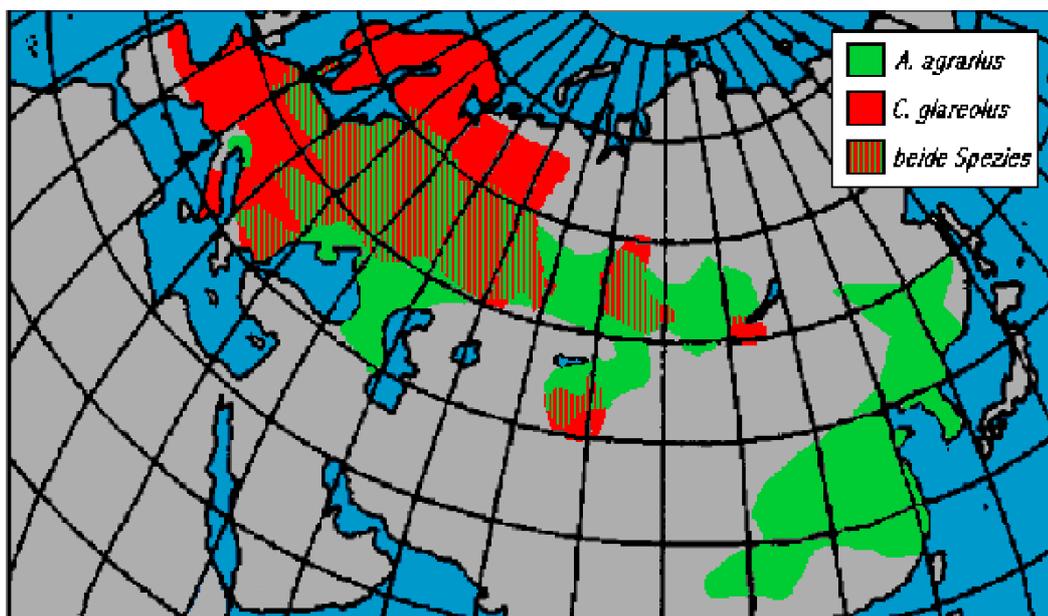


Abb. 3: Verbreitungsgebiet der Brandmaus (*Apodemus agrarius*, grün unterlegt) und Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*, rot unterlegt), Überträger der in Eurasien heimischen HTV-Subtypen HTN und PUU. In den rot-grün schraffierten Gebieten kommen beide Spezies vor. Modifiziert nach Corbet: *The Mammals of the Palearctic Region: A Taxonomic Review*; Cornell University Press, 1978 und LeDuc, 1987.

1.3.3 Die Nebenwirte

Außer in den Hauptwirten (Mäusen und Ratten) wurden Hantaviren überwiegend in weiteren Nagetierspecies wie z.B. Bisamratten (Vahlenkamp et al, 1998), aber auch in Fledermäusen (Kim et al., 1994), Katzen (Nowotny, 1994), Vögeln (Baek und Lee, 1993) und Milben (Tsai, 1987b) nachgewiesen. Die Infektionen solcher Nebenwirte, sogenannte *spillover* haben vermutlich keine grosse epidemiologische Bedeutung, da sie nicht zu einer wesentlichen Verbreitung des Virus beitragen (Schmaljohn et al., 1997).

1.3.4 Transmission

Den einzig bekannten Übertragungsweg stellt die Aufnahme von infektiösem Kot oder Urin, bzw. von Speichel dar (Kariwa et al., 1998). Weit häufiger als die Übertragung durch Bisse oder offene Wunden (Tsai, 1987b) kommt die inhalative Aufnahme von ausgeschiedenen Viruspartikeln in Form von ausgetrockneten Ausscheidungen vor (Warner, 1996). Eine Übertragung von Mensch-zu-Mensch ist bisher nur für den Ausbruch des Andesvirus (ANDV) 1996 in Südamerika beschrieben worden (Wells et al., 1997).

1.3.5 Jahreszeitliches Auftreten von Hantavirusinfektionen

Das Auftreten von Hantavirusinfektionen innerhalb eines Jahres folgt meist einem festen, zweigipfligen Zyklus. Eine erhöhte Inzidenz an HTVD findet sich im Sommer (Juni-September) und im Winter (Dezember-Februar) (Bren et al., 1996; Pilaski et al., 1991). Hierfür ist die vermehrte Exposition der Menschen gegenüber den Nagetieren und deren Ausscheidungen verantwortlich. In den Sommermonaten dringt der Mensch durch Ernte und vermehrte Freizeitaktivitäten im Freien verstärkt in die ökologischen Nischen der Nagetiere ein (Holland, 1998). Im Winter hingegen suchen die Nagetiere die Nahrungsressourcen und Wärme menschlicher Siedlungen auf (Cosgriff, 1989).

Desweiteren korreliert die HTVD-Inzidenz sehr stark mit dem Nagetierbestand. Klimatische Faktoren, wie warme Winter oder feuchte Sommer, sowie ökologische Veränderungen im Nahrungsangebot und Räuberbestand können zu einem vergrößerten Nagetierbestand führen, der mit erhöhten Fallzahlen von HTVD-Fällen einhergeht (Clement et al., 1993).

1.3.6 Risikogruppen

Als Risikogruppen sind insbesondere solche Personen zu betrachten, die sich häufig in der freien Natur aufhalten, wie z.B. Forstarbeiter (Kerouani et al., 1992; Bren et al., 1996; Moll van Charante et al., 1994), Soldaten (Clement et al., 1996; Pilaski et al., 1986) oder Feldforscher (Henttonen et al., 1996).

1.3.7 Prophylaxe und Impfungen

Da zur Zeit für den routinemäßigen Einsatz noch keine Impfstoffe zur Verfügung stehen, stellt die Vermeidung einer Exposition gegenüber Nagetieren und ihren Ausscheidungen die einzige Möglichkeit der Prophylaxe dar (Kulzer und Heidland, 1994).

An der Entwicklung eines Impfstoffes wird mit Nachdruck gearbeitet. Die Forschungen sind bis auf einige Versuche in China und Korea, zu denen aber noch keine Ergebnisse veröffentlicht wurden (Mertz et al., 1998), bisher nicht über die Stufe des tierexperimentellen Stadiums hinausgekommen. Den größten Erfolg erhofft man sich zur Zeit von einer Impfung mit dem immundominanten Nucleocapsidprotein in rekombinanter Form (Ulrich et al., 1998) und DNA-Fragmenten des M-Segmentes (Hooper et al., 1999).

1.3.8 Hantavirusinfektionen weltweit

Hantavirusinfektionen waren lange nur in der *alten* Welt bekannt. Mit der Isolierung des SNV in Nordamerika (Nichol et al., 1993) sowie weiteren SN-ähnlichen HTV in Südamerika (Wells et al., 1997; Hjelle et al., 1994; Levis et al., 1997) wurden Infektionen mit Hantaviren auch zu einem Problem der *neuen* Welt und somit zu einer weltweiten Infektionserkrankung (Schmaljohn und Hjelle, 1997).

Am häufigsten treten Hantavirusinfektionen im ostasiatischen Raum auf, insbesondere in Nordchina, wo mit bis zu 100.000 Infektionen pro Jahr mit Abstand die höchste globale Hantavirusinzidenz erreicht wird (Kolakofsky et al., 1991).

In Europa sind Fälle von HFRS und NE aus nahezu allen Ländern berichtet worden. Auffällig ist ein Seroprävalenzgefälle welches von Nord- nach Südeuropa, sowie von Ost- nach Westeuropa verläuft. So werden die meisten Fälle aus Skandinavien und vom Balkan gemeldet. Während der Serotyp PUU und die Gruppe der PUU-ähnlichen Hantaviren geographisch überwiegend in Nord- und Mitteleuropa zu finden sind, überwiegen in Ost- und Südeuropa die Serotypen HTN, DOB und SEO (Papa et al., 1998).

In Deutschland sind bislang nur Hantainfektionen mit den Serotypen PUU, HTN und DOB (Meisel et al., 1998) nachgewiesen worden. Endemisches Auftreten von Hantavirusinfektionen sind überwiegend für den süddeutschen Raum, wie den Schwarzwald und den Kreis Reutlingen beschrieben (Pilaski et al., 1991; Schubert et al., 1991; Abb. 4).



Abb. 4: Auftreten von HTV-Infektionen in Deutschland (Pilaski et al., 1991). Jeder schwarze Kreis symbolisiert einen Fall einer Hantavirusinfektion

1.4 Pathogenese

1.4.1 Mortalität der HFRS und der NE

Die Hantavirusserotypen Hantaan (HTN) und Seoul (SEO) rufen das Krankheitsbild des Hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom (HFRS) hervor. Der Symptomkomplex, welcher vom Serotyp Puumala (PUU) hervorgerufen wird und als Nephropahia epidemica (NE) bezeichnet wird, verläuft ähnlich, jedoch meist milder. Es wird vermutet, daß 90% der Puumala-Infektionen klinisch inapparent bleiben und weniger als 1% der Infizierten an dieser Krankheit versterben. Bei klinisch schwer verlaufende NE-Erkrankungen scheint eine HLA-Assoziation vorzuliegen (Mustonen

et al., 1996). Die Letalität des HFRS, hervorgerufen durch den Serotyp Hantaan, liegt hingegen zwischen 5-20%, die des Seoul-Subtyp bei circa 2% (Henttonen et al., 1996).

1.4.2 Klassischer Krankheitsverlauf der HFRS und der NE

Der Verlauf einer HFRS, bzw. NE ist durch mehrere Stadien gekennzeichnet (Classen et al., 1993), wobei häufig zu beobachten ist, daß ein oder mehrere Stadien klinisch inapparent bleiben.

Fieberphase

Nach einer sehr variablen Inkubationszeit im Bereich zwischen 4 Tagen und etwa 4 Wochen (Kulzer und Heidland, 1994) treten häufig abrupt und ohne Prodromi hohes Fieber ($>39.5^{\circ}\text{C}$), Schüttelfrost sowie heftigste, auch einseitige Flankenschmerzen auf (Tsai, 1987a). Ferner sind Kopfschmerzen, Erytheme (bevorzugt an Gesicht und Rumpf), Myalgien und Beteiligung des Gastrointestinaltraktes (Vomitus und/oder Diarrhoe) sowie der Augen (insbesondere Myopie, Photophobie, konjunktivale Injektion) und der Lungen beschrieben (Mustonen et al, 1994). Fast immer besteht laborchemisch eine Thrombozytopenie (van Ypersele de Strihou et al., 1989) und eine ausgeprägte Leukozytose. Die Fieberphase dauert etwa 3-6 Tage an (Schubert et al., 1991). Differentialdiagnostisch muß in dieser Phase am ehesten eine Leptospirose ausgeschlossen werden (Fauci et al., 1998).

Hypotensive Phase

Diese 1-3 Tage andauernde Phase (Hart und Bennett, 1994) ist gekennzeichnet durch eine schwere Hypotension (weniger stark ausgeprägt bei der NE) sowie eine wenige Tage anhaltende schwere Proteinurie ($>20\text{ g/l}$). Diese Phase wird gemeinsam mit der Fieberphase häufig zu der sogenannten *toxischen Phase* zusammengefaßt (Reinhardt et al., 1996). In schweren Fällen kann es weiterhin zu einem sogenannten *Capillar Leakage Syndrome* kommen, welches die Hypotension noch verstärkt (Cosgriff, 1991).

Aufgrund der schweren Hypotension treten etwa 30% der Todesfälle in dieser Phase auf.

Oligurische Phase

In dieser etwa 1 Woche andauernden Phase findet man als Zeichen der Einschränkung der Nierenfunktion einen Anstieg retentionspflichtiger Substanzen insbesondere des Serum-Kreatinins sowie eine Mikrohämaturie und Oligurie, die in einigen Fällen eine Hämodialyse erforderlich macht. Auftreten von hämorrhagischen Zeichen, wie Epistaxis, petechiale Blutungen (besonders an Rumpf und weichen Gaumen) sowie Schleim- und Bindehautblutungen treten häufig in dieser Phase auf, sind aber auch für die ersten beiden Phasen beschrieben (Guang et al., 1989).

Rekonvaleszenzphase

Eine ausgeprägte Diurese mit einer Urinproduktion von bis zu 12 Litern pro Tag kündigt den Beginn einer oft monatelang andauernden Rekonvaleszenz an. In den meisten Fällen kommt es zu einer *Restitutio ad integrum* (Zöller et al., 1990). Bei einigen Patienten konnten jedoch auch nach klinischer Ausheilung der Infektion histologische Veränderungen wie Papillennekrosen (Rebibou et al., 1997) oder interstitielle Fibrosen des Nierengewebes (Bren et al., 1996), nachgewiesen werden. Die Veränderungen gehen meist mit Einschränkungen der Nierenfunktion einher (*chronic renal failure*) (Shutov et al., 1999; Novo et al., 1999). Diese Tatsache wird dadurch bekräftigt, daß bei Dialysepatienten eine im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöhte Hantavirusprävalenz ermittelt werden konnte (George et al., 1998; Zöller et al., 1995).

1.4.3 atypische Formen einer Hantavirusinfektion

Neben den typischen Symptomen der HTV-Infektion werden regelmäßig auch atypische Hantavirusinfektionen beobachtet (Anonymous, 1993). So werden von verschiedenen Autoren Krankheitsfälle beschrieben, bei denen die Nierensymptomatik des HFRS sehr schwach ausgeprägt ist, bzw. auch gänzlich fehlt. In solchen Fällen findet sich relativ häufig eine Beteiligung des Lungengewebes (Schreiber et al., 1996; Linderholm et al., 1997). Diese Verläufe entsprechen am ehesten der milden HPS-Erkrankung, die durch SN-ähnliche Viren hervorgerufen wird (Schmaljohn und Hjelle, 1997).

1.4.4 Therapie der HTVD

Im Mittelpunkt des therapeutischen Konzeptes steht die symptomatische Behandlung der HTVD (Schubert et al., 1991). Bei grippeähnlichen Verlaufsformen der NE reicht zumeist eine leichte Analgesie, wohingegen bei schweren Nierenfunktionsstörungen im Sinne eines akuten Nierenversagens oder dem *Adult Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) des HPS eine vorübergehende Hämodialyse (HD) bzw. extrakorporale Membranoxygenation (EKMO) nötig werden kann (Gärtner et al., 1988).

Es konnte durch die Arbeitsgruppe Dunst und Mitarbeiter pharmakologische Teilerfolge mit der Anwendung von Kortikosteroiden hinsichtlich der häufig nachweisbaren Thrombozytopenie erzielt werden (Dunst et al., 1998). Diese Tatsache bestätigt die Vermutung, daß es sich bei der HTVD um ein hauptsächlich immunologisches vermitteltes Krankheitsbild handelt.

Als einziges kausal wirksames Medikament steht das unspezifische Virustatikum Ribavirin zur Behandlung der HTVD zur Verfügung. In den Vereinigten Staaten wird es bei dem HPS z.T. routinemäßig eingesetzt (Hjelle et al., 1997). Der therapeutische Nutzen dieser Therapie in der Frühphase der Erkrankung konnte sowohl in grossen klinischen Studien als auch am Mausmodell gezeigt werden (Huggins et al., 1986 et 1991). In Deutschland wird dieses Medikament bislang nur in der Therapie der RSV-Bronchiolitis und der Kombinationstherapie der chronischen Hepatitis C-Infektion eingesetzt und ist für die Behandlung der HTVD nicht zugelassen.

1.5 Diagnose der Hantavirusinfektion

1.5.1 Immunfluoreszenztest (IFT; Immunfluoreszenz Assay, IFA)

Der IFT ist das derzeit am weitesten verbreitete Testverfahren zum Nachweis einer Hantavirusinfektion. Als Antigen (Ag) wird meist in Verozellkultur vermehrtes Virus eingesetzt, welches auf Objektträger ausgestrichen und anschließend durch Aceton- oder Ethanolfixation inaktiviert wird. Nach Inkubation eines Objektträgers mit Patientenserum können Antikörper (AK), die an native Virusproteine gebunden haben, über einen FITC-markierten Anti-human-AK unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Typischerweise zeigen positive IFT

ein granuläres, perinukleäres Immunfluoreszenzmuster, welches die Diagnosestellung erleichtert.

Mit dem IFT können IgG-Antikörper mit einer Sensitivität von etwa 90% erfaßt werden, wohingegen IgM-Antikörper nur in seltenen Fällen (< 20%) nachgewiesen werden können (Brus Sjölander et al., 1997).

Über den Einsatz von PUU- und HTN-Zellkultur-Ag und die Auswertung der Serum-Titer kann eine grobe Differenzierung der Serotypen PUU und HTN erfolgen, wobei durch regelmäßig auftretende Kreuzreaktionen meist keine eindeutige Serotypenspezifizierung erfolgen kann.

Der Nachteil des IFT ist das nicht standardisierbare Testergebnis, das potentielle Infektionsrisiko und die sehr teure Ausstattung, welches zur Beladung der Objektträger mit dem Zellkulturextrakt benötigt wird (L3/4-Sicherheitslabor, Fluoreszenzmikroskop). Der große Vorteil besteht in der einfachen und schnellen Durchführbarkeit.

1.5.2 Enzym Immuno Assays (EIAs)

Verschiedene EIA-Verfahren stehen zum Nachweis einer HTV-Infektion zur Verfügung (Elgh et al., 1995). Die üblichen EIA-Verfahren sind der Sandwich-ELISA (indirekter *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; Niklasson et al., 1990), der μ -capture-ELISA (Zöller et al., 1993; Fa. Progen, Heidelberg) und der Inhibition-EIA. Sie unterscheiden sich jeweils in der Beladung der sogenannten Festphase sowie im Einsatz der AK.

Spezifische AK des Patientenserums binden an die Virusproteine der Festphase und können durch einen mit einem Enzym konjugierten Anti-human-AK markiert werden. Dieses Enzym katalysiert eine Farbreaktion, die nach Zugabe des entsprechenden Substrates über einen ELISA-Reader photometrisch ausgewertet werden kann.

Die EIA-Testverfahren zeichnen sich im Vergleich zum IFT durch eine höhere Sensitivität und Spezifität aus. Diese liegen sowohl für IgG- als auch für den IgM-AK Nachweis jeweils bei über 98% (Brus Sjölander et al., 1997; Zöller et al., 1993). Der Vorteil dieser Methoden liegt in der einfachen und schnellen Durchführung, die zum großen Teil auch automatisiert werden kann. Desweiteren erleichtert der Einsatz rekombinanter Virusproteine den Testaufbau und vermeidet das Infektionsrisiko.

1.5.3 Immunoblotverfahren

Neben dem klassischen Western Blot gewinnen die sog. Dot- und Slot Blot-Verfahren immer mehr an Bedeutung. All diesen Verfahren ist gemeinsam, daß eine Nitrocellulosemembran über verschiedene Methoden (Elektrotransfer, Auftropfen, Filtrieren) mit Virus-Ag beladen wird. Zur Darstellung von Antigen-Antikörper-Komplexen stehen eine Reihe von Enzym-konjugierten AK und Substraten zur Verfügung.

Nach Inkubation der mit Virus-Antigen beladenen Nitrocellulose mit Patientenserum können, wie bei den EIA-Testverfahren, spezifisch an Virusproteinen gebundene Antikörper des Serums über einen Enzym-gekoppelten Anti-Human-Antikörper markiert werden. Durch Zugabe des jeweiligen enzymspezifischen Substrates können diese Antigen-Antikörper-Komplexe angefärbt und ohne zusätzlichen Gerätebedarf ausgewertet werden.

Analog zu den EIA-Testverfahren besitzen die Immunoblotverfahren sowohl für den Nachweis von IgG- als auch von IgM-Antikörper eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität von jeweils annähernd 100% (Hjelle et al., 1997).

Nach Herstellung der Antigen-Teststreifen kann der Test schnell und einfach durchgeführt werden.

1.5.4 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR dient dem direkten Nachweis von Virus-RNA aus Probenmaterial (Serum, Urin oder Gewebe) (Plyusnin et al., 1995; Vahlenkamp et al., 1998). Da es sich bei Hantaviren um RNA-Viren handelt, muß der PCR eine sog. Reverse Transkription vorgeschaltet werden, die vor der eigentlichen PCR die RNA in cDNA umschreibt (Xiao et al., 1991).

Um die Sensitivität dieser Nachweismethode zu erhöhen, wird häufig eine sog. *nested*-PCR durchgeführt (Wünschmann, 1993). Eine *nested*-PCR besteht aus zwei nacheinander ausgeführten Polymerasekettenreaktionen wobei in der zweiten Reaktion ein Primerpaar verwendet wird, welches innerhalb des Primerpaares der ersten Reaktion mit der cDNA hybridisiert. In der zweiten PCR wird als cDNA-Template das Produkt der ersten PCR eingesetzt.

Die hohe Sensitivität der PCR-Nachweisverfahren führt zu einer extremen Anfälligkeit für Kontaminationen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Bei

Ausschluß dieser Fehlerquelle (Kwok et al., 1989) und unter Verwendung geeigneter Kontrollen hat der PCR-Nachweis die höchste Spezifität und Sensitivität.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, durch Klonierung des PCR-Produktes und anschließende Sequenzierung eine genaue Typisierung durchzuführen und selbst eine eventuell vorhandene virale Population verschiedener Hantavirusvarianten nachzuweisen (Hörling et al., 1995).

1.5.5 Andere Nachweismethoden

Neben diesen Methoden stehen noch andere Verfahren, wie den *Plaque Reduction Neutralization Test* (PRNT) oder die *High Density Particle Agglutination* (HDPa) (Clement et al., 1995) zur HTV-Diagnostik zur Verfügung. Diese haben aber in der allgemeinen Diagnostik der Hantaviren einen geringeren Stellenwert.

Zu beobachten ist die im Rahmen der Hantavirusdiagnostik zunehmende Verwendung von Testverfahren, die auf den Einsatz rekombinanter Virusproteine beruhen (Hjelle et al., 1997), sodaß die EIA- und Immunoblotverfahren im Laufe der Zeit den herkömmlichen IFT mittels virusinfizierten Verozellen vermutlich ersetzen werden.

1.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Immunoblotnachweisverfahren entwickelt werden, das Hantavirus-spezifische Antikörper in Seren von Patienten mit hoher Sensitivität und Spezifität nachzuweisen vermag. Dabei sollte untersucht werden ob eine Serotypendifferenzierung in PUU-spezifische Antikörper und HTN-spezifische Antikörper möglich ist. Als Antigene sollten neben dem Extrakt von in Verozellkultur vermehrten Hantaviren rekombinante Nucleocapsid-Proteine der beiden Serotypen HTN und PUU eingesetzt werden.

Nach Isolierung der viralen RNAs aus infizierten Zellkulturen sollten mit der Methode der RT-PCR und anschließender Klonierung der PCR-Produkte in einen pET-Expressionsvektor die NC-Proteine exprimiert und chromatographisch gereinigt werden. Alle gereinigten Antigene sollten anschließend im Western Blot mit Seren von Hantavirus infizierten Personen untersucht werden, deren Titer zuvor im IFT bestimmt wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Abkürzungen

μ	Mikro
A	Adenosin
Ag	Antigen
AK	Antikörper
Ala	Alanin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
atm	Atmosphäre/-n
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
BAY / BAYV	Bayou / Bayou Virus
BCC / BCCV	Black Canal Creek / Black Canal Creek Virus
BLL / BLLV	Bloodland Lake / Bloodland lake Virus
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	copy-DNA
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]2-hydroxy-1-propansulfonat
Cys	Cystein
ddNTP	Di-Desoxyribonucleosid-5´-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-5´-triphosphat
DOB / DOBV	Dobrova / Dobrova Virus
DTE	Dithioerythrol
E. coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9.81m/s ²), Gramm
G	Guanosin
G1	G1-Glykoprotein
G2	G2-Glykoprotein
GIT	Guanidinthiocyanat
GKF	Gewebekulturflasche
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
H	Stunden
HDPA	High Density Particle Agglutination
HFRS	Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom
His	Histidin
HRPO	Horse Radish Peroxidase
HTN / HTNV	Hantaan / Hantaan Virus
HTV	Hantavirus
HTVD	Hantavirus Disease
Hyl	Hydroxylysin
IFT-PBS	Immunfluoreszenz PBS
IgG, M	Immunglobulin G, M
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ISL / ISLV	Isla Vista / Isla Vista Virus
kb	Kilobasen
KBR / KBRV	Khabarovsk / Khabarovsk Virus
kDa	Kilodalton
l	Liter
Leu	Leucin
LN / LNV	Laguna Negra / Laguna Negra Virus
Lys	Lysin
m	Milli, Meter

M	Molar
mA	Milliampère
max	Maximal
Met	Methionin
min	Minimal, Minuten
n	Nano
NBCS	New Born Calf Serum, Neugeborenen-Kälberserum
Nc	Nitrocellulose
NC	Nucleocapsid
NEV	Nephropathia Epidemica Virus (s. PUU)
NY / NYV	New York / New York Virus
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH / PHV	Prospect Hill / Prospect Hill Virus
Phe	Phenylalanin
Pol	Polymerase
PRNT	Plaque Reduction Neutralization Test
Pro	Prolin
PUU / PUUV	Puumala / Puumala Virus
RIOM / RIOMV	Rio Marmore / Rio Marmore Virus
RIOS / RIOSV	Rio Segundo / Rio Segundo Virus
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SDS	Sodiumdocylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek, s	Sekunden
SEO / SEOV	Seoul / Seoul Virus
Ser	Serin
SN / SNV	Sin Nombre / Sin Nombre Virus
T	Thymidin
Taq	Thermus Aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin

TOB / TOBV	Tobetsu / Tobetsu Virus
TOP / TOPV	Topografov / Topografov Virus
TPM / TPMV	Thottapalayam / Thottapalayam Virus
Trp	Tryptophan
TUL / TULV	Tula / Tula Virus
Tyr	Thyrosin
U	Uracil
ÜNK	Übernachtkultur
UPM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V/v	Volumen/Volumen
Val	Valin
Vol	Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

2.1.2 Chemikalien

α 35S-dATP	Amersham Buchler, Braunschweig
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
4-Chloro-1-Naphtol	Sigma, Deisenhofen
Adenosintriphosphat	Pharmacia, Freiburg
Agarose, ultra pure	Gibco BRL, Eggenstein
Aminocaprinsäure	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Aqua ad Iniectionabilia	Pharmacia, Erlangen
Bacto-Agar	BBL Becton Dickinson, USA
Bacto-Trypton	BBL Becton Dickinson, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CHAPSO	Sigma, Deisenhofen
Coomassie	Serva, Heidelberg
Desoxyribonucleotide (dNTPs)	Pharmacia, Freiburg
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen

Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol 70%	Apotheke des Allg. Krhs St. Georg
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat	Merck, Darmstadt
Harnstoff, ultra pure	ICN Biomedicals, USA
Hefeextract	BBL Becton Dickinson, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid	MBI Fermentas, Litauen
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumiodid	Merck, Darmstadt
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	ICN Biomedicals, USA
Polyacrylamid (19:1, 37.5:1)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin, Fraktion V	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure (rauchend) 37%	Merck, Darmstadt
Sigmacote®	Sigma, Deisenhofen

Siliziumdioxid	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Merck, Darmstadt
Tris, ultra pure	ICN Biomedicals, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

2.1.3 Lösungen

10 % APS

1 g	Ammoniumpersulfat
10 ml	Aqua dest.

10 % Dimethylsulfoxid (DMSO)

10 %	Dimethylsulfoxid
90 %	10% NBCS L-15 Leibovitz

10x PBS-Puffer

80 g	NaCl
2g	KCl
11.5 g	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
2 g	KH ₂ PO ₄

50:1 Lysispuffer

95 %	50:1 Puffer
0.4 %	Triton X-100
10 mM	MgCl ₂
100 µM	PMSF
10 U/ml	Dnase I
50 µg/ml	Lysozym

50:1 Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.5

1 mM EDTA, pH 8.0

50x TAE-Puffer

2 M Tris-Acetat, pH 8.0

50 mM EDTA, pH 8.0

Agarose 1.2%

12 g Agarose

0.0002 % Ethidiumbromid

ad 1000 ml 1x TAE-Puffer

Agarose 2%

20 g Agarose

0.0002 % Ethidiumbromid

ad 1000 ml 1x TAE-Puffer

Coomassie-Blue-Entfärbelösung

10.0 % Eisessig

33.0 % Methanol

57.0 % Aqua dest.

Coomassie-Blue-Färbelösung

1.75 g/l Serva Blue „R“ 250

45.4 % Methanol

9.2 % Eisessig

45.4 % Aqua dest.

Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung

10 ml Ethanol (95%)

20 mg Coomassie Brilliant Blue G250

20 ml Phosphorsäure (88%)

ad 200 ml Aqua dest.

DEPC-H₂O

0.1 %	Diethylpyrocarbonat
1 l	Aqua dest.

DNA-Auftragspuffer

60%	Glycerol
0.2%	Xylencyanol
0.2%	Bromphenolblau
60mM	EDTA

GIT-Lysis

4.5 M	Guanidiniumthiocyanat
50 mM	Tris-HCl, pH 6.5
20 mM	EDTA, pH 8.0
1.2 %	Triton X-100

IFT-Lösung A

1.36 M	NaCl
26 mM	KCl
5 mM	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
12 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O

IFT-Lösung B

160 mM	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
11.4 mM	KH ₂ PO ₄

IFT-PBS

10 %	IFT-Lösung A
10 %	IFT-Lösung B
80 %	Aqua dest.

Immunoblot-Anodenpuffer #1

30 mM	Tris-Base
20%	Methanol

Immunoblot-Anodenpuffer #2

300 mM Tris-Base

20% Methanol

Immunoblot-Blockingpuffer

90% TBST-Puffer

10% Magermilch

Immunoblot-Färbelösung

1 g/l 4-Chloro-1-Naphtol

10 % Methanol

90 % NT-Puffer

0.0002% H₂O₂**Immunoblot-Kathodenpuffer**

25 mM Tris-Base

40 mM 6-Aminohexansäure

20% Methanol

LB-Medium, pH 7.5

5.8 g/l NaCl

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l Trypton

LB-Plattenmedium

16 g Bactoagar

1000 ml LB-Medium

Ligationspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.6

10 mM CaCl₂

50 µg/ml BSA

1 mM DTE

1 mM ATP

Nalys-Puffer, pH 7.850 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

300 mM NaCl

500 $\mu\text{g/ml}$ Lysozym200 $\mu\text{g/ml}$ Dnase I100 μM PMSF**Na-Puffer, pH 7.8**50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

300 mM NaCl

Nason-Puffer, pH 7.850 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

300 mM NaCl

8 mM CHAPS

Nawash-Puffer, pH 6.050 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

300 mM NaCl

10% Glycerin

New Wash

50 % Ethanol abs.

0.1 M Tris-HCl, pH 7.5

0.5 mM Na-Acetat

5 mM NaCl

 Ni^{2+} -Sepharose-Aktivierungspuffer

100 mM Nickelsulfat

NT-Puffer, pH7.5

100 mM NaCl

10 mM Tris-Base

Ponceau S Lösung

0.5% Ponceau S

1% Eisessig

Puffer B

8 M Urea

100 mM Tris Base

100 mM NaH₂PO₄

für Puffer C, D, E1 und E2 wurden unterschiedliche pH-Werte mit 36%-iger HCl eingestellt

Puffer F, pH2.0

200 mM Essigsäure

SDS-Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-Base

0.2 M Glycin

0.1 % SDS

SDS-Ladepuffer

125 mM Tris-HCl, pH 6.8

5% SDS

20% Glycerin

10% β-Mercaptoethanol

0.02% Bromphenolblau

SDS-Sammelpuffer, pH 6.8

0.5 M Tris-Base

0.4% SDS

SDS-Trennpuffer, pH 8.8

1.5 M Tris-Base

0.4% SDS

Serva Blue Lösung

10 mg Serva Blue G250
12.5 ml Ethanol 96%-ig
25 ml 1N H₃PO₄

STET-Lösung

50 mM Tris-HCl, pH 8.0
50 mM EDTA, pH 8.0
5% Triton X-100
8% Sucrose

TBST-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7.4
150 mM NaCl
0.1% Tween20

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0

TfbII-Puffer

10 mM MOPS, pH 7.0
75 mM CaCl₂
10 mM KCl
15% Glycerin

2.1.4 Bakterienstämme

BL21 (DE3)	<i>HsdS gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7gene I)</i>
DH5α	<i>SupE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>

2.1.5 Zelllinie

Vero E6	ATCC-Nr. CRL-1586 (Vero C1008)
Organismus	<i>Cercopithecus aethiops</i>
Gewebe	Niere
Morphologie	Epithelzellen

2.1.6 Viren

Puumala	Hantavirus, Bunyaviridae, Subtyp Hällnäs B1
Hantaan	Hantavirus, Bunyaviridae, Subtyp 76-118

2.1.7 Plasmide

pET28a	Novagen, USA
pET22b	Novagen, USA

2.1.8 Enzyme

DNase I	Boehringer, Mannheim
T4 DNALigase	MBI Fermentas, Litauen
Lysozym	Merck, Darmstadt
Pfu DANN Polymerase	Stratagene, USA
Taq DNA Polymerase	MBI Fermentas, Litauen
Superscript II RT	Gibco BRL, Eggenstein
RNase A	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonucleasen:	
<i>NdeI</i>	MBI Fermentas, Litauen
<i>XhoI</i>	MBI Fermentas, Litauen
Trypsin	Sigma, Deisenhofen

2.1.9 Medien

LB-Medium	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5.8g/l NaCl; pH7.5
LB-Agarmedium	10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5.8g/l NaCl, 7g/l Bacto-Agar; pH7.5
DYT-Medium	16g/l Bacto-Trypton, 10g/l Hefeextrakt, 5.8g/l NaCl; pH7.5
L15-Leibovitz Medium	50000I.E./l Penicillin-Streptomycin, 2-10% Fetales Kälberserum
Einfriermedium	50000I.E./l Penicillin-Streptomycin, 10% Fetales Kälberserum, 10% DMSO

Bakterienmedien wurden mit Aqua dest. angesetzt und bei 120 °C und 1.5 atm 30 min autoklaviert. Sollte das Medium ein Antibiotikum enthalten, so wurde dieses in der empfohlenen Endkonzentration (Ausubel et al., 1994) nach Abkühlen des Mediums zugegeben.

Fetales Kälberserum wurde vor Zugabe zum L15-Leibovitz Medium für 45 min bei 56 °C inaktiviert und durch einen 0.45 µm-Filter sterilfiltriert.

2.1.10 Kits

Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
T7-Sequenzierungs Kit	Pharamcia, Freiburg
Qia Rneasy Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.11 Oligonukleotide

Oligonukleotide der NC-Klonierung

HTN348RE	5'-GGCCTCGAGTGTCTGTCCTGTAGGTTTCATC-3'
HTNFW	5'-CGGAATTCATATGGCAACTATGGAGGAATTAC-3'
HTNIIRE	5'-GCTCTAGACTCGAGTTAGAGTTTCAAAGGCTCTTGG-3'
PUU348RE	5'-GGCCTCGAGTGTCTGGCCACTTGGTTCTTC-3'
PUUFW	5'-GCGAATTCATATGAGTGACTTGACAGACATCCA-3'
PUUIIRE	5'-GCCTGCAGCTCGAGTCATATCTTTAAGGGTTCTTG GTTT-3'
HTV RT universal	5'-TAGTAGTAGACTCC-3'

Oligonukleotide der NC-Sequenzierung

T7-Promotor	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7-Terminator	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
Pseq1	5'-CCCGACTGGGATTGAACCTG-3'
Pseq2	5'-CCATGCCTACTGCCAGTCC-3'
Pseq3	5'-GACCCGCCAGGATGTTCTTG-3'
Pseq4	5'-GATCAGAGGATAATCCTACT-3'
Hseq1	5'-GGGGTGGAGCCTGGAGACCA-3'
Hseq2re	5'-CTCCTCAGATGTTCCAACCTG-3'

2.1.12 Marker

Nukleinsäuremarker:

1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, Litauen
100bp DNA Ladder	MBI Fermentas, Litauen

Proteinmarker:

7B-Marker	Sigma, Deisenhofen
Niedrig MW-Marker	Sigma, Deisenhofen

2.1.13 Antikörper und Seren

Anti-Human-IgG-AK-FITC-Konjugat	Sifin, Berlin
Anti-Human-IgG-AK-HRPO-Konj.	BioRad, München
Fetales Kälberserum	Hyclone, USA
Pentaglobin® Hyperimmunglobulin	Biotest, Dreieich

2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1 Aufzucht und Lagerung von Klonen

Zur Isolierung einer Einzelkolonie wurden Bakterien einer Flüssigkultur auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation im Brutschrank, bei 37°C über Nacht, wuchsen vereinzelte Kolonien hervor. Zur kurzfristigen Lagerung von Agarplatten wurden diese mit Parafilm versiegelt und bei 4°C gelagert. Für eine dauerhafte Lagerung wurden 750 µl einer Übernachtskultur (ÜNK) in 250 µl sterilem Glycerin resuspendiert und anschließend in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren. Die Glycerin-Bakteriensuspensionen wurden bei -70°C aufbewahrt.

2.2.2 Sterilisieren von Geräten und Lösungen

Lösungen und Medien sowie Pipettenspitzen, Eppendorfgefäße und Glasgeräte wurden 30 min bei 121°C und 1.5 atm dampfautoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wie Antibiotika- und Kohlenhydratlösungen sowie DMSO wurden durch einen 0.45 µm Filter sterilfiltriert.

2.2.3 Herstellung kompetenter Zellen

Mit 100 µl Bakteriensuspension einer ÜNK von *E. coli* wurden 100 ml LB-Medium angeimpft. Nach Erreichen einer Bakteriendichte von OD_{560nm}= 0.4 wurden die Bakterien abzentrifugiert (Haereus Suprafuge 22, 14.290, 1000 x g, 8 min, 4°C). Alle anschließenden Arbeiten erfolgten auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen und Gefäße. Das Zellsediment wurde in 40 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend erneut zentrifugiert (Haereus Suprafuge 22, 14.290, 1000 x g, 8 min, 4°C) und das gewonnene Zellsediment in 2.5 ml sterilem TfbII-Puffer aufgenommen und zu je 100 µl portioniert. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

2.2.4 Kompetenzbestimmung

Bei der Präparation kompetenter Zellen wird ein Wert von $2 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ (*E. coli* DH5 α) bzw. $2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ (*E. coli* BL21) transformierter Zellen pro μg Plasmid angestrebt. Diese Transformations-Effizienz wurde für jede neue Präparation bestimmt. Es wurde 1 ng Plasmid in die Transformation eingesetzt (Kap. 2.2.8). Über Multiplikation der Anzahl der durch die Transformation hervorgewachsenen Kolonien mit der Plasmidverdünnung (1×10^3) und des Teilvolumenfaktors (Gesamtvolumen / ausplattiertes Volumen) wurde die Transformations-Effizienz bestimmt.

2.2.5 Plasmid-DNA Präparation

Plasmid-DNA wurde auf zwei unterschiedliche Methoden isoliert. Für spätere Restriktionsanalysen wurde die STET-Methode angewendet. Hierzu wurde das durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min) gewonnene Zellsediment einer 2 ml ÜNK von plasmidtragenden *E. coli* BL21 (DE3) bzw. DH5 α in 200 μl STET-Lösung und 0.1 mg Lysozym resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der folgenden Hitzedenaturierung bei 100°C für 2 min wurde die Suspension zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min) und der nukleinsäurehaltige Überstand (ÜS) mit einer Pipette abgenommen. Dem ÜS wurde 500 μl 6 M NaI und 10 μl SiO₂ (Glasmilch) zugegeben. Die Suspension wurde unter gelegentlichen Schütteln 5 min bei RT inkubiert, dann erneut zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min) und anschließend zweimal mit je 600 μl New Wash-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen im Heizblock bei 60°C wurde das SiO₂-Sediment in 50 μl Aqua dest. resuspendiert und erneut für 5 min bei 60°C inkubiert. Die gelöste Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min) von der Glasmilch abgetrennt und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt.

DNA-Plasmidpräparationen für Transformationen oder DNA-Sequenzierungen wurden nicht nach der sog. STET-Methode sondern mit dem Qiagen Plasmid Kit nach Anleitung des Herstellers (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.2.6 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren palindromartige DNA-Sequenzen. Nach hydrolytischer Spaltung entstehen je nach Enzym stumpfe (*blunt ends*, z.B. *Sma* I) oder einzelsträngig überhängende Enden (*sticky ends*, z.B. *Nde* I und *Xho* I). Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 0.1-0.2 µg DNA mit 10 U *Nde* I (Erkennungssequenz: CA`TATG) und 10 U *Xho* I (C`TCGAG) in einem vom Hersteller angegebenen Puffer für 2-4 h bei 37°C inkubiert. Für einen präparativen Restriktionsverdau wurde die Reaktion mit einem bis zu zehnfach größerer Volumen (bis 100 µl Gesamtvolumen) durchgeführt.

2.2.7 DNA-Ligation (Bolivar et al., 1977)

DNA-Ligasen stellen eine Gruppe von Enzymen dar, die unter ATP-Verbrauch zwei Nukleotide über eine 5'-3'-Phosphodiesterbindung miteinander verknüpfen. 100-500 ng geschnittenes Plasmid wurde mit im 3- bis 5-fachen molaren Überschuß an PCR-Produkt und einem Einheit T4-DNA-Ligase im Ligationspuffer über Nacht bei 16°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ligationsansatz bei -20°C gelagert oder direkt in Bakterien transferiert.

2.2.8 Transformation (Hanahan, 1983)

100 µl auf Eis aufgetauter kompetenter *E. coli* BL21 (DE3) bzw. DH5α-Zellen wurden mit 10-100 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Nach Erhitzen für 90 sec bei 42°C wurde die Bakteriensuspension in 1 ml LB-Medium pipettiert und 1 h bei 37°C geschüttelt. 200 µl des Ansatzes wurden auf einer Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C sollten nur aus den Zellen Kolonien hervordringen, die das Resistenzgen-tragende Plasmid aufgenommen hatten. Da nur ringförmige Plasmide von Bakterien aufgenommen werden, konnte der Erfolg der Transformation durch eine Kontrolle mit restriktionsverdaulichem Plasmid orientierend abgeschätzt werden.

2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm (OD) bestimmt. Für doppelsträngige DNA (ds-DNA) entspricht 1 OD ca. 50 µg/ml, für RNA ungefähr 25 µg/ml. Das Verhältnis der

Absorption bei 260 nm zu der Absorption bei 280 nm gibt den Grad der Reinheit der DNA wieder. Für reine DNA ist die Ratio $OD_{260\text{ nm}} / OD_{280\text{ nm}} > 1.8$.

2.2.10 Erstellung der Glasmilch (Boom et al., 1991)

30 g SiO₂ (Silica; Sigma, Deisenhofen) wurden mit 250 ml Aqua dest. vermischt und anschließend 24 h sedimentiert. Der ÜS wurde abgesaugt, das Sediment in 250 ml Endvolumen in 0.1% DEPC-H₂O resuspendiert und für weitere 6 h sedimentiert. 220 ml des ÜS wurden abpipettiert und das SiO₂-Sediment im verbleibenden ÜS resuspendiert. Mit 300 µl 36%-iger HCl wurde die Suspension angesäuert und anschließend autoklaviert. Die Glasmilch wurde in Portionen zu 1 ml bei -20°C gelagert.

2.3 Klonierung der NC

2.3.1 RNA-Isolierung aus infizierter Vero-E6-Zellkultur

Alle Arbeiten mit infektiösem Material fanden bis zum Zeitpunkt der Inaktivierung in einem Labor der Sicherheitsstufe L3 statt.

Die RNA-Isolierung aus HTV-infizierten Vero E6-Zellkulturen wurde mit dem RNeasy-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch Resuspension des infizierten Zellsediments in chaotropen Lysispuffer (Fa. Qiagen) und einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurden die Viruspartikel inaktiviert und die nachfolgende RNA-Isolierung und reverse Transkription konnte außerhalb des L3-Sicherheitslabors stattfinden.

2.3.2 Reverse Transkription

Reverse Transkriptasen sind DNA-Polymerasen, die RNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges benutzen.

Mit dem aus der RNA-Isolierung gewonnenen HTV-RNA-haltigen Überstand wurde 50 pmol RT-Primer (HTV-RT Universal) gut vermischt. Die darauffolgende Hybridisierung dieses Oligonukleotids mit der N-terminalen Basenabfolge AUCAUCAUCUGAGG aller HTV-Segmente fand für 10 min bei 70°C statt. Diese Reaktion wurde durch Abkühlen der Probe auf Eis gestoppt. Nachdem 16 µl *First-Strand*-Puffer (Fa. Gibco), 8 µl DTT (Fa. Gibco) und 8 µl 5mM dNTPs zu der

eisgekühlten Probe gegeben wurden, wurde diese für 2 min bei 37°C erhitzt. Die eigentliche reverse Transkription fand nach Zugabe von 4 µl *SuperScript II RT* (Fa. Gibco) für 90 min bei 37°C statt. Das Produkt der RT war, aufgrund der Consensus-Strukturen der 3 Segmente (s. Kap. 1.2.4, Tab. 3), cDNA aller drei HTV-Segmente, die bei -20°C gelagert wurde.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)

Das grundlegende Prinzip der PCR ist die Amplifikation doppelsträngiger DNA (ds-DNA) durch einen sich mehrfach wiederholenden, dreigeteilten Reaktionsablauf mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase. Durch hohe Temperaturen wird doppelsträngige DNA in einzelsträngige DNA (ss-DNA) geschmolzen. Im nachfolgenden Hybridisierungsschritt binden spezifische Oligonukleotidprimer an die ss-DNA, von denen ausgehend eine DNA-abhängige DNA-Polymerase den komplementären Strang in 5'-3'-Richtung synthetisieren kann. Diese Synthese findet im dritten, den sog. Elongationsschritt statt. Neben dNTPs sind die DNA-abhängigen DNA-Polymerasen hierbei auf eine bestimmte Salz- und Ionenkonzentration angewiesen, die mit vom Hersteller mitgelieferten Puffern eingestellt wird. Durch mehrfache Wiederholung dieses dreigeteilten Reaktionsablaufes erhält man eine exponentielle Anhäufung des PCR-Produktes.

Neben der Taq-Polymerase wurde für die Amplifikation des vollständigen NC zusätzlich das Enzym Pfu-Polymerase zugesetzt. Dieses Enzym hat im Gegensatz zur herkömmlichen Taq-Polymerase die Eigenschaft, fehlerhaft eingebaute Nukleotide über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität zu entfernen und somit die Fehlerquote bei der Replikation zu verringern.

Für die PCR des NC wurde eine sog. *touch-down-PCR* durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Hybridisierungstemperatur des PCR-Ansatzes in mehreren Schritten herabgesetzt. Hierdurch erreicht man eine höhere Ausbeute, wobei aber eine niedrigere Sensitivität und Spezifität in Kauf genommen werden muß.

Alle Reaktionen wurden in 100 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Zu 2 µl cDNA-Probe der reversen Transkription wurden jeweils 2 µl von einem Oligonukleotidvorwärtsprimer (PUUFW, HTNFW) und einem Oligonukleotidrückwärtsprimer (PUUIIRE, HTNIIRE, PUU348RE, HTN348RE) gegeben, deren 5'-Enden sog. *Linker* besaßen, die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen enthielten und für die weitere Klonierung der PCR-

Produkte nötig waren. Mit 10 µl 10xTaq-Puffer (Fa. MBI Fermentas, Litauen) und 2.5 mM MgCl₂ (Fa. MBI Fermentas, Litauen) wurden optimale Salz- und Substratbedingungen für die beiden Polymerasen eingestellt, von denen pro Reaktion 1 U Taq-Polymerase sowie 0.1 U Pfu-Polymerase eingesetzt wurden. Als Substrat der beiden Polymerasen wurden 50 µM eines jeden dNTPs (Fa. Sigma, Deisenhofen) der Reaktion zugegeben. Das Gesamtvolumen von 100 µl wurde mit Aqua dest. aufgefüllt.

2.3.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA erfolgte in Agarosegelen. In Abhängigkeit von der Größe des zu analysierenden DNA-Fragmentes wurde 1.2-2% Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend mit 0.002% Ethidiumbromid versetzt. Nach vollständiger Polymerisation dieser Gelgrundlage im Gelbett wurde das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm entfernt. Die DNA-Proben wurden im Volumenverhältnis 1:6 mit DNA-Auftragspuffer vermischt und in die Probenaschen pipettiert. Die Fragmente wurden bei 5-10 V/cm Gellänge 0.5-1.5 h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel im UV-Licht analysiert und fotografiert. Die Molekulargewichte der DNA-Banden wurden im Vergleich zu mitlaufenden DNA-Molekulargewichtsmarkern bestimmt.

2.3.5 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach Anleitung des Herstellers mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Fa. Qiagen, Hilden). Die gewünschte DNA-Bande wurde hierzu sauber aus dem Gel herausgeschnitten, der Agaroseblock aufgelöst und die Suspension über eine DNA-bindende Säule gegeben. Nach mehreren Waschschritten konnte die DNA mit H₂O von der Säule eluiert werden.

2.3.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

War eine Extraktion von DNA aus Agarosegelen nicht notwendig, sollten aber störende Proteine aus der Probe entfernt werden, so wurde das Produkt der PCR über Glasmilch (SiO₂-Partikel) aufgereinigt.

Hierzu wurden 100 µl PCR-Probenvolumen mit 300 µl 6 M NaI und 10 µl SiO₂ versetzt und unter häufigem Invertieren für 5 min bei RT inkubiert. Diese Suspension

wurde anschließend zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min) und das SiO₂-Sediment zweimal mit jeweils 600 µl New Wash-Lösung gewaschen (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min). Nach dem letzten Waschschrift wurde das noch feuchte SiO₂-Sediment bei 60°C getrocknet. Durch Vermischen des trockenen SiO₂-Sediment mit 50 µl Aqua dest. und nachfolgender Inkubation dieses Ansatzes bei 60°C für 5 min wurden die an dem SiO₂ gebundenen Nukleinsäuren abgelöst und durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min) von dem SiO₂ abgetrennt. Dieser nukleinsäurereiche und proteinarme Überstand wurde bei -20°C gelagert.

2.4 DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Aus Einzelstrang-DNA (ss-DNA) kann ausgehend von einem Oligonukleotidprimer in Anwesenheit von dNTPs durch eine DNA-anhängige DNA-Polymerase doppelsträngige DNA (ds-DNA) synthetisiert werden. Sind im Ansatz zusätzlich noch ein geringer Teil Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthalten, führt dieses zu einem zufällig verteilten Einbau dieser Analoga, da die DNA-Polymerase nicht zwischen dNTPs und ddNTPs zu unterscheiden vermag. Der Einbau führt aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxy-Gruppe der ddNTPs zu einem Abbruch der Doppelstrangsynthese und, da er statistisch verteilt erfolgt, zu unterschiedlich langen Polymeren. Da der Syntheseansatz viergeteilt ist und in jedem Reaktionsgefäß nur eines der vier ddNTPs vorhanden ist, kommt es in den jeweiligen Ansätzen zu basenspezifischen Kettenabbrüchen. Zur Markierung des synthetisierten Stranges wird der Reaktion [α -³⁵S]dATP zugegeben. Nach der Denaturierung und der Trennung der DNA-Polymere über eine Polyamidgelelektrophorese lassen sich die nukleinsäurespezifischen Banden autoradiographisch detektieren und die Sequenz des Einzelstranges direkt vom Röntgenfilm ablesen.

2.4.1 DNA-Denaturierung

Als erster Schritt zur Sequenzierung der Nucleocapsidproteine mußte die Plasmid-DNA denaturiert werden. Hierzu wurden 2 µg DNA mit 8 µl H₂O versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 7 µl H₂O, 3 µl 3M Kalium-Acetat pH4.8 sowie 60 µl Ethanol absolut -20°C zu der DNA-Lösung gegeben. Die DNA wurde

daraufhin für 30 min bei -70°C präzipitiert. Der anschließenden Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 10 min) folgte ein erneuter Waschgang des DNA-Sediments mit 300 μl Ethanol. Der ethanolhaltige ÜS wurde dekantiert und verworfen, das DNA-haltige Sediment wurde in der Speedvac durchgetrocknet. Die DNA wurde bis zur Sequenzreaktion bei -20°C gelagert.

2.4.2 Vorbereiten der Sequenzierung

Für das Sequenzgel wurden 50 ml Gellösung angesetzt. 21 g Urea, 6 ml 10x TBE-Puffer und 5 ml 40% PAA (19:1) wurden vermischt. Diese Lösung wurde nach dem vollständigen Auflösen des Ureas mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt und anschließend filtriert.

Zwei Glasplatten wurden gereinigt, mit Ethanol abgerieben und mit jeweils 400 μl Silikonlösung pro Platte beschichtet. Zwischen den Glasplatten wurden sog. *Spacer* gelegt und beide Platten wurden über Klammern fest verbunden.

Nach Zugabe von 250 μl 10%-iger APS-Lösung sowie 50 μl TEMED zur Gellösung wurde diese sofort zwischen beide Platten pipettiert und der Probenkamm eingesetzt, da das Gel innerhalb einer Stunde polymerisierte.

Bevor die DNA-Proben im Gel aufgetrennt werden konnten, mußte das Gel bei ca. 2 kV und 60 mA mindestens 30 min erwärmt werden.

2.4.3 Sequenzreaktion

Das getrocknete, DNA-haltige Sediment der DNA-Denaturierung wurde für eine Sequenzreaktion in 10 μl H_2O resuspendiert und mit 2 μl Annealing-Puffer sowie 20 pmol Oligonukleotidprimer versetzt. Diese Lösung wurde 20 min bei 37°C und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde zu dieser Annealing-Lösung 3 μl Labeling-Mix, 1.6 μl T7-Polymerase, 0.4 μl Dilution Puffer sowie 1 μl [$\alpha^{35}\text{S}$]dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) gegeben. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden jeweils 4.5 μl dieser Lösung auf die mit jeweils 2.5 μl ddNTP/dNTP-Mix (A/T/G/C-short) vorbeschickten Aussparungen der auf 37°C vortemperierten Probenplatte pipettiert. Nach genau 5 min wurde diese Polymerasereaktion mit jeweils 2.5 μl Stop-Solution abgebrochen. Die jeweiligen Proben (A/T/G/C) wurden vor der Auftrennung im Gel 2 min bei 80°C denaturiert.

2.4.4 Analyse der Sequenzierung

Nach vollständiger Elektrophorese wurde das Sequenzgel von den Platten entfernt und 30 min bei 80°C im Vakuumtrockner getrocknet, bevor es in der Dunkelkammer auf einen Biomax®-Röntgenfilm gelegt wurde. Je nach Aktivität des Gels, die mittels eines Geiger-Müller-Zählrohres ermittelt werden konnte, wurde das Gel 1-3 Tage auf dem Röntgenfilm belassen. Die Entwicklung des Röntgenfilmes erfolgte laut Protokoll in der dafür vorgesehenen Entwicklungsapparatur (Fa. Kodak, Stuttgart).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Präparation von denaturiertem NC-Rohextrakt aus *E.coli*

Eine Übernachtskultur (ÜNK, 3-10 ml) wurde 1:100 mit Amp-LB-Medium verdünnt und bis zu einer $OD_{560nm} \approx 0.8$ bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (0.5mM) induziert. Gleichzeitig wurden 60 µg/ml Ampicillin zugegeben. Nach einer Induktionszeit von 4 h wurde die Bakterien geerntet (Haereus Suprafuge 22, HFA-Rotor 14.290, 3000 x g, 4°C, 15 min). Die Bakterien wurden in 50:1-LYSISpuffer (5% des Kulturvolumens) aufgenommen und nach einstündiger Inkubation bei RT bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Bakteriensuspension erneut zentrifugiert (Haereus Suprafuge 22, HFA-Rotor 22.50, 30000 x g, 4°C, 15 min). Anschließend wurde der Überstand dekantiert und verworfen. Das Zellsediment wurde in Puffer B resuspendiert (2% des Kulturvolumens) und zentrifugiert (Haereus Suprafuge 22, HFA-Rotor 22.50, 30000 x g, 4°C, 15 min). Der hierbei gewonnenen zweite Überstand wurde für die chromatographische Aufreinigung des NC-Proteins eingesetzt.

2.5.2 Chromatographische Aufreinigung von denaturiertem NC-Protein

Bevor das in Puffer B befindliche *His Tag*-tragende NC-Protein über 5ml Ni^{+} -Sepharosesäule aufgereinigt werden konnte, mußte diese 2 x 30min in jeweils 20ml Puffer B präequilibriert werden. Im Anschluß an die Präequilibrierung wurde der zweite Überstand auf der Säule aufgetrennt und der Durchlauf in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Auf diesen Schritt folgten pH-Waschschritte mit jeweils 10 ml

Puffer B (pH 8.0), C (pH 6.3), D (pH 5.9), E1 (pH 4.5), E2 (pH 3.5) und F (pH 2.5). Der Puffer E2 eluierte das *His Tag*-tragende NC-Protein von der Säule, sodaß das Eluat E2 dialysiert und ultrafiltriert wurde.

2.5.3 Präparation von nativem NC-Rohextrakt aus *E. coli*

Sowohl die vollständigen als auch die N-terminalen Fragmente der HTV NC-Proteine wurden im nativen Zustand präpariert.

Analog zu der denaturierenden Proteinpräparation wurde die Expressionskultur bei einer $OD_{560nm} \approx 0.8$ mit IPTG (0.5 mM) induziert. Zu diesem Zeitpunkt wurde zusätzlich Ampicillin [60µg/ml] zum Expressionsansatz gegeben, um das Hervorwachsen von nicht-plasmidtragenden Bakterien zu verhindern. Nach 4 h Induktionsdauer wurde die Expressionskultur zentrifugiert (Haereus Suprafuge 22, HFA-Rotor 14.290, 3000 x g, 4°C, 20 min) und das Sediment in Nalys-Puffer (5% des Kulturvolumens) resuspendiert. In diesem Puffer wurde zur Zellyse, Proteaseninaktivierung und DNA-Abbau Lysozym, PMSF und DNase I eingesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde diese Suspension ÜN bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei RT wurde die Suspension erneut zentrifugiert (Haereus Suprafuge 22, HFA-Rotor 14.290, 3000 x g, 4°C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in Nason-Puffer (2.5% Kulturvolumen) resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde diese Zellsuspension für 4 x 2.5min auf Eis sonifiziert (Branson Sonifier Cell Disruptor B15), wobei die Temperatur der Suspension 37°C nie überschritt. Durch Zentrifugation (Haereus Suprafuge 22, HFA-Rotor 22.50, 10000 x g, 4°C, 15 min) wurde die Suspension in Überstand und Sediment aufgetrennt. Durch weitere native Aufbereitungsmethoden ließ sich aus dem immer noch sehr proteinreichen Zellsediment kein NC-Protein mehr in Lösung bringen, sodaß der Überstand chromatographisch aufreingt wurde.

2.5.4 Chromatographische Aufreinigung von nativem NC-Protein

Im Anschluß an die Präequilibrierung von 5ml Ni⁺-Sephrose-Säulematerials mit 20 ml Na-Puffer wurde der nach Sonifikation und Zentrifugation gewonnene Überstand auf der Ni⁺-Sephrose-Säule aufgetrennt und der Durchlauf in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 50 ml Na-Puffer und mit 50 ml Nawash-Puffer gewaschen. Auf diese Schritte folgten die pH-Waschschritte mit

jeweils zweifachem Säulenvolumen NaWash-Puffer (pH 6.0), I (pH 5.5), II (pH 5.0), III (pH 4.5), IV (pH 4.0), V (pH 3.5), VI (pH 2.0). Der Puffer IV eluierte das *His Tag*-tragende NC-Protein von der Säule. Anschließend wurde dieses Eluat, welches das gereinigte NC-Protein enthielt dialysiert und ultrafiltriert.

2.5.5 Dialyse und Ultrafiltration des gereinigten NC-Proteins

Die Eluate E2 und IV der beiden Proteinpräparationen wurden 3 x 24h gegen 20 mM EDTA pH 8.0 dialysiert. Hierzu wurde ein Dialyseschlauch gewählt, der für Moleküle bis zu einer Größe von 20000 MW permeabel war (Visking 27/32, Fa. Roth). Die anschließende Ultrafiltration wurde mit Aufkonzentratoren (Centriprep 30, Fa. Amicon) durchgeführt (Hermle ZK 380, 2000 x g, 4°C, 60 min).

Analog wurde mit den trunkierten NC-Proteinen NC PUU348 und NC HTN348 verfahren. Hierbei wurden aufgrund des niedrigeren Molekulargewichtes Dialyseschläuche mit einer Permeabilität für Proteine bis zu einem Molekulargewicht von 3500 (Spectr/Por3, Fa. Roth) und Konzentratoren mit einer Porengröße von max. 5000 KDa (Centriprep 5, Fa. Amicon) eingesetzt.

2.5.6 Reaktivierung des Ni⁺-Sepharsematerials

Im Anschluß an die chromatographische Aufreinigung wurde das Ni⁺-Sepharsematerial zum erneuten Gebrauch gewaschen und reaktiviert. Hierzu wurde an die Sepharsematrix gebundene Nickelionen und damit auch noch an der Säule verbliebene Proteine durch zweimaliges Waschen mit dem 4-fachen Säulenvolumen 0.1 M EDTA pH 8.0 vollständig eluiert, das EDTA komplexiert als Chelatbildner die Ni⁺-Ionen und wäscht Sie aus. An dem Sepharsesäulematerial befindliches EDTA wurde im Anschluß durch zweimaliges Waschen mit jeweils 25 ml Aqua dest. entfernt.

Reaktiviert wurde das Säulenmaterial in 50 ml Ni²⁺-Reaktivierungspuffer, in dem die Sepharsematrix 2 h gemischt wurde.

2.5.7 SDS-Page (Laemmli, 1970)

Die 1 mm dicken SDS-Polyacrylamidgele bestanden aus einem 3%-igen Sammelgel von 1 cm Höhe über einem 5 cm hohen Separationsgel mit einer Konzentration von 10% bzw. 15% Polyacrylamid (PAA 37.5:1, Fa. Roth, Karlsruhe). Diese

Trenngelkonzentration erlaubte eine optimale Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 40-80 kDa für ein 10%-iges Trenngel, bzw. 12-45 kDa für ein 15 %-iges Trenngel.

Es wurden analytischen Kämmen eingesetzt, die sich für jeweils 10 Proben mit einem Probenvolumen von je 20 µl eignen. Die präparativen Kämmen wurden für je zwei Proben mit einem Volumen von maximal 200 µl pro Tasche für den Streifen Western Blot verwendet.

Bevor Proteinproben auf das Gel aufgetragen wurden, mußten sie 1:1 (v/v) mit SDS-Ladepuffer vermischt und im Heizblock für 10 min bei 95°C aufgeköcht werden.

Proteinproben der Expression wurden dem Kulturansatz nach der Formel $100 / OD_{560nm} = \text{Volumen in } \mu\text{l}$ entnommen. Das durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge pico, 13000 UPM, 1 min) gewonnene Zellsediment wurde mit 20 µl SDS-Ladepuffer vermischt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht.

Die Reinigung der Gelplatten erfolgte mechanisch mit 70 % Ethanol. Als Surfactant wurde Silikonlösung. (Sigmacote®, Fa. Sigma) benutzt.

In Abbildung 5 ist exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung der metallchelatchromatographisch aufgereinigten, rekombinanten Proteine NC PUU II und NC HTN II in einem 10%-igen Separationsgel dargestellt.

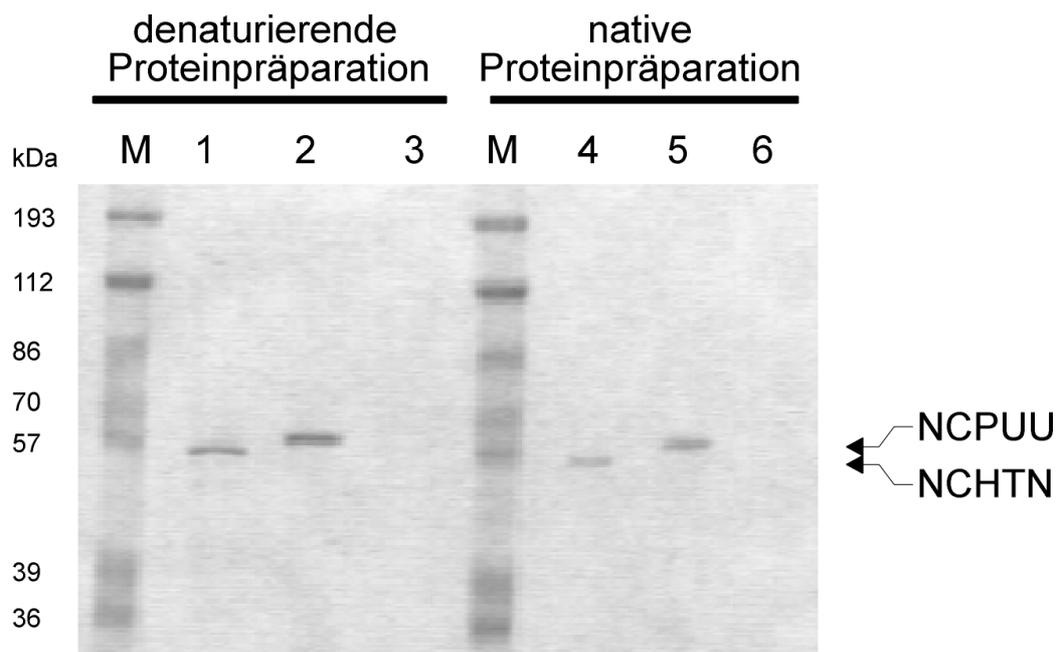
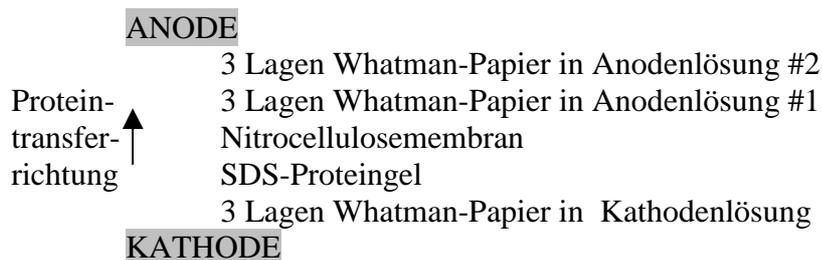


Abb. 5: SDS-Page der kompletten NC-Proteine NC HTN II und NC PUU II in der denaturierenden und nativen Proteinpräparation nach metallchelatchromatographischer Aufreinigung. M = Molekulargewichtsmarker

- 1: NC HTN II, denaturiert
- 2: NC PUU II, denaturiert
- 3: keine Proteinprobe
- 4: NC HTN II, nativ
- 5: NC PUU II, nativ
- 6: keine Proteinprobe

2.5.8 Western Blot - Proteintransfer

Für den Western Blot wurden je 3 Whatmanfilterpapiere 10 min in die Kathodenlösung, bzw. in die beiden Anodenlösungen #1 und #2 eingelegt. Die Nitrocellulosemembran wurde 10 min in der Anodenlösung #1 gebadet. Das SDS-Pagetrenngel mit den bereits aufgetrennten Proteinproben wurde 5 min in der Kathodenlösung getränkt, bevor der sog. *Blot-Sandwich* in folgender Reihenfolge luftblasenfrei zusammengesetzt wurde:



Transferiert wurden die Proteine in einer Semi-Dry-Blotapparatur (Fa. MWG) für 45 min bei max. 40 V. Die für einen optimalen Proteintransfer erforderliche Stromstärke von 32 mA errechnete sich aus folgender Formel:

$$0.8 \text{ mA} / \text{cm}^2 \text{ Trenngeloberfläche (5 x 8 cm)}$$

Die Nc-Membran wurde im Anschluß an den Blotvorgang 3x 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Sie konnte bei 4°C und Dunkelheit für mehrere Monate gelagert werden.

2.5.9 Western Blot - Immunreaktion

Die mit TBST-Puffer gewaschene Nc-Membran wurde 60 min in TBST-Blockpuffer geschwenkt und anschließend 4 h mit 1:50 in TBST-Blockpuffer vorverdünnten, präabsorbierten Patientenserum inkubiert. Nicht an die NC-Membran gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBST-Puffer (6 x 10 min) von der Nc-Membran entfernt, bevor der 2. Antikörper auf die Nitrocellulosemembran gegeben wurde. Dieser Peroxidase-konjugierte anti-human IgG-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:500 in TBST-Blockpuffer eingesetzt. Nach einstündiger Inkubation wurde die Nc-Membran erneut mit TBST-Puffer (3 x 10 min) und anschließend mit NT-Puffer (3 x 10 min) gewaschen, um das in dem TBST-Puffer befindliche Tween20 von der Nc-Membran zu entfernen. Die Darstellung der durch den 2. AK markierten Proteine gelang durch Zugabe von Immunoblot-Färbelösung zu der Nc-Membran, die HRPO-markierte Banden lila anfärbte. Die Farbreaktion ließ sich durch mehrfaches Waschen der Nc-Membran mit Aqua dest. stoppen. Mit HRPO und 4-Chloro-1-Naphthol gefärbte Nitrocellulose mußte nach dem Trocknen dunkel gelagert werden, da sie bei Licht ausbleichte.

2.5.10 Proteinmengenbestimmung

Nach Zugabe von 1 ml Bradford-Reagenz und 95 µl 20 mM EDTA pH 8.0 zu 5 µl der zu bestimmenden Proteinprobe wurde deren Extinktion bei 595 nm gemessen. Anhand einer mit definierten Verdünnungen erstellten Rinderalbumin-Standardkurve konnte der Proteingehalt anschließend direkt von dieser abgelesen werden.

2.5.11 Verdrängung des unspezifischen Hintergrundes bei der Immunreaktion

Um den unspezifischen Hintergrund, der allgemein bei Immunreaktionen gegen Proteine von *E. coli* und Vero E6-Zellen auftritt, zu verringern, wurden die rekombinanten Nucleocapsidproteine chelatchromatographisch aufgereinigt. Zusätzlich wurden die Patientenseren mit *E. coli*- und Vero E6-Zelllysate präabsorbiert. Für die *E. coli*-Serumpräabsorption wurde 1 ml ÜNK von *E. coli* BL21 (DE3) in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei einer $OD_{560nm} \approx 1.4$ durch Zentrifugation (Heraeus Suprafuge 22, HFA-Rotor 14.290, 3000 x g, 4°C, 15 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 10 ml PBS pH 7.4 resuspendiert, anschließend 5 min bei 100°C denaturiert, á 200 µl portioniert und bei -20°C weggefroren.

Mit Hilfe eines Zellschabers (Fa. Greiner) wurden die adhären wachsenden, nicht infizierten Vero E6-Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und zentrifugiert (Hermle ZK 380, 1000 x g, 10 min). Das Sediment wurde mit 1.5 ml PBS vermischt und 5 min bei 100°C aufgeköcht bevor es bei -20°C gelagert wurde. Das Patientenserum wurde im Verhältnis 1:1 (v/v) mit beiden Zelllysaten vermischt und unter gelegentlichem Invertieren 12 h bei 4°C gelagert, bevor es in der Immunreaktion eingesetzt wurde.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Zellkultur

Vero E6-Zellen sind Epithelzellen von *Cercopithecus aethiops* und können in verschiedenen Medien gezüchtet werden. Neben dem am häufigsten eingesetzten MEM-Medium und seinen Modifikationen findet unter anderem das L15-Leibovitz Medium Anwendung in der Zellanzucht von Vero E6-Zellen.

Der in dieser Arbeit eingesetzte Vero E6-Laborstamm war an L15-Leibovitz Medium adaptiert, dem pro Liter Medium 50000 I.E. Penicillin-Streptomycin und 2-10% Endkonzentration Neugeborenen-Kälberserum (*New Born Calf Serum*, NBCS) zugesetzt wurde. Das Medium wurde bei 4°C gelagert.

Zur Zellzucht wurden 250cm³ Zellkulturflaschen für adhären wachsende Zellen benutzt. Da Vero E6-Zellen keine zusätzliche CO₂-Begasung benötigten, konnten sie in einem Normal-Atmosphären-Brutschrank bei 37°C gehalten werden.

Für die Betrachtung der Zellen stand ein Mikroskop mit einer maximal 400-fachen Vergrößerung zur Verfügung (Modell Diavert, Fa. Leitz).

Gearbeitet wurde mit Zellkulturen grundsätzlich unter sterilen Bedingungen unter einer sog. *Flow*.

2.6.2 Generationswechsel der Vero E6-Zellen

Zur Teilung der Zellen wurden diese 10 min mit 20 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml EDTA-Trypsinlösung (Fa. Sigma, Deisenhofen) von dem Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. Zu den abgelösten Zellen wurde über eine Pipettierhilfe 10 ml 5% NBCS-L15-Leibovitz-Medium gegeben und gut mit den Zellen vermischt. Diese Zellsuspension wurde anschließend zu gleichen Anteilen in vorbereitete Gewebekulturflaschen überführt und auf jeweils 30 ml 5% NBCS-L15-Leibovitz Medium aufgefüllt. Nicht benötigte Zellen wurden verworfen.

2.6.3 Vero E6-Zellen einfrieren und auftauen

Mit einem Zellschaber wurden die adhärent wachsenden Vero E6-Zellen von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und in ein steriles 50 ml Probenröhrchen (Fa. Falcon) überführt. Nach Zentrifugation (Hettich Mikro Rapid/K, 1000 x g, 4°C, 10 min) wurde das gewonnene Zellsediment in 1 ml eisgekühltem, steril filtriertem Einfriermedium vermischt und sofort bei -70°C eingefroren.

Bei -70°C eingefrorene Zellkultursuspensionen wurden reaktiviert, indem sie unmittelbar nach dem Auftauen auf Eis in eine mit 50 ml 10% NBCS-L15 Leibovitz Medium gefüllte Zellkulturflasche pipetiert wurden. Nach 6-8h Wachstum wurde das Medium entfernt und durch 30 ml 5% NBCS-L15 Leibovitz Medium ersetzt. Die reaktivierten Zellen wurden frühestens am 5. Tag geteilt.

2.6.4 Vero E6-Zellen mit HTV infizieren

Nach dem Einschleusen der nicht infizierten Zellen in das L3-Sicherheitslabor, wurde, falls nicht schon vorher geschehen, ein Medienwechsel nach 5% NBCS L15-Leibovitz Medium durchgeführt. Anschließend wurde zu jeder Zellkultur 500 µl virusinfizierte Zellkultursuspension gegeben. Dieses entspricht etwa 2×10^5 infizierte Zellen auf 1×10^6 nicht infizierte Zellen.

Eine Kontrolle der Infektionsrate wurde erstmals nach 5-7 Tagen mit Hilfe des IFT durchgeführt, da Vero E6-Zellen mikroskopisch keinen spezifischen cytopathischen Effekt (CPE) zeigen. Ausreichend infizierte Zellen (Infektionsrate > 70%) wurden zentrifugiert (Hettich Mikro Rapid/K 1000 x g, 15min) und nach einmaligen Waschen mit 20 ml sterilem PBS als trockenes Sediment bei -70°C gelagert.

2.6.5 Immunfluoreszenztest (IFT, IFA) infizierter Zellkulturen

Infizierte Zellkulturen wurden zur Kontrolle mittels IFT auf ihre Infektionsrate untersucht (Abb. 6). Hierzu wurden die Vero E6-Zellen mit dem Zellschaber (Fa. Greiner) von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend zentrifugiert (Hettich Mikro Rapid/K, 1000 x g, RT, 15min). Das gewonnene Sediment wurde mit 1 ml 5% NBCS L15-Leibovitz Medium vermischt und auf vorbereitete Objektträger getropft. Diese wurden 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, bevor sie mit eiskaltem Aceton 15 min lang fixiert wurden. Nach der Fixation konnten die Objektträger gefahrlos aus dem L3-Sicherheitslabor ausgeschleust und für spätere Anwendungen bei -20°C dauerhaft gelagert werden.

Fixierte Objektträger wurden 1 h bei 37°C mit in PBS 1:10 vorverdünnten Seren inkubiert. Dabei wurden die Objektträger in einer sog. feuchten Kammer aufbewahrt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach der Inkubation wurden die Objektträger 3 x 10 min mit IFT-PBS gewaschen, bevor sie für 25 min bei 37°C mit dem zweiten, FITC-konjugierten anti-human-IgG-Antikörper inkubiert wurden. Nicht an Objektträger gebundene Antikörper oder antikörperlose FITC-Konglomerate wurden anschließend mit IFT-PBS (6 x 10 min) heruntergewaschen. Zur Beurteilung der Infektionsrate stand ein Fluoreszenzmikroskop (Modell SM-Lux, Fa. Leitz) zur Verfügung.

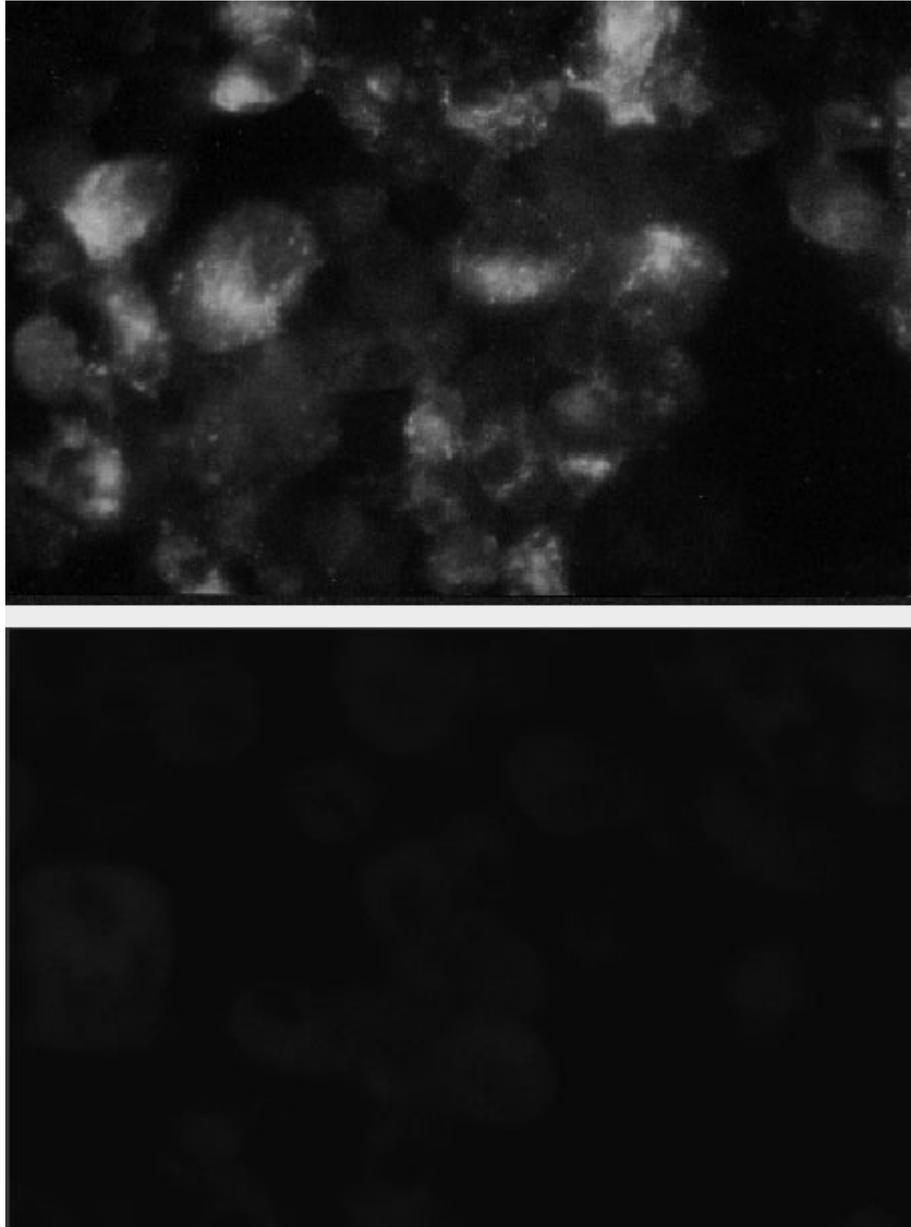


Abb. 6: Eine mit PUU-Viren infizierte Vero E6-Zellkultur im IFT am 7. Tag nach Infektion

oben: positives Patientenserum (Serum #2626)

unten: negatives Patientenserum

3 Ergebnisse

3.1 Isolation und Klonierung der codierenden Sequenzen viraler Nucleocapsidproteine

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Virusanzucht in eukaryontischer Zellkultur, die anschließende Isolierung viraler RNA, deren reverser Transkription in cDNA und die Klonierung der jeweiligen NC-Proteine der Hantaserotypen PUU und HTN als N-terminales Fragment und zusätzlich in der vollständigen Länge. Ein Sequenzvergleich der erstellten Klone mit bereits veröffentlichten cDNA-Sequenzen der NCBI-Gendatenbank sollte die Identität der erstellten Klone bestätigen.

3.2 Isolierung und Amplifikation hantaviraler RNA aus infizierter Vero E6-Zellkultur

Um eine gleichbleibend hohe Infektionsrate der Vero E6-Zellkultur zu erhalten, wurden nichtinfizierte Zellen in einem Verhältnis von 1:5 mit zu 80% hantavirusinfizierten Zellen versetzt und für 7 Tage bei 37°C inkubiert.

Aus sedimentierten Zellen einer infizierten Zellkulturflasche wurde die Gesamt-RNA isoliert und unter Verwendung eines HTV-spezifischen RT-Oligonukleotidprimers in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente in einer *touch-down*-PCR als Template für die Amplifikation der Nucleocapsidproteine und -fragmente. In Anwesenheit der Primer PUUFW und PUUIIRE mit cDNA des PUU-Virus als Template wurde die codierende Sequenz des PUU Nucleocapsidproteins (NC PUU II) amplifiziert, während für das N-terminale PUU Nucleocapsidfragment die Primer PUUFW und PUU348RE eingesetzt wurden (NC PUU348).

Die Amplifikation des HTN-Virus-Nucleocapsidproteins und des N-terminales Fragmentes geschah unter Verwendung der jeweiligen Primerpaare HTNFW und HTNIIRE (NC HTN II) sowie HTNFW und HTN348RE (NC HTN348) in Anwesenheit des Hantaan cDNA-Templates (Abb. 7).

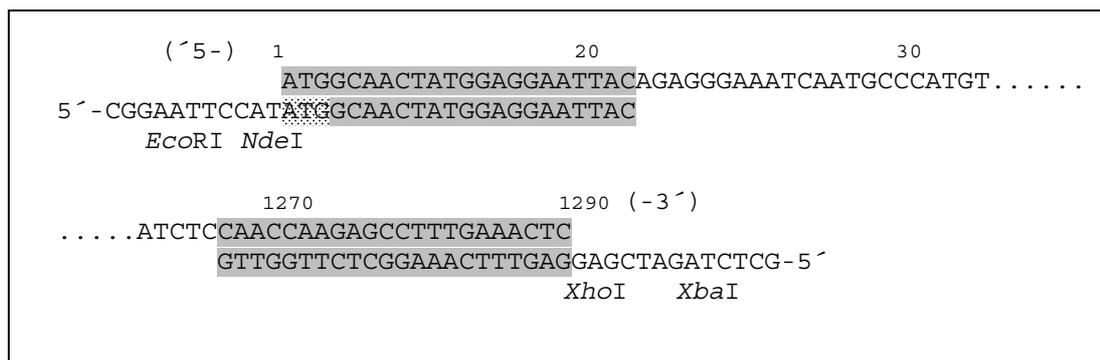


Abb. 7: Klonierungsstrategie exemplarisch für das HTN Nucleocapsidprotein (NC HTN II). Dunkelgrau unterlegte Nukleotide kennzeichnen identische Abschnitte. Das hellgrau unterlegte Triplet markiert das Starttriplett ATG, welches sowohl Bestandteil der Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *NdeI* ist als auch die erste AS codiert

Die vollständigen Nucleocapsidproteine NC PUUII und NC HTNII wurden nach dem in Tabelle 5 dargestellten Zeit-Temperatur-Schema amplifiziert. Entsprechend der molekularen Größe der beiden NC-Proteine konnten im Anschluß an die PCR-Reaktion im Agarosegel Banden unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden, die die codierenden Sequenzen der PUU- und HTN-Nucleocapside repräsentierten (Abb. 8).

Die Sequenzen der trunkierten Nucleocapsidproteine wurden wie die Sequenzen der vollständigen Nucleocapsidproteine nach einem *touch-down*-Schema amplifiziert. Aufgrund der geringeren Größe dieser Proteine konnten, wie in Tabelle 6 dargestellt, die jeweiligen PCR-Schritte zeitlich entsprechend verkürzt werden. Im 1.2%-igen Agarosegel zeigten die beiden PCR-Produkte mit jeweils 348 bp eine identische Größe (Abb. 9).

Tabelle 5: Ablauf der PCR der vollständigen NC-Proteine

Nr	PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	2min	95°C
2	5 Zyklen Denaturierung	1min	95°C
	Hybridisierung	1min	62°C
	Synthese	3min	72°C
3	5 Zyklen Denaturierung	1min	95°C
	Hybridisierung	1min	60°C
	Synthese	3min	72°C
4	20 Zyklen Denaturierung	1min	95°C
	Hybridisierung	1min	55°C
	Synthese	3min	72°C
5	Terminale Synthese	10min	72°C
6	PCR-Ende	∞	16°C

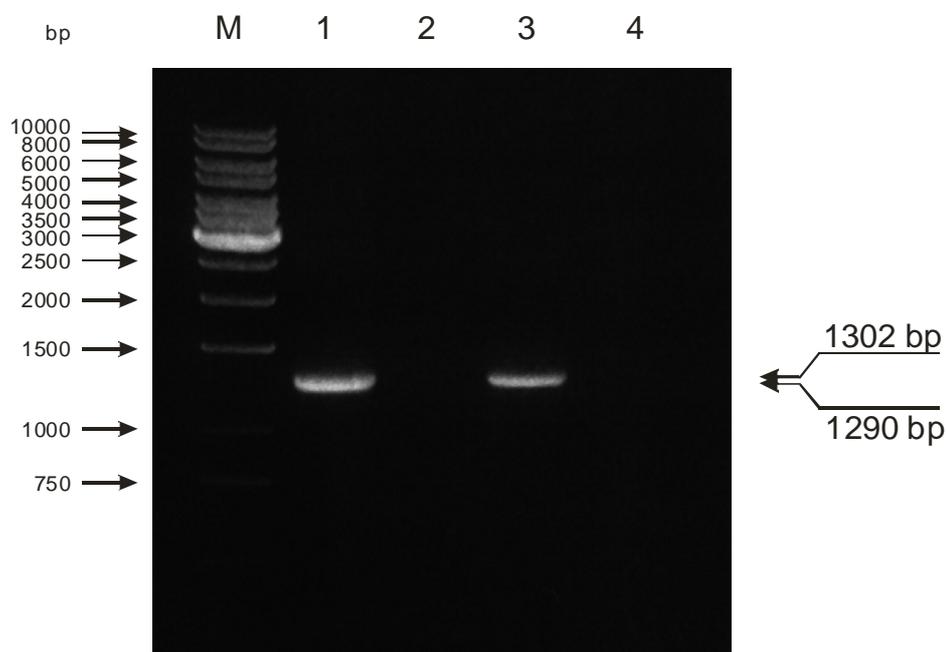


Abb. 8: PCR der kompletten codierenden Sequenz der NC-Proteine der beiden Serotypen HTNV (1290 bp, Bahn 1) und PUUV (1302 bp, Bahn 3). Auf den Bahnen 2 und 4 sind jeweils Negativkontrollen aufgetragen. M = Molekulargewichtsmarker

Tabelle 6: Ablauf der PCR der trunkierten NC-Proteine

Nr	PCR-Schritt	Zeit	Temperatur
1	Initiale Denaturierung	5min	95°C
2	5 Zyklen Denaturierung	45s	95°C
	Hybridisierung	45s	62°C
	Synthese	45s	72°C
3	5 Zyklen Denaturierung	45s	95°C
	Hybridisierung	45s	60°C
	Synthese	45s	72°C
4	20 Zyklen Denaturierung	45s	95°C
	Hybridisierung	45s	55°C
	Synthese	45s	72°C
5	Terminale Synthese	10min	72°C
6	PCR-Ende	∞	16°C

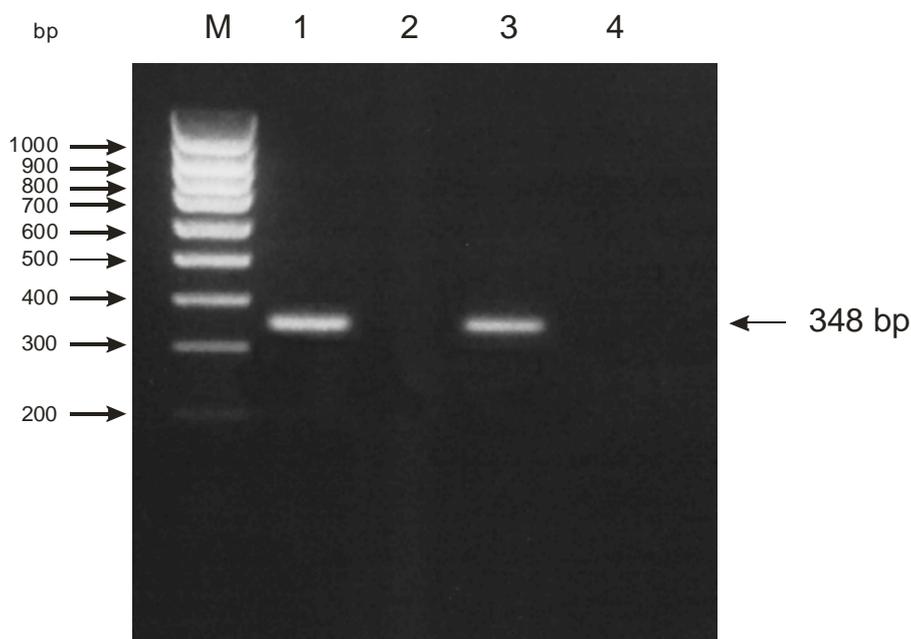


Abb. 9: PCR der N-terminalen 348 bp der codierenden Sequenz der NC-Proteine der beiden Serotypen HTNV (Bahn 1) und PUUV (Bahn 3). Auf den Bahnen 2 und 4 sind jeweils die Negativkontrollen aufgetragen. M = Molekulargewichtsmarker

3.3 Klonierung in einen prokaryontischen Expressionsvektor

Durch Primerverlängerungen wurden die codierenden Sequenzen der NC-Proteine in der PCR mit den flankierenden Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* versehen. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden direkt in den prokaryontischen Expressionsvektor pET22b kloniert, der in Abbildung 10 schematisch dargestellt ist.

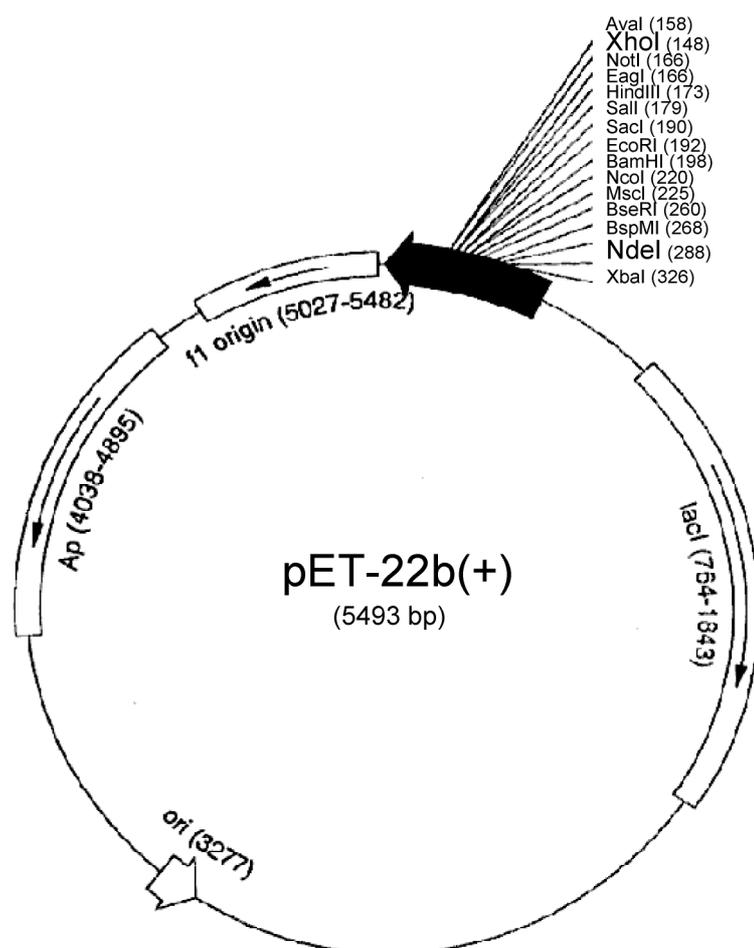


Abb. 10: Schematische Übersicht über den Aufbau des Expressionsplasmids pET22b(+) [Fa. Novagen, USA]. Eingetragene Pfeile geben die Leserichtung an. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die *multiple cloning side*, in das die PCR-Produkte über die groß markierten Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* kloniert wurden.

Die außen flankierenden Schnittstellen des HTN PCR-Produktes *EcoRI* und *XbaI*, sowie *EcoRI* und *PstI* des PUU PCR-Produktes dienten zur Klonierung in den Klonierungsvektor pGEM3Z. Da die PCR-Produkte aber direkt in den pET-Expressionsvektor klonierbar waren, war eine Umklonierung nicht notwendig und es wurde direkt mit den jeweiligen Expressionsklonen weitergearbeitet. Die Wahl des Expressionsvektors fiel anfänglich auf den mit einem N-terminalen *His Tag* ausgestatteten pET28a, in den sich die PCR-Produkte der trunkierten NC-Proteine sowie die vollständigen NC-Proteine problemlos und korrekt klonieren ließen. Die Expression und anschließende Aufreinigung des vollständigen HTN-NC-Proteins war jedoch in diesem Vektor trotz mehrmaliger RNA-Isolierung und nachweislich korrekter Klonierung sowie der Optimierung der Expressionsbedingungen und Anpassung der N-terminalen 500 bp an die *codon-usage* von *E. coli* nicht möglich, so daß auf einen anderen Vertreter der *His Tag*-tragenden Expressionsvektoren zurückgegriffen wurde. Mit den in Abbildung 7 (Kap. 3.2) dargestellten Primern wurde das nun als NC HTN II bezeichnete PCR-Produkt amplifiziert und in den C-terminal *His Tag* tragenden pET22b kloniert. Unter Verwendung dieses Expressionsvektors (pHTNII) wurde sowohl die Expression als auch die anschließende Aufreinigung des gewünschten Hantaan Nukleocapsidprotein in *E. coli* erreicht. Analog wurde mit dem NC PUU und den trunkierten NC-PCR-Produkten verfahren. Die erstellten Klone wurden vor Sequenzierung und Expression der NC-Proteine zum Nachweis einer Transformation mit Hilfe der beiden Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *XhoI* verdaut. Bei einer erfolgreichen Transformation konnten nach DNA-Hydrolyse mit spezifischen Restriktionsendonukleasen und Auftrennung im Agarosegel zwei spezifische Banden nachgewiesen werden. Neben der etwa 5500 bp großen Bande, die das pET22b-Plasmid repräsentierte, konnte eine zweite Bande nachgewiesen werden, die der molekularen Größe entsprechend das jeweilig inserierte PCR-Produkt darstellte (Abb. 11 und 12).

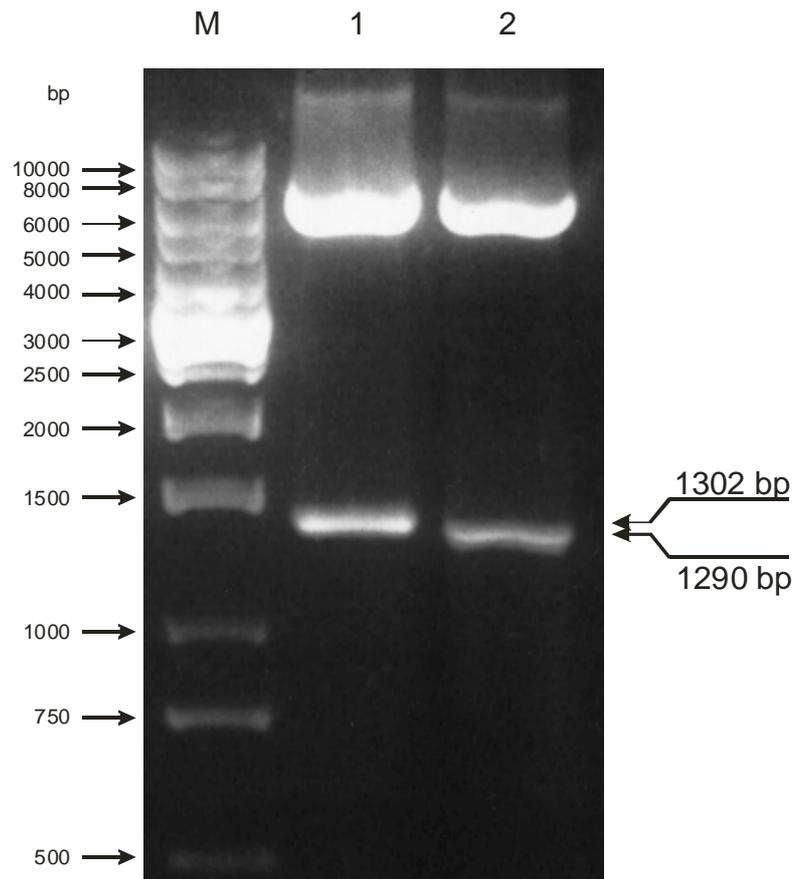


Abb. 11: Gelelektrophoretische Trennung der Fragmente der Expressionskonstrukte pPUUII und pHTNII nach Restriktionsverdau der Expressionskonstrukte mit *NdeI* und *XhoI*. M = Molekulargewichtsmarker

- 1: pPUUII *NdeI* und *XhoI*-Verdau, 1302 bp
- 2: pHTNII *NdeI* und *XhoI*-Verdau, 1290 bp

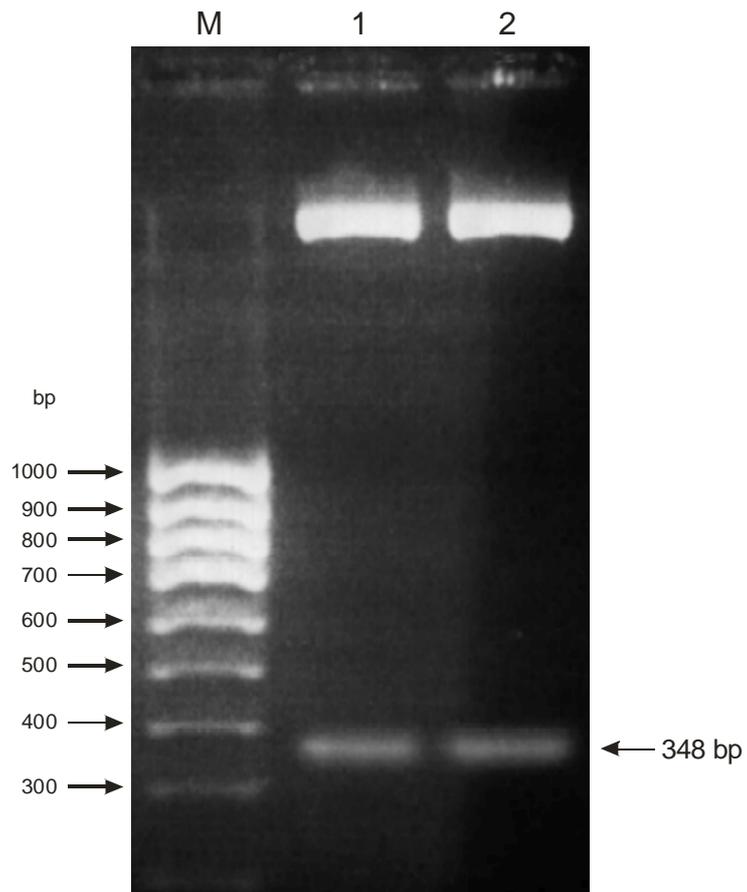


Abb. 12: Gelelektrophoretische Trennung der durch Restriktionsverdau mit *Nde*I und *Xho*I erhaltenen Fragmente der Expressionskonstrukte pPUU348 und pHTN348. M = Molekulargewichtsmarker

- 1: pPUU348 *Nde*I und *Xho*I-Verdau, 348 bp
- 2: pHTN348 *Nde*I und *Xho*I-Verdau, 348 bp

3.4 Sequenzbestimmung

Durch die DNA-Sequenzierung wurde nachgewiesen, daß die PCR-Produkte der NC-Proteine korrekt in den Expressionsvektor inseriert wurden. Hierzu mußten, aufgrund der Größe der codierenden Sequenz der NC-Proteine mehrere Nukleotidprimer verwendet werden. Die Sequenzierungsstrategie ist in Abbildung 13 dargestellt.

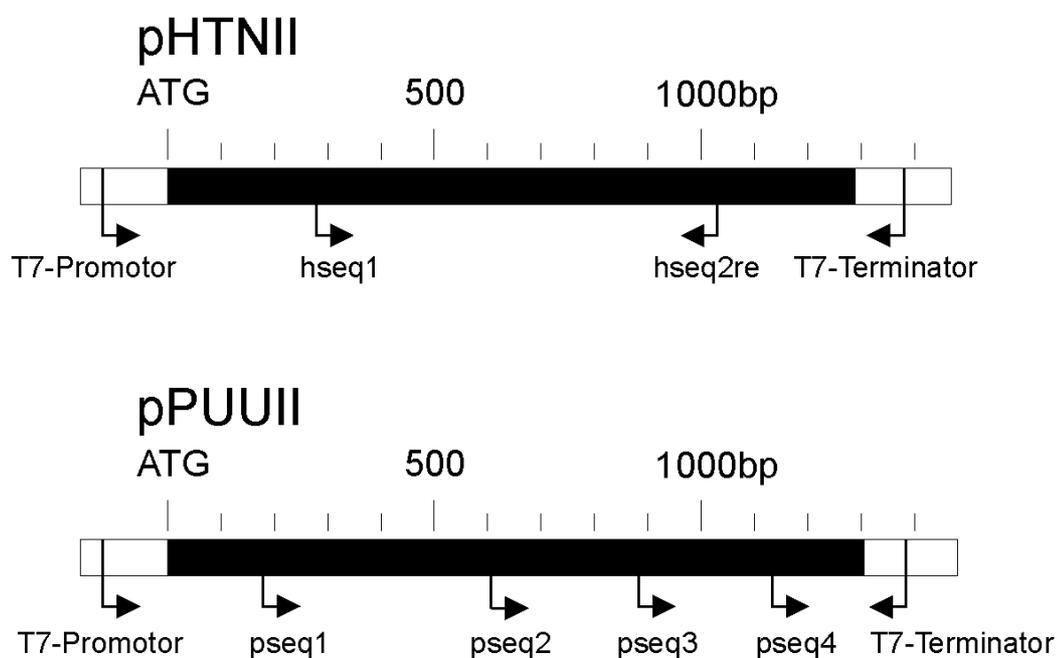


Abb. 13: Schematische Darstellung der Sequenzierungsstrategie für die NC-Proteine der beiden Serotypen HTN (pHTNII) und PUU (pPUUII). Verwendete Oligonukleotidprimer sind mit ihrer jeweiligen Orientierung gekennzeichnet. Die trunkierten NC-Proteine der beiden Serotypen HTN und PUU wurden nur über die Oligonukleotidprimer T7-Promotor und T7-Terminator sequenziert.

Die mit Hilfe der Kettenabbruchmethode (Kap. 2.4) erhaltenen Sequenzen wurden mit Referenzsequenzen verglichen, die aus der NCBI-Gendatenbank im Internet bezogen wurden. Die klonierten Sequenzen sind in den Abbildungen 14, 15 und 16, die Nukleotidaustausche und resultierende Aminosäureaustausche in den Tabellen 7 und 8 dargestellt. In dem trunkierten Klon pHTN348 traten die gleichen vier Basenaustausche auf wie in dem Klon des kompletten NC-Proteins (pHTNII), so daß in der Abbildung 16 nur die Sequenz des Klons pHTNII dargestellt wurde.

```

pPUUII
1 (5'-)
ATGAGTGACCTTGACAGACATCCAAGAGGAGATAACCCGCCATGAGCAACAACTTGTGTGTT

61
GCCAGACAAAAACTCAAGGATGCAGAGAGAGCAGTGGAAAGTGGACCCGGATGACGTTAAC

121
AAGAGCACATTACAAGCAAGACAACACAACAGTGTCTAGCACTGGAGGATAAACTCGCAGAC
147

181
TACAAGAGAAGAATGGCAGATGCTGTGTCCCGGAAGAAAATGGATACTATAAACCTACTGAC
228

241
CCGACTGGGATTGAACCTGATGATCATCTCAAGGAGAGATCAAGCCTTAGATATGAAAAAT

301
GTCCTTGATGTGAATGCTATTGACATTGAAGAACCAAGTGGCCAGACAGCAGATTGGTAT

361
ACTATCGGAGTCTATGTAATAGGGTTCACAATTCCTATCATTTTGAAGGCTCTATATATG

421
TTGTCAACACGTGGAAGACAGACTGTAAAGGAAAAACAAAGGAACACGGATCAGGTCTCAAG
476

481
GATGACACATCATTTGAGGATATCAATGGCATCAGGAGACCAAAACACCTATATGTATCC

541
ATGCCTACTGCCCAGTCCACCATGAAAGCTGAAGAACTTACACCTGGACGGTTCCGTACA

601
ATAGTATGTGGCTTATTCCCTACACAGATACAAGTTCGTAACATCATGAGTCCAGTAATG

661
GGAGTGATTGGTTTTTTCTTTCTTCGTTAAAGACTGGCCAGAAAAAATTAGGGAGTTTATG

721
GAGAAAGAATGCCCTTTCATAAAGCCTAGAAGTTAAACCTGGGACACCAGCACAGGAGGTA
747

781
GAATTTTTGAAAAGAAATAGAGTTTATTTTCATGACCCGCCAGGATGTTCTTGACAAAAAT

841
CATGTGGCTGACATCGATAAGTTGATTGACTATGCTGCCTCTGGTGACCCTACATCGCCT

901
GATGACATCGAATCTCCTAATGCACCATGGGTATTTGCTTGTGCACCAGATCGGTGCCCC

961

```

CCAACATGTATTTATGTTGCTGGGATGGCTGAATTAGGTGCATTCTTTTCCATCTTACAG

1021
GATATGAGGAACACCATTATGGCATCTAAAACGTGGGCACAGCAGAAGAGAACTGAAA

1081
AAGAAGTCCTCCTTCTATCAATCATATTTGCGCCGAACACAATCAATGGGGATTCAACTT

1141
GATCAGAGGATAATCCTACTGTACATGTTGGAATGGGGAAGAGAAATGGTGGATCATTTC

1201
CATCTTGGTGATGACATGGATCCTGAGCTAAGGGCCTTGCTCAGTCACTCATAGACCAG

1261
AAGGTAAAGAGATATCAAACCAAGAACCCTTAAAGATATGA

Abb. 14: cDNA-Sequenz des PUU Hällnäs B1 (PUSSEG, M32750; Stohwasser et al., 1990). Grau markierte Nukleotide kennzeichnen im Klon pPUUII abweichende Nukleotide.

pPUU348
1 (5'-)
ATGAGTGACTTGACAGACATCCAAGAGGAGATAACCCGCCATGAGCAACAACCTGTTGTT

61
GCCAGACAAAACTCAAGGATGCAGAGAGAGCAGTGGAAAGTGGACCCCGATGACGTTAAC
A

121
AAGAGCACATTACAAGCAAGACAACAAACAGTGTGAGCACTGGAGGATAAACTCGCAGAC
C

181
TACAAGAGAAGAATGGCAGATGCTGTGTCCCGAAGAAAATGGATACTTAAACCTACTGAC
A

241
CCGACTGGGATTGAACCTGATGATCATCTCAAGGAGAGATCAAGCCTTAGATATGGAAAT

301
GTCCTTGATGTGAATGCTATTGACATTGAAGAACCAAGTGGCCAGACA

Abb. 15: cDNA-Sequenz des PUU Hällnäs B1 (PUSSEG, M32750; Stohwasser et al., 1990). Grau markierte Nukleotide kennzeichnen im Klon pPUU348 abweichende Nukleotide.

pHTNII / pHTN348
1 (5'-)
ATGGCAACTATGGAGGAATTACAGAGGGAAATCAATGCCCATGAGGGTCAATTAGTGATA

61
GCCAGGCAGAAGGTGAGGGATGCAGAAAAACAGTATGAAAAGGATCCAGATGAGTTGAAC

121
AAGAGAAACATTAACCTGACCGAGAGGGCGTTGCAGTATCTATCCAGGCAAAAATTGATGAG
G A

182
TTAAAAAGGCAACTGGCAGATAGGATTGCAACTGGGAAAAACCTTGGGAAGGAACAAGAT
C A

241

CCAACAGGGGTGGAGCCTGGAGACCATCTGAAAGAGAGGTCAATGCTCAGTTATGGTAAT
 301 | 3'-Ende pHTN348
 GTGCTGGATTTAAACCATTTGGATATTGATGAACCTACAGGACAGACAGCAGACTGGCTG
 361
 AGCATCATCGTCTATCTTACATCCTTTGTCTGTCCTCCGATACTTCTGAAAGCTCTGTATATG
 421
 TTGACAACAAGGGGGAGGCAAACCTAACCAAGGATATAAAGGGACCCGGATTTCGATTTAAG
 481
 GATGATAGCTCGTTTCGAGGATGTTAACGGTATCCGGAAACCAAAACATCTTTACGTGTCC
 541
 TTGCCAAATGCACAGTCAAGCATGAAGGCAGAAGAGATTACACCTGGTAGATATAGAACA
 601
 GCAGTCTGTGGGCTCTACCCTGCACAGATTAAGGCACGGCAGATGATCAGTCCAGTTATG
 661
 AGTGTAATTGGTTTTCTAGCATTAGCAAAGGACTGGAGTGATCGTATCGAACAATGGTTA
 721
 ATTGAACCTTGCAAGCTTCTTCCAGATACAGCAGCAGTTAGCCTCCTTGGTGGTCCTGCA
 781
 ACAACAGGGACTACTTACGGCAGCGGCAAGTGGCATTAGGCAATATGGAGACAAAGGAG
 841
 TCAAAGGCTATACGCCAGCATGCAGAAGCAGCTGGCTGTAGCATGATTGAAGATATTGAG
 901
 TCACCATCATCAATATGGGTTTTTGGCTGGAGCACCAGACCGTTGTCCACCAACATGTTTG
 961
 TTTATAGCAGGTATTGCTGAGCTTGGGGCATTTTTTTTCCATCCTGCAGGACATGCGAAAT
 1021
 ACAATCATGGCCTAAGACAGTTGGAACATCTGAGGAGAAGCTACGGAAGAAATCATCA
 1081 1130
 TTTTATCAGTCCTACCTCAGAAGGACACAATCAATGGGGATACAACCTAGGCCAGAGAATT
 A
 1141
 ATTGTGCTCTTCATGGTTGCCTGGGGAAAGGAGGCTGTGGACAACTTCCACTTAGGGGAT
 1201
 GATATGGATCCTGAGCTAAGGACACTGGCACAGAGCTTGATTGATGTCAAAGTGAAGGAA
 1261
 ATCTCCAACCAAGAGCCTTTGAAACTC

Abb. 16: cDNA-Sequenz des HTN 76-118 (HANSNC, M14626; Schmaljohn, et al., 1986). Grau markierte Nukleotide kennzeichnen im Klon pHTNII, bzw. pHTN348, abweichende Nukleotide. In Position 348 ist das 3'-Ende des Klones pHTN348 dargestellt.

Tabelle 7: Nukleotidaustausche und daraus resultierende Aminosäureaustausche in den jeweiligen Nucleocapsidproteinen/-fragmenten

Klon	Pos	Triplett Genbank	Triplett Klon	AS Genbank	AS Klon
pPUUII	147	CAA	CAC	Gln	His
	228	ACT	ACA	Thr	<>
	476	TTC	TCC	Phe	Ser
	747	GCA	GCT	Ala	<>
pPUU348	108	GAT	AAT	Pro	<>
	147	CAA	CAC	Gln	His
	228	ACT	ACA	Thr	<>
pHTNII	127	ACA	GCA	Thr	Ala
	136	GAC	AAC	Asp	Asn*
	182	TTA	TCA	Leu	Ser*
	227	GGG	GAG	Gly	Asp
	1130	GGC	GAC	Gly	Asp
pHTN348	127	ACA	GCA	Thr	Ala
	136	GAC	AAC	Asp	Asn*
	182	TTA	TCA	Leu	Ser*
	227	GGG	GAG	Gly	Asp

Unveränderte Aminosäuren wurden mit Rauten (<>) gekennzeichnet Sterne. (*) markieren AS-Austausche innerhalb eine AS-Gruppe.

Tabelle 8: Homologien der erstellten Klone im Vergleich zu den publizierten Originalsequenzen PUU Hällnäs B1 und HTN 76-118.

Klon	bp	bp-Diff.	Homologie in %	AS	AS-Diff.	Homologie in %
pPUUII	1302	4	99,69	434	2	99,53
pPUU348	348	3	99,13	116	1	99,13
pHTN II	1290	5	99,61	430	5	98,24
pHTN348	348	4	98,85	116	4	96,55

bp = Basenpaare, bp-Diff. = abweichende Basenpaare im erstellten Klon, AS = Aminosäure, AS-Diff. = abweichende Aminosäuren im erstellten Klon.

3.5 Expression und Proteinpräparation der rekombinanten Nucleocapsidproteine

3.5.1 Expression der rekombinanten Nucleocapsidproteine

Die Klone pPUUII, pPUU348, pHTNII und pHTN348 wurden zur Optimierung der Expressionsbedingungen bei unterschiedlichen optischen Dichten der Expressionskulturen (0.2 – 1.2 OD) mit unterschiedlichen Konzentrationen von IPTG (0.1 mM – 1 mM) 1–8 h in LB-Medium exprimiert. Die Zugabe von 0.5 mM IPTG bei einer OD von 0.8 und eine anschließende Inkubation bei 37°C für 4 h stellte für alle eingesetzten Klone die optimalen Expressionsbedingungen dar. Mit diesen Versuchsbedingungen konnten sowohl die vollständigen als auch die trunkierten NC-Proteine in direkt in der Coomassiefärbung nachweisbaren Mengen exprimiert werden (Abb. 17 und 18).

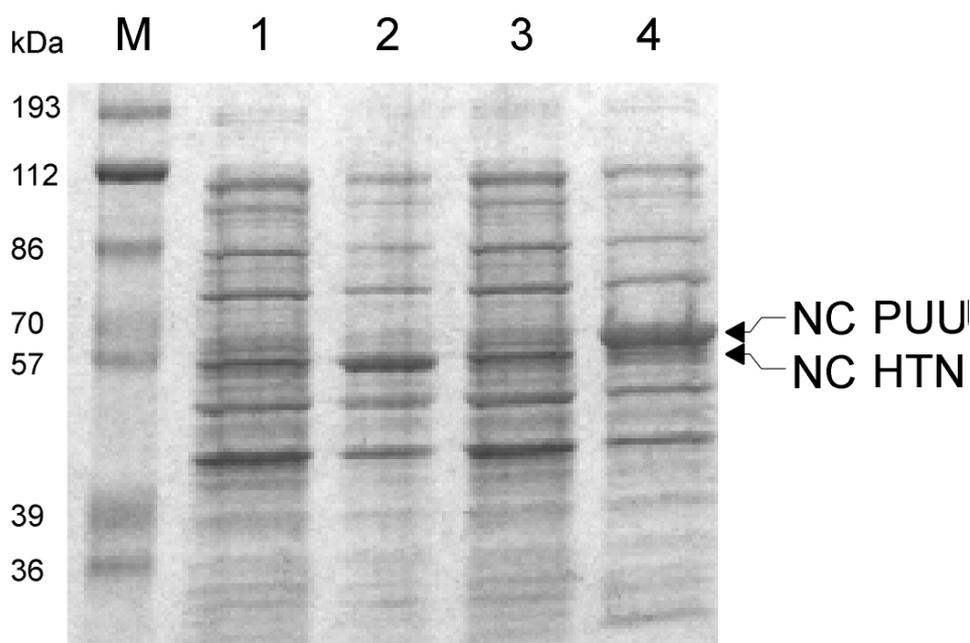


Abb. 17: Expression der beiden kompletten NC-Proteine NC HTN II und NC PUU II. M = Molekulargewichtsmarker. Coomassiefärbung

- 1: NC HTN II vor Induktion
- 2: NC HTN II nach 4-stündiger Expression
- 3: NC PUU II vor Induktion
- 4: NC PUU II 4 h nach Induktion

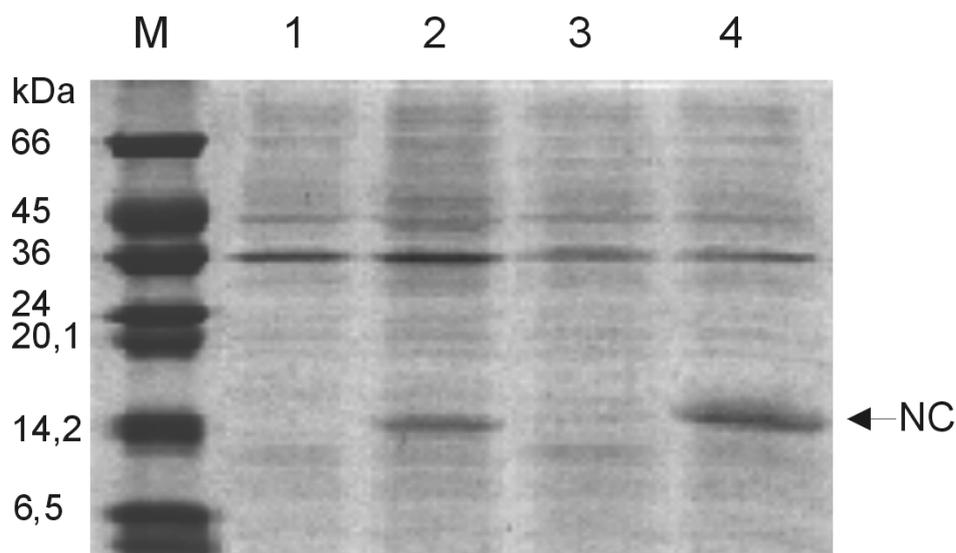


Abb. 18: Expression der beiden trunktierten NC-Proteine NC HTN348 und NC PUU348. M = Molekulargewichtsmarker

- 1: NC HTN348 vor Induktion
- 2: NC HTN348 nach 4-stündiger Expression
- 3: NC PUU348 vor Induktion
- 4: NC PUU348 4 h nach Induktion.

Unter allen erprobten Expressionsbedingungen wurden die NC-Proteine in dem Maße überexprimiert, daß sie sich intrazellulär zu Einschlußkörperchen (*inclusion bodies*) organisierten. EM-Aufnahmen zeigten, daß bis zu 50% des Zytoplasmas mit einer schwarzen, homogenen Masse ausgefüllt war (Abb. 19). Dieser Umstand bedurfte einer speziellen Aufbereitung des Kultursedimentes, da in Einschlußkörperchen organisierte Proteine schlecht in Lösung zu bringen sind. Das Expressionsprodukt des Klonen pET28a NC HTN konnte jedoch erst nach Umklonierung in das Expressionsplasmid pET22b erfolgreich gelöst werden.

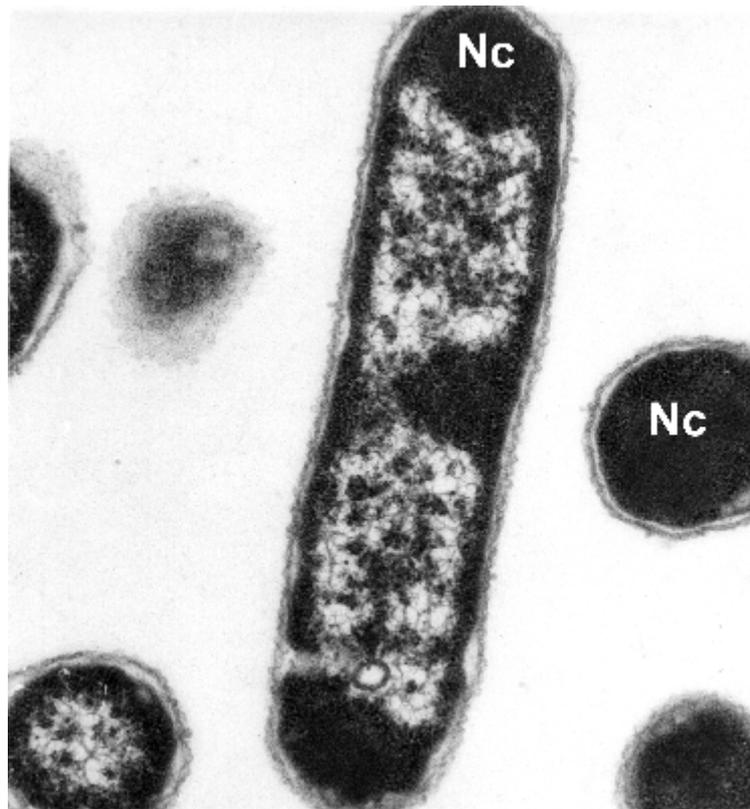


Abb. 19: Elektronenmikroskopische Darstellung der *inclusion bodies* (Nc) in einer pET 28a HTN-Expressionskultur bei 27500-facher Vergrößerung

Die überexprimierten NC-Proteine wurden sowohl denaturierend als auch nativ aufgereinigt. In beiden Aufreinigungsprotokollen wurden die Bakterien mittels Lysozym lysiert. Neben DNaseI zum DNA-Abbau und PMSF zur Proteaseninaktivierung enthielt nur der Puffer für die denaturierende Aufreinigung (50:1 LYSISpuffer) zusätzlich das Detergenz Triton X-100. Nach Inkubation der Zellsuspensionen für 1 h bei RT wurden diese zur ergänzenden Lyse anschließend bei -20°C eingefroren, nach 2-12 h erneut aufgetaut (*freeze and thaw*) und sedimentiert. An diesen Schritt schlossen sich für die denaturierende und native Proteinaufreinigung jeweils unterschiedliche Proteinpräparationsschritte an, sodaß sie im Folgenden einzeln geschildert werden.

3.5.2 Denaturierende Proteinpräparation

Zur Solubilisierung des NC-Proteins aus den *inclusion bodies* wurde das Sediment in einem 8 M Urea-haltigen Puffer (Puffer B) für 1 h bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Der nach Zentrifugation erhaltene NC-proteinreiche Überstand wurde direkt in die metallchelatchromatographische Aufreinigung eingesetzt. Abbildung 20 zeigt die zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Proteinpräparation gewonnenen Proteinproben.

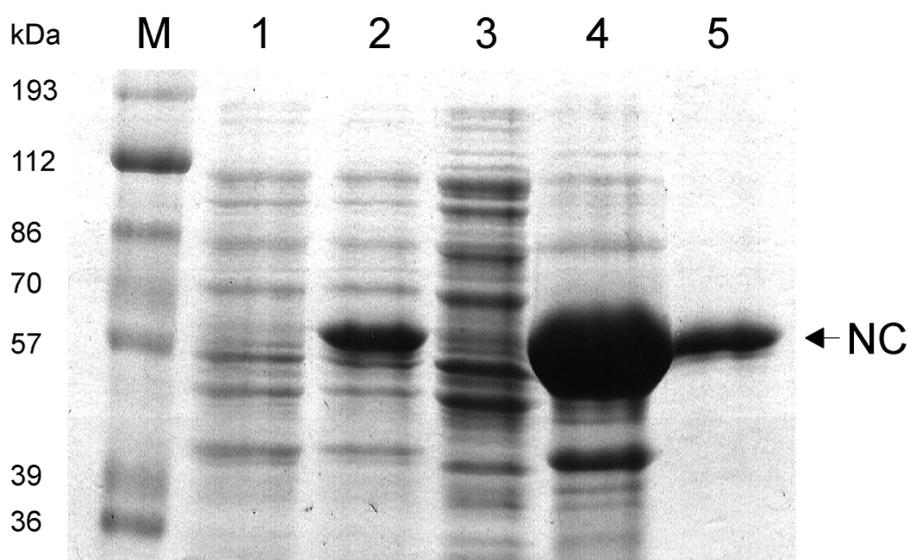


Abb. 20: Darstellung der denaturierenden Proteinpräparation exemplarisch für das NC PUU II. M = Molekulargewichtsmarker.

- 1: NC PUU II vor Induktion
- 2: NC PUU II 4 h nach Induktion
- 3: Überstand 1 nach *freeze and thaw*
- 4: Überstand 2 nach Inkubation in 8 M Urea
- 5: NC PUU II nach metallchelatchromatographischer Aufreinigung (s. Kap. 3.6.1)

3.5.3 Native Proteinpräparation

Neben den vollständigen NC-Proteinen wurden auch die trunkierten NC-Proteine nativ präpariert. Für die native Aufreinigung wurde das Sediment nach dem *freeze and thaw*-Zyklus in verschiedenen nichtdenaturierenden Detergentien enthaltenden Puffern auf Eis sonifiziert. Die höchsten Ausbeuten wurden mit CHAPSO-haltigem Puffer (Nason-Puffer) bei 4 x 2,5 min Sonifikation auf Eis erzielt. Das nichtdenaturierende Detergenz CHAPSO besitzt im Vergleich zu anderen

Detergentien zudem den Vorteil, daß es leicht dialysierbar ist. Nach Sonifikation und Zentrifugation konnte der erhaltene Überstand direkt in die metallchelatchromatographische Aufreinigung eingesetzt werden (Bahn 4, Abb. 21).

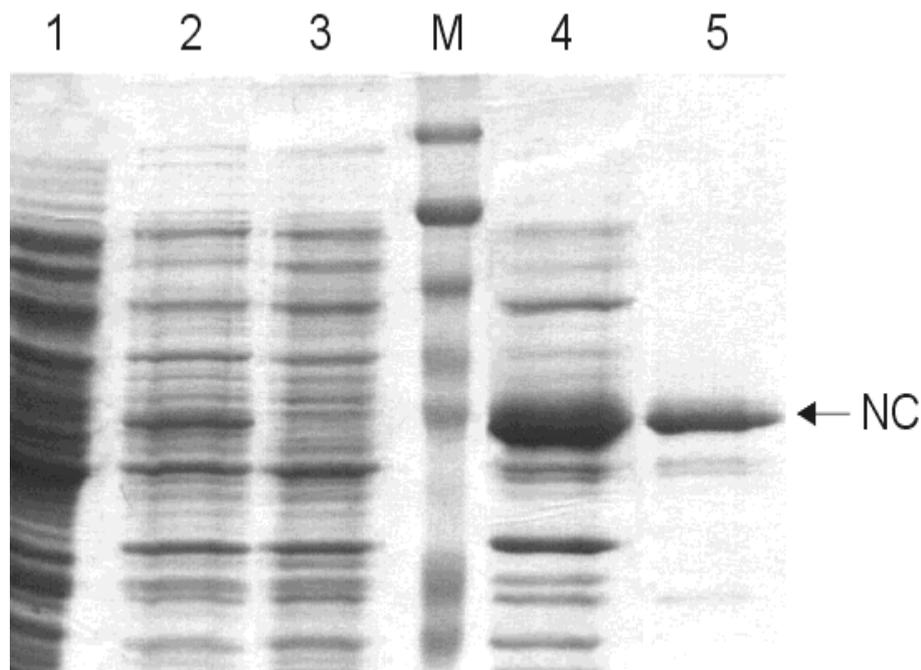


Abb. 21: Darstellung der nativen Proteinpräparation exemplarisch für das Nucleocapsidprotein NC HTN II, M = Molekulargewichtsmarker. Beschriftung des Molekulargewichtsmarkers identisch zu Abb. 20

- 1: NC HTN II vor Induktion
- 2: NC HTN II 4 h nach Induktion
- 3: Überstand 1 nach *freeze and thaw*
- 4: Überstand 2 nach Inkubation in 8 M Urea
- 5: NC HTN II nach metallchelatchromatographischer Aufreinigung (s. Kap. 3.6.2)

3.6 Metallchelatchromatographische Proteinaufreinigung

His Tag-tragende Expressionsvektoren, z.B. pET22b, bieten die Möglichkeit exprimierte Proteine metallchelatchromatographisch aufzureinigen. Als *His Tag* wird eine Abfolge von 6-8 Histidinen bezeichnet, die durch den Expressionsvektor am gewünschten rekombinanten Protein C- oder N-terminal angefügt werden. Histidine sind durch ihre hohe Affinität zu verschiedenen zweiwertigen Metallen gekennzeichnet. Bei metallchelatchromatographischen Anwendungen wird vorwiegend Nickel, welches als Nickelsulfat an Sepharose bzw. Agarose gebunden werden kann, eingesetzt. Im pET22b-Expressionsvektor exprimierte *His Tag*-

Fusionsproteine besitzen eine Abfolge aus 6 Histidinen an ihrem C-terminalen Ende, wohingegen bei dem zuerst verwendeten Expressionsvektor pET28a der *His Tag* am N-terminalen Ende des Proteins liegt.

Die an eine Nickelsulfat-Sepharosematrix gebundenen *His Tag*-Fusionsproteine konnten über einen Imidazol- oder pH-Gradienten sehr spezifisch eluiert werden. Aufgrund der höheren Ausbeute und Reinheit wurden die gewünschten Proteine in der metallchelatchromatographischen Aufreinigung über einen pH-Gradienten eluiert. Bei der Optimierung des Säulenvolumens für die Metallchelatchromatographie wurde ein Verhältnis von 80-100:1 (Kulturvolumen zu Säulenvolumen) ermittelt. Bei diesem Verhältnis wurde einerseits die Proteinbindungskapazität der Säule nicht überschritten, andererseits konnten die Mengen an Elutionspuffer mit je 2-4 ml pro ml Säulenvolumen so gering gehalten werden, daß die Konzentration der NC-Proteine im Eluat unmittelbar eine Analyse durch SDS-Page mit Coomassie-Färbung erlaubte.

3.6.1 Metallchelatchromatographische Aufreinigung von denaturiertem NC-Protein

Für die einzelnen Waschschrte wurde ein 8 M Urea haltiger Puffer (Puffer B) eingesetzt der mittels 36%-iger HCl auf die verschiedenen pH-Stufen eingestellt wurde. Nachdem die mit *His Tag*-Fusionsproteinen beladene Nickelsulfat-Sepharosematrix mit pH-Schritten von pH 8.0, pH 6.3, pH 5.9 und pH 4.5 gewaschen wurde, konnten die denaturierten NC-Proteine bei einem pH von 3.5 (Puffer E2, pH 4.0, 4-faches Säulenvolumen) spezifisch eluiert werden. Zur Vermeidung von Degradation der gewünschten rekombinanten Proteine im sauren pH-Bereich wurden die NC-Proteine direkt im Anschluß an die Elution dialysiert und abschließend ankonzentriert.

Die Matrix wurde zur weiteren Verwendung mit dem jeweils 4-fachen Säulenvolumen von zunächst 10 mM EDTA und nachfolgend Aqua dest. gewaschen. Daran schloß sich die Reaktivierung durch Inkubation in dem 10-fachen Volumen 100 mM Nickelsulfat an.

3.6.2 Metallchelatchromatographische Aufreinigung von nativem NC-Protein

Im Vergleich zu der metallchelatchromatographischen Aufreinigung der denaturierten NC-Proteine wurde die Säule nach dem Beschicken mit der Proteinlösung mit dem jeweils 10-fachen Säulenvolumen an zunächst Na-Puffer und nachfolgend Nawash-Puffer pH 8.0 gewaschen. Ohne diese exzessiven Waschschriffe gelang es nicht die nativen NC-Proteine spezifisch von der Säule zu eluieren. Die anschließende Aufreinigung wurde im pH-Gradienten mit dem jeweils 2-fachen Säulenvolumen Nawash-Puffer pH 6.0, pH 5.5, pH 5.0, pH 4.5 und pH 4.0 durchgeführt (s. Abb. 22). Bei pH 4.0 (Puffer IV) wurden die nativen NC-Proteine spezifisch von der Nickelsulfat-Sepharosesäule eluiert. Das Eluat wurde vor der weiteren Verwendung im Anschluß direkt dialysiert und ankonzentriert. Mit Hilfe der Bradford-Methode (Kap. 2.5.10) wurde nach Ankonzentration die Gesamtmenge der erstellten NC-Proteine pro 500 ml Kulturansatz bestimmt. Die Ausbeute der trankierten NC-Proteine lag generell um den Faktor 1-3 niedriger als die der Aufreinigung der vollständigen NC-Proteine (Tab. 9). Alle Proteinproben wurden vor dem Einsatz in den verschiedenen Blotverfahren mit EDTA 20mM pH8.0 auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

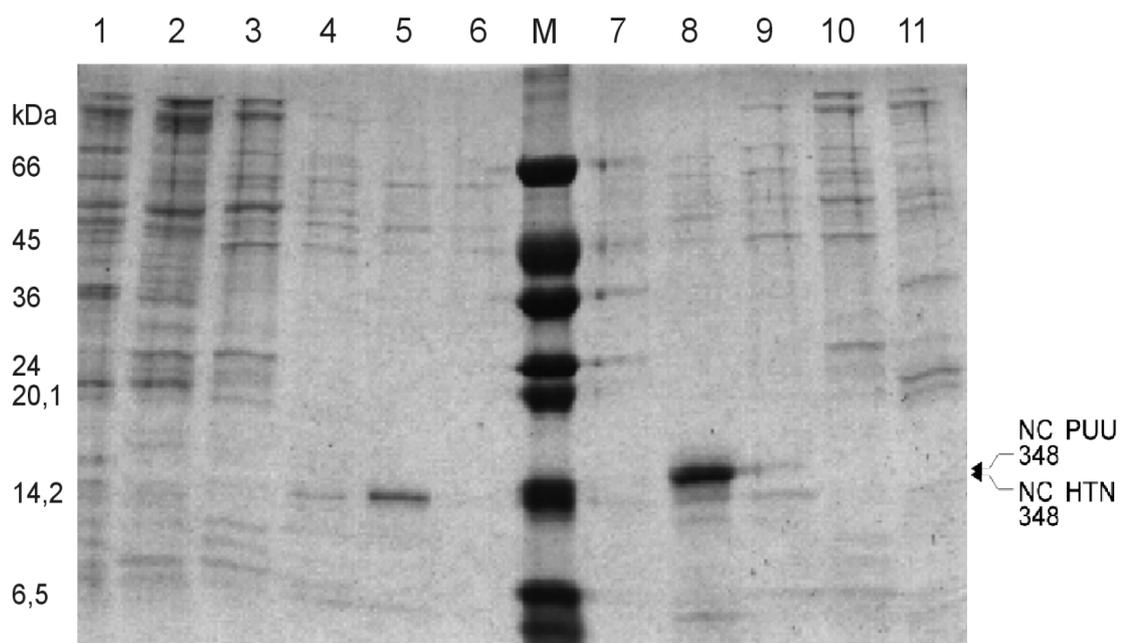


Abb. 22: metallchelatchromatographische Aufreinigung der nativen trunkierten NC-Proteine NC HTN348 und NC PUU348. M = Molekulargewichtsstandard. Bahn 1-6: Eluate der pH-Waschschritte von NC HTN348, Bahn 7-11: Eluate der pH-Waschschritte von NC PUU348

1: pH 6.0	7: pH 2.0
2: pH 5.5	8: pH 4.0
3: pH 5.0	9: pH 4.5
4: pH 4.5	10: pH 5.0
5: pH 4.0	11: pH 5.5
6: pH 2.0	

Tabelle 9: aufgereinigte Proteinmenge aus einem 500ml-Kulturansatz

NC-Protein	Proteinpräparation	durchschnittliche Proteinmenge in μg / 500ml Kulturvolumen
NC PUUII	denaturiert	1131
NC HTNII	denaturiert	901
NC PUUII	nativ	890
NC HTNII	nativ	870
NC PUU348	nativ	525
NC HTN348	nativ	396

3.7 Einsatz der erstellten Proteine in Blotverfahren

3.7.1 Darstellung der NC-Proteine aus infizierter Vero E6-Zellkultur und der rekombinanten NC-Proteine durch Kontrollseren im Western Blot

Der Western Blot ist ein hochspezifisches und hochempfindliches Nachweisverfahren zur Detektion von spezifischen Antikörper. Als Antigene wurden neben vollständigen und trunkierten, rekombinanten NC-Proteinen (Abb. 23 und 24) auch gesamtes Virus-Ag aus einer hantavirus-infizierten Vero E6-Zellkultur eingesetzt (Abb. 25).

Der Einsatz von denaturierter, hantavirusinfizierter Vero E6-Zellkultur im Western Blot ermöglichte zusätzlich zum Nachweis der NC-Proteine auch die Detektion des G1- und G2-Proteins, wobei durch die digitale Aufbereitung der Nc-Membran der schwache Nachweis des G2-Proteins nicht zu erkennen ist (Abb. 26).

Um die unspezifische Hintergrundreaktion humaner Antikörper gegen *E. coli*- und Vero E6-Proteine zu verringern, wurden die rekombinanten Antigene metallchelatchromatographisch aufgereinigt und die eingesetzten Seren mit Zellextrakten nichtinfizierter Vero E6 Zellen bzw. *E. coli*-Lysaten präinkubiert.

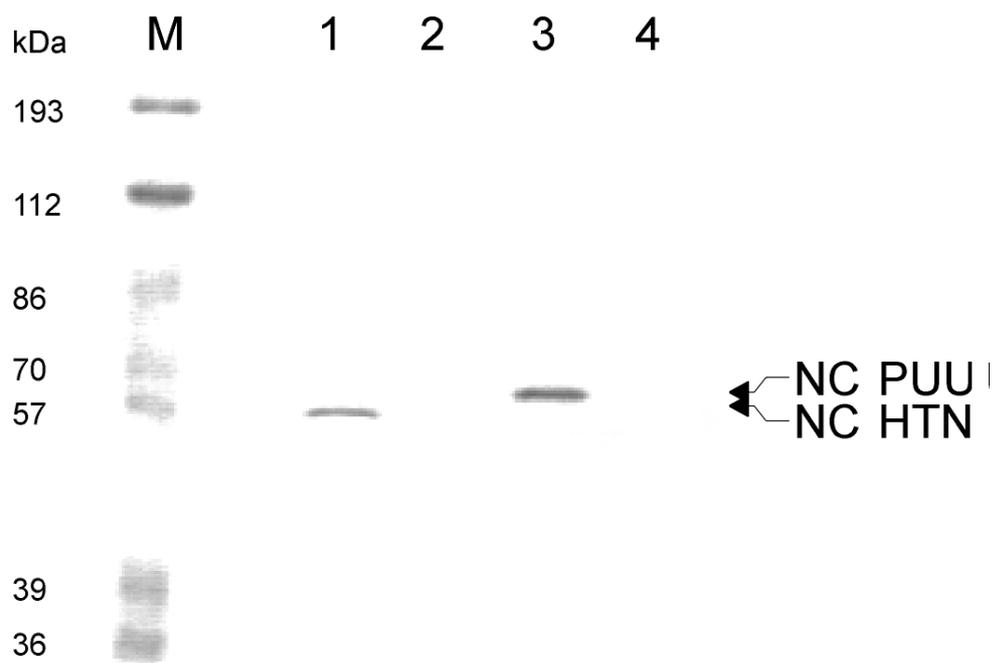


Abb. 23: Western Blot der Expressionskulturen NC HTN II und NC PUU II. M = Molekulargewichtsstandard. Serum #532/97

- 1: NC HTN II 4 h nach Induktion
- 2: NC HTN II vor Induktion
- 3: NC PUU II 4 h nach Induktion
- 4: NC PUU II vor Induktion

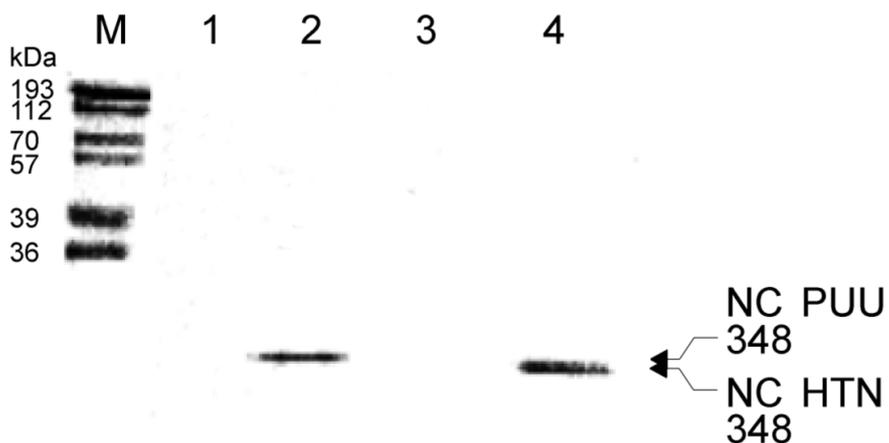


Abb. 24: Western Blot der Expressionskulturen NC HTN 348 und NC PUU 348. M = Molekulargewichtsstandard. Serum #532/97

- 1: NC HTN 348 vor Induktion
- 2: NC HTN 348 4h nach Induktion
- 3: NC PUU 348 vor Induktion
- 4: NC PUU 348 4 h nach Induktion.

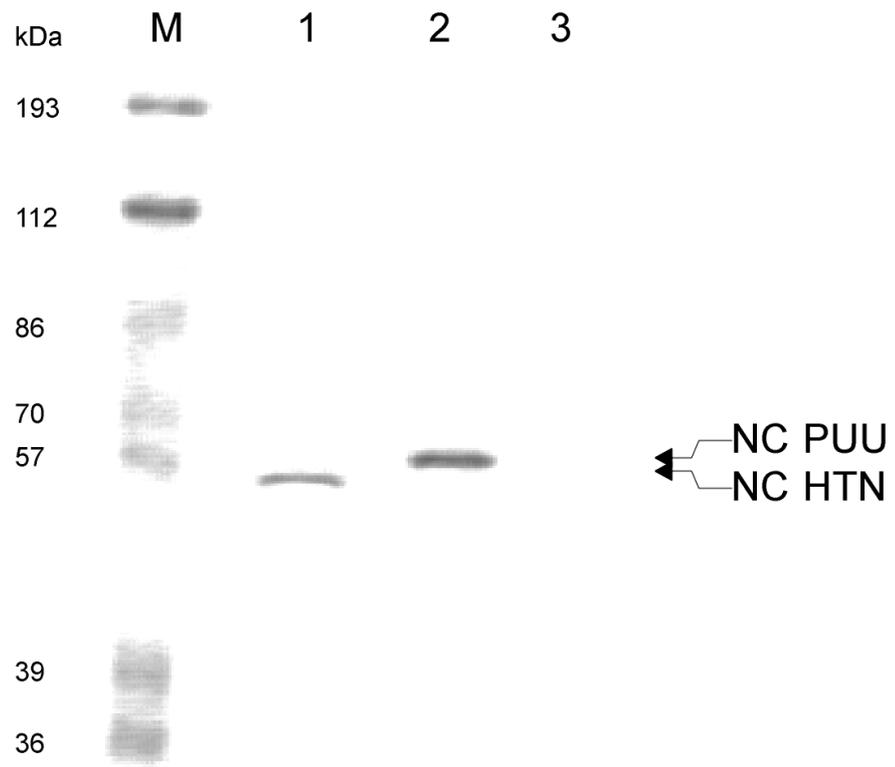


Abb. 25: Western Blot infizierter Vero E6-Zellkulturen.
M = Molekulargewichtsmarker. Serum #171/97

1: HTN E6

2: PUU E6

3: nicht infizierte Vero E6-Zellkultur

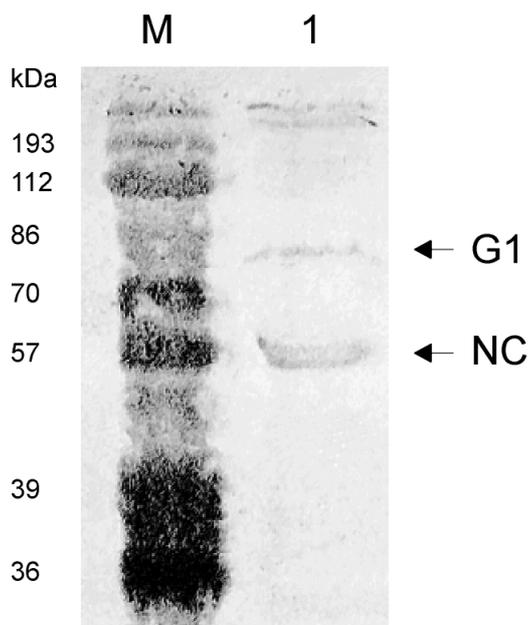


Abb. 26: Western Blot einer mit PUUV infizierten Vero E6-Zellkultur. M = Molekulargewichtsstandard, Bahn 1: Nachweis sowohl des NC-Proteins als auch des G1- und G2-Proteins. Serum #249/97

3.7.2 Nachweis von Antikörpern gegen Hantaviren mit rekombinanten Nucleocapsidproteinen im Western Blot

Während durch den Western Blot zunächst die Antigenität der hergestellten rekombinanten Proteine nachgewiesen wurde, sollte in einem modifizierten Western Blot-Verfahren eine diagnostische Methode zum Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern im Serum von Patienten etabliert werden. Hierzu wurden, parallel zu einem Molekulargewichtsmarker, die rekombinanten Proteine präparativ über SDS-Page aufgetrennt, im Western Blot auf Nitrocellulose-Folien transferiert und die Blotfolien durch Zerschneiden in einzelne ca. 5mm breite Streifen konfektioniert. Zur Bestimmung des exakten Molekulargewichts wurden die angefärbten Proteinbanden im Streifen-Western-Blot mit dem Molekulargewichtsmarker abgeglichen. Die hergestellten Teststreifen konnten bei 4°C im Kühlschrank dauerhaft gelagert werden und nach dem Protokoll des Western Blotes jederzeit zur Testung von Seren herangezogen werden (Abb. 27 und 28).

Analog zu den Ergebnissen der Serenaustestung mittels Western Blot zeigte sich auch in diesem zweiten Western Blot-Verfahren in der Immunreaktion regelmäßig eine serotypenspezifische Anfärbung der NC-Proteine der beiden Subtypen PUU und HTN.

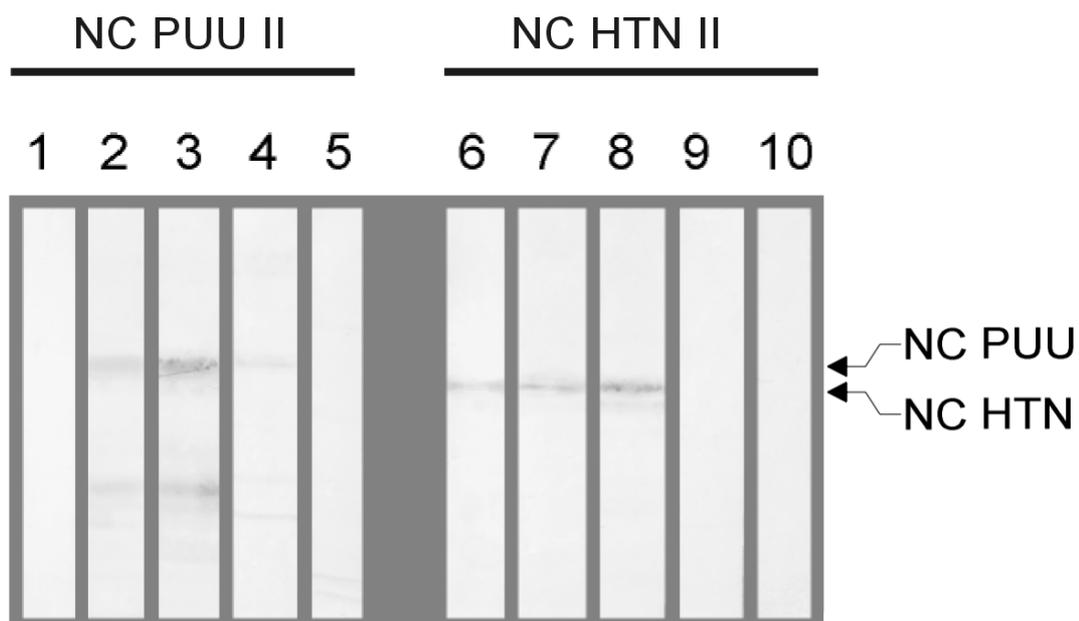


Abb. 27: Streifen-Western Blot der kompletten NC-Proteine NC PUU II (Bahn 1-5) und NC HTN II (6-10). Eingesetzt wurden 5 verschiedene Patientenserum.

Bahn 1/6, Serum #902/97:

Bahn 2/7, Serum #2626:

Bahn 3/8, Serum #3870:

Bahn 4/9, Serum #249/97:

Bahn 5/10, Negativ-Kontrolle:

PUUV neg./ HTNV pos.

PUUV pos. / HTNV pos.

PUUV pos. / HTNV pos.

PUUV schwach pos. / HTN neg.

PUUV neg. / HTNV neg.

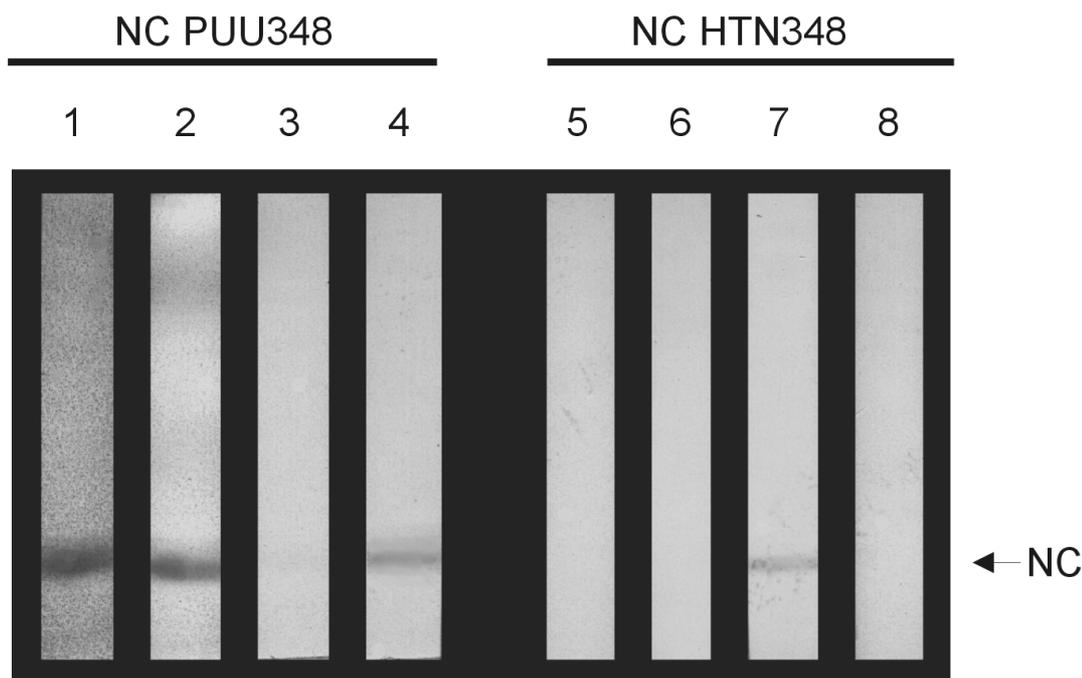


Abb. 28: Streifen-Western Blot der trunktierten NC-Proteine NC PUU 348 (Bahn 1-4) und NC HTN 348 (Bahn 5-8). Eingesetzt wurden 4 verschiedene Patientenseren.

Bahn 1/5, Serum #249/97:

Bahn 2/6, Serum #171/97:

Bahn 3/7, Serum #1075/96:

Bahn 4/8, Serum #4070:

PUUV pos. / HTNV neg.

PUUV pos. / HTNV neg.

PUUV schwach pos. / HTNV pos.

PUUV pos. / HTNV neg.

3.7.3 Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern im Dot Blot-Verfahren

Neben dem Western Blot wurde mit dem Dot Blot eine weitere diagnostische Methode zum Nachweis von Hantavirus-Antikörpern getestet. Neben der Aussage, ob ein Serum als positiv oder negativ zu werten ist, sollte zusätzlich zur Differenzierung in HTN-, bzw. PUU-ähnliche Viren eine relative Quantifizierung des Serumtiters möglich sein. Hierzu wurden neben den Antigenen auch humane Immunglobuline vom Typ IgG, IgM und IgA (sog. Hyperimmunglobulin; Pentaglobin®, Fa. Biotech, Dreieich) in zwei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die als stark positiv (500 ng Gesamtimmunglobulin, davon 380 ng IgG), bzw. schwach positiv (50 ng humane Immunglobuline, davon anteilig 38 ng IgG) gewertet wurden (Abb. 29). Nach diesem Prinzip konnten Seren mit Werten zwischen 0 (= negativ) bis 4 (= Reaktion stärker als die höherkonzentrierte Kontrolle) bewertet werden. Mit dem gleichzeitigen Einsatz von IgM und IgA

(jeweils in Konzentrationen von 60 ng und 6 ng) und Anti-IgM-Antikörper in der Immunreaktion hat man zusätzlich die Möglichkeit, Seren auf das Vorliegen von Antikörpern vom IgM-Typ zu untersuchen und relativ zu quantifizieren. Diese Möglichkeit würde dem Nachweis einer akuten Infektion dienen, wurde aber mangels Seren von akut an HFRS erkrankten Patienten nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

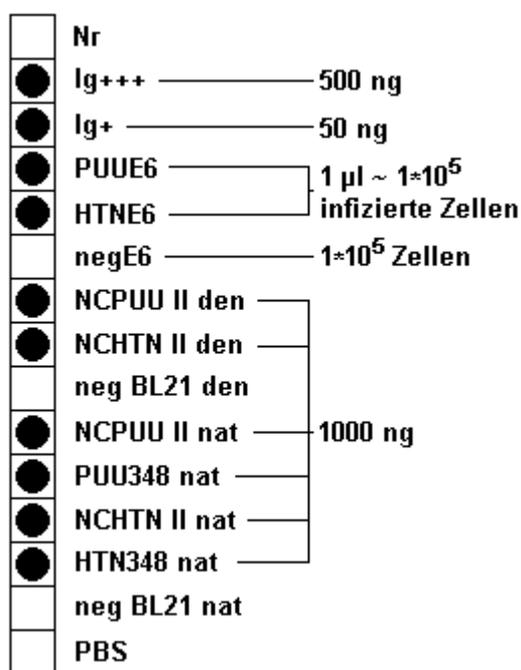


Abb. 29: Aufbau eines Dot Blot-Streifens mit Angabe der eingesetzten Antigenmengen. Die Mengenangaben der Immunglobuline (Ig+++ und Ig+) beziehen sich auf die Gesamtimmunglobulinmenge; E6 = Vero E6-Zellextrakt; BL21 = *E. coli* BL 21 (DE3); den = denaturiert; nat = nativ; neg = nichtinfiziert (Negativkontrolle)

Nachdem die entsprechenden Dot-Blot-Streifen erstellt wurden, sollten 31 Seren im Blindversuch getestet werden. Als Referenztest wurde der IFT angewendet.

Die eingesetzten rekombinanten Ag reagierten im Dot Blot-Verfahren ähnlich wie auch im Western Blot. Von 31 getesteten Seren wurden jedoch nur für 23 Seren die Ergebnisse der Serentestung mittels IFT bestätigt. Mit einer Ausnahme (Serum 4) wurden alle in dem IFT mit hohem Antikörpertiter, bzw. starker Immunreaktion (Titer > 1:80, bzw. zweifach positiv) getestete Seren auch im Dot Blot erfaßt (Seren 1, 3, 8, 10, 13, 17, 18 und 31). Von 7 im IFT mit niedrigem anti-HTV-Titer, bzw. geringerem Reaktionsgrad (Titer < 1:40, einfach positive Reaktion) getesteten Seren wurden im Dot Blot 2 Seren als schwach positiv erkannt (Serum 12 und 29), bei 5 Seren gelang der Nachweis hantaspezifischer Antikörper hingegen nicht im Dot Blot (Seren 11, 15, 22, 25 und 26). 2 Seren, die im Dot Blot schwach reagierten waren im IFT negativ (Titer < 1:10) erfaßt worden (Serum 9 und 21). Die Ergebnisse sind im Überblick in Abbildung 30 und Tabelle 10 dargestellt.

Wird die Sensitivität und Spezifität des IFT in Kombination mit der klinischen Symptomatik der Patienten mit 100% angenommen, so errechnet sich anhand der ermittelten Ergebnisse für den Dot-Blot derzeit eine Sensitivität von 80,6% und eine Spezifität von 93,5%.

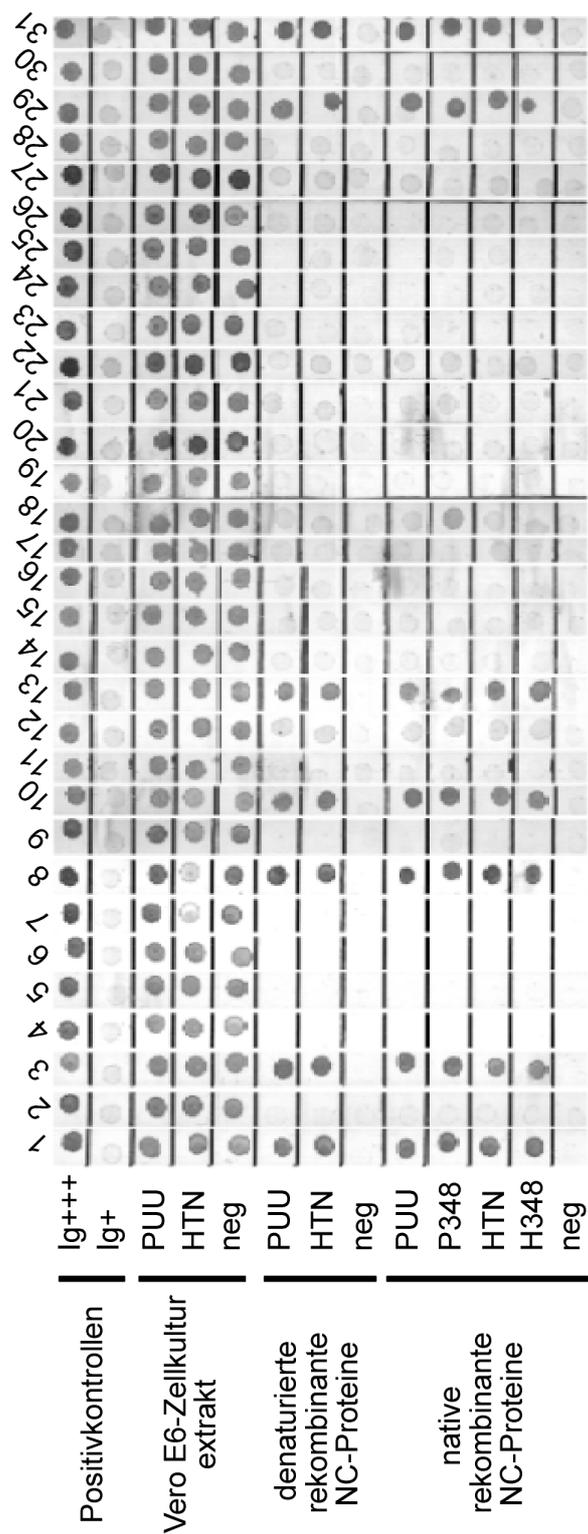


Abb. 30: Dot Blot-Versuchsreihe mit 31 Patientenseren. Einteilung der Streifen siehe Abb. 29.

Tabelle 10: Übersicht über die Ergebnisse des Blindversuchs

Nr	Dot Blot	IFT	Serum-Nummer
1	+++	+++	4817
2	-	-	4800
3	+++	+++	4492
4	-	++	4332
5	-	-	4706
6	-	-	4672
7	-	-	4657
8	+++	+++	4130
9	+	-	4025
10	+++	+++	5325/89
11	-	+	1941/89
12	+	+	970/90
13	+++	+++	252/90
14	-	-	4496
15	-	+	1568/91
16	-	-	4494
17	++	++	2254/90
18	++	++	2986/90
19	-	-	4336
20	-	-	4315
21	+	-	4282
22	-	+	1766/89
23	-	-	4275
24	-	-	4205
25	-	+	3434/90
26	-	+	1293/95
27	-	-	4169
28	-	-	4147
29	+++	++	2569/95
30	-	-	4146
31	+++	+++	3141/95

Grau unterlegte Serumproben weisen auf abweichende Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden hin. Serum #22 stellt das Folgeserum im Krankheitsverlauf zu Serum #11 dar.

Neben dem erneuten Nachweis der Antigenität der eingesetzten NC-Proteine zeigten die Ergebnisse, daß der Einsatz denaturierter Ag in Form von in Zellkultur vermehrten Hantaviren (PUUE6, HTNE6, negE6) trotz Präabsorption der Seren und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der NC-Membran mittels TBST-Blockpuffer keine Aussagen hinsichtlich einer Hantavirusinfektion erlaubt, da bei jeder Reaktion die Negativkontrolle eine im Vergleich zu den PUU- und HTN-Zellkultur-Antigen identische Anfärbung zeigte.

Eine Differenzierung in Seren, deren Antikörper spezifisch gegen PUU-, bzw. HTN-ähnliche Viren gerichtet ist, ist im Gegensatz zu dem Western Blot und Streifen Western Blot nicht sicher möglich. In allen positiven Fällen war der Wert der relativen Reaktion (negativ, schwach positiv, positiv, stark positiv) für beide Serotypen identisch.

Zusätzlich zu den vollständigen NC-Proteinen wurden sog. trunkierte NC-Proteine (N-terminale 116AS, bezeichnet als P348 und H348) eingesetzt, da vorangegangene Studien zeigten, daß die antigenen Epitope der NC-Proteine am N-Terminus liegen (Elgh et al., 1996). In den jeweilig als positiv getesteten Seren zeigten die trunkierten NC-Proteine die gleiche relative Reaktion wie die vollständigen NC-Proteine. Eine Ausnahme stellt Serum #18 dar, welches im Dot Blot eine deutlich stärkere Reaktion gegen das nativ-rekombinante PUU 348-Protein als gegen die anderen eingesetzten viralen Ag zeigte.

4 Diskussion

Neben den diversen humanpathogener Hantavirusserotypen, stellen die Serotypen PUU, HTN und SNV sowie SEO und DOB die für den Menschen klinisch bedeutsamsten Hantaviren dar. Neben dem klassischen Verlauf einer Hantavirusinfektion werden bei Infektionen mit diesen Serotypen auch häufig atypische Verlaufsformen der Erkrankung (HTVD) beobachtet (Schreiber et al., 1996; Brackett et al., 1994). Insbesondere in den skandinavischen Ländern findet sich relativ häufig sehr variable Ausprägungen der klinischen Symptomatik einer PUU-Infektionen. Bei ca. 70% der klinisch apparenten Verläufe werden die typischen Symptome einer *Nephropathia epidemica* beobachtet. Bei 30 % der Patienten hingegen zeigen sich neben den grippeähnlichen Symptomen vor allen eine Beeinträchtigung der Lungenfunktion im Sinne einer respiratorischen Insuffizienz (Alexeyev et al., 1993) wie sie, in stärkerer Ausprägung, typischerweise bei der SNV-Infektion zu finden ist (Linderholm et al. 1997; Schreiber et al., 1996). Auch für das vorwiegend in Osteuropa verbreitete Dobrava Virus sind gehäufte atypische Verlaufsformen mit Überwiegen der respiratorischen Symptomatik beobachtet worden (Mentel et al., 1999). Die Mortalität der Hantaviren unterliegt einer ausgeprägten serotypen-abhängigen Varianz. Während die Infektion mit dem vorwiegend in Nordeuropa verbreiteten PUUV nur in 0.3% der Krankheitsfälle tödlich verläuft ist für das in Nordamerika beheimatete SNV eine Mortalitätsrate von bis zu 52% beschrieben (Khan et al., 1996). In vereinzelt Fällen einer Hantaviruserkrankung (HTVD) kommt es nach dem Überleben einer akuten Hantavirusinfektion nicht zu einer *restitutio ad integrum* (Rebibou et al., 1997; Bren et al. 1996), sondern zu Residuen wie arteriellem Hypertonus oder chronischem, terminal dialysepflichtigem Nierenversagen (Shutov et al., 1999; George et al., 1998).

Die variable Symptomatik der Hantaviruserkrankung und die Tatsache, daß verschiedene Hantavirustypen dieselbe Symptome hervorrufen können, erschweren die sichere und schnelle klinische Diagnose einer Hantavirusinfektion. Eine schnelle Hantavirus-Diagnose ist jedoch im Hinblick auf eine frühestmöglich eingeleitete Therapie von essentieller Bedeutung. Nur eine frühzeitig begonnene Therapie mit Ribavirin und Interferon vermag die Komplikationen in der Akutphase der HTVD signifikant zu senken (Huggins et al., 1989 und 1991; Lee et al., 1989). Aus diesem Grund wird in Nordamerika bei HPS-Erkrankungen z.T. routinemäßig das

unspezifische Virostatikum Ribavirin eingesetzt (Hjelle et al., 1997). Die Wirkung des Ribavirins gegenüber den Serotyp SNV ist jedoch umstritten und wird zur Zeit in nordamerikanischen Studien untersucht (Chapman et al., 1999). Da die Inzidenz der Hantavirusinfektionen in Nordamerika mit 10-30 Neuerkrankungen pro Jahr jedoch deutlich niedriger liegt als die Inzidenz der HTVD in China (~100000 Neuerkrankungen / Jahr), sind die chinesischen Studien zur Wirksamkeit des Ribavirins (Huggins et al., 1991) durch Einbeziehen eines größeren Patientenkollektiv, aussagekräftiger (Le Guenno, 1998). Am Mausmodell konnte die Wirksamkeit des Ribavirins gegenüber dem Hantaanvirus bestätigt werden, indem eine signifikante Reduktion der Viruslast nach Einleitung einer Ribavirintherapie nachgewiesen werden konnte (Huggins et al., 1986).

Die Standardmethode für den Nachweis einer akuten HTVD ist zur Zeit der Nachweis von Hantavirus-spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern. Eine weit verbreitete Methode für den Antikörpernachweis ist der IFT, in dem mit Hantaviren infizierte Zellen als Antigen eingesetzt werden. Diese Methode ist nur schwer standardisier- und automatisierbar und bedarf besonderer Erfahrung bei der Auswertung der Testergebnisse. Daher gewinnen Nachweisverfahren mit aufgereinigten Virusantigenen oder auch rekombinanten Antigenen, wie z. B. der μ -capture ELISA (Fa. Progen), immer mehr an Bedeutung. Der Vorteil eines solchen ELISA Verfahrens ist die einfache Handhabbarkeit sowie die vergleichsweise höhere Sensitivität und Spezifität für den Nachweis von IgM Antikörpern (Zöller et al., 1993). Die Hantavirus-ELISA Verfahren benutzen hauptsächlich rekombinate NC-Proteine oder verkürzte Formen der Nukleokapsid Antigene (Brus Sjölander et al., 1997; Groen et al., 1989). Entscheidend für die Sensitivität und Spezifität der von Sjölander et al. untersuchten Testverfahren war jedoch nicht primär die Größe des verwendeten NC-Proteins sondern die Verwendung von rekombinanten NC-Proteinen lokal verbreiteter Hantavirusserotypen-/quasispecies. Für den kommerziellen μ -capture ELISA-Test (Fa. Progen), der die beiden klassischen Hantavirus Laborstämme Puumala Hällnäs B1 und Hantaan 76-118 berücksichtigt, wurde daher bei Austestung skandinavischer Humansenen eine deutlich niedrigere Sensitivität und Spezifität ermittelt als für die von den skandinavischen Hantavirus-Arbeitsgruppen erstellten ELISA-Testverfahren. Diese Tatsache erklärt sich u.a. aus der hohen Variabilität innerhalb des vorwiegend in Nordeuropa verbreiteten Serotypus Puumala (Lundkvist et al., 1998).

Vereinzelt sind in Studien Hantavirus positive Seren unter Verwendung der beiden NC-Proteine von PUU und HTN als Antikörper-negativ getestet worden. In diesen seltenen Fällen, in denen die serologische Diagnosestellung mit dem alleinigen Einsatz der beiden, von der WHO empfohlenen NC-Antigene PUU und HTN nicht gelang, wurde ein serologischer Nachweis Hantavirus-spezifischer Antikörper mit Hilfe des SEO Nucleocapsid-Antigens geführt (McKenna, 1994). Diese Untersuchungen bestätigten die Tatsache, dass in Nordeuropa auf Antigene lokaler Virusstämme oder auf ein breiteres Antigenpektrum nicht verzichtet werden kann. In Mitteleuropa hingegen ist nach eigenen Erfahrungen und Arbeiten anderer Wissenschaftler (Zöller et al., 1993; Elgh et al. 1997; Koraka et al., 2000) eine sichere Diagnostik von Hantavirusinfektionen mit dem alleinigen Einsatz der beiden klassischen Hantavirusserotypen HTN und PUU möglich. Die Problematik der ausgesprochen hohen Puumalavirusvarianz wie sie sich in den skandinavischen Ländern darstellt (Pluysnin et al., 1995), scheint für Deutschland und den mitteleuropäischen Raum nicht zuzutreffen.

Ein Vorteil der Verwendung der beiden HTV-Antigene HTN und PUU ist die Eigenschaft, daß zudem einen Großteil der nicht durch Puumala- oder Hantaanviren hervorgerufene Hantavirusinfektionen, z.B. mit den Hantaviren SEO, TUL oder SNV, über Kreuzreaktionen erkannt werden können (Chu et al., 1995; Zeier et Ritz, 1996; Salonen et al., 1998). Ein Nachteil dieser Antigenauswahl ist jedoch, daß keine genauere Aussage als die einer Infektion mit PUUV oder PUU-ähnlichen Viren, bzw. HTNV oder HTN-ähnliche Viren getroffen werden kann (Elgh et al. 1997). Da es selbst zwischen den beiden Serotypen HTN und PUU relativ häufig zu Kreuzreaktionen kommt, kann in manchen Fällen sogar eine PUU-Infektion laborchemisch nicht mit Sicherheit von der HTN-Infektion unterschieden werden (Zöller et al., 1993), so daß nur die Aussage einer Hantavirusinfektion getroffen werden kann.

In den derzeit verwendeten Nachweisverfahren werden die Antigene überwiegend in nativer Form eingesetzt. Um PUU- bzw. HTN-spezifische Antikörper nachweisen zu können, sollte daher im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht werden, inwieweit sich NC-Antigene in denaturierter Form zum Nachweis Hantavirus-spezifischer Antikörper eignen.

Prinzipiell stehen für die Klonierung und anschließende Expression hantaviraler NC-Proteine sowohl eukaryotische (z.B. *cos-1*-Zellen) als auch prokaryotische

Expressionsmodelle, z.B. *E. coli* zur Verfügung. In *E. coli* lassen sich im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen in einem relativ kurzen Zeitraum verhältnismäßig einfach große Mengen Protein synthetisieren und aufreinigen. Ein großer Nachteil hingegen ist die Tatsache, dass in Prokaryonten exprimierte Proteine posttranslational nicht prozessiert werden. Da aber bekannt ist, daß die hantaviralen NC-Proteine nicht glykosyliert oder in anderer Weise posttranslational modifiziert werden, ist die bakterielle Expression in *E. coli* geeignet, um die NC-Proteine in ihrer natürlichen Konformation zu erhalten. Es wurde *E. coli* BL21 (DE3) als Bakterienstamm ausgewählt, da eine Expression der NC-Proteine in pET Vektoren unter der Kontrolle des T7-Promotor geplant war. Diese Klonierungsvektoren wurden ausgewählt, da sie für die Herstellung der NC-Proteine besondere Vorteile besitzen. Unter der Kontrolle des T7-Promotors lassen sich grosse Mengen der rekombinanten Proteine in Bakterien exprimieren und die Expression durch das T7-System ist sehr leicht zu kontrollieren bzw. zu regulieren, da die Synthese der T7-Polymerase durch den lac-Operator geregelt wird. Zudem wird durch eine starke Expressionrate auch die Menge, bzw. das Verhältnis von rekombinantem Protein gegenüber bakteriellen Proteinen zu Gunsten des NC-Proteins beeinflusst. Dadurch wird die Ausbeute des rekombinanten Proteins erhöht und bakterielle Verunreinigungen nach der chromatographischen Aufreinigung aus den Bakterienextrakten stark reduziert. Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine aus Bakterien werden bei der Klonierung in die pET Expressionsvektor sechs Histidine, ein sogenannter *His Tag* an das NC-Protein fusioniert. Dieser *His Tag* kann sowohl an das N-terminale Ende als auch an das C-terminale Ende fusioniert werden, je nachdem welchen pET Expressionsvektor man verwendet (N-terminal z.B. pET28; C-terminal z.B. pET22). Für die Klonierung und Expression wurde zunächst der pET28 Vektor ausgewählt, da gezeigt wurde, dass die Fusion des His-Tag an den N-Terminus eines DNA bindenden Proteins die Struktur und Eigenschaften des Proteins nicht verändert. Der N-terminale His-Tag beeinträchtigt daher nicht die Faltung und enzymatische Aktivität von Proteinen (Kadkhodayan et al., 2000). Nach Klonierung der hantaviralen NC-Protein in den pET28 Vektor wurde durch die DNA-Sequenzierung der Expressionsvektoren die korrekte Insertion der NC-Protein codierenden Basenabfolgen bestätigt. Bei der Herstellung der PUU NC-Antigene ergaben sich keinerlei Komplikationen bei der Klonierung, Expression und Reinigung. Schwierigkeiten offenbarten sich dagegen bei der Reinigung des HTN NC-Proteins.

Nach Extraktion der Bakterien konnte im herkömmlichen SDS-Page kein rekombinantes Protein in der wässrigen löslichen Phase nachgewiesen werden. Eine Expression der HTN NC-Proteine wurde jedoch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt. In *E. coli* wurde die Bildung grosser Protein-Aggregate nachgewiesen, die bis zu 50% der Masse des Bakteriums ausmachten (Abb. 19). In diesen elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass sich in den Bakterien dichte Strukturen, sog. *inclusion bodies* gebildet hatten, die vermutlich kondensierte rekombinante NC-Proteine darstellen. Diese Aggregate sind wahrscheinlich im Falle der HTN-Proteine so stabil, dass das rekombinante Protein nicht mehr, oder nur in sehr geringer Konzentration, in gelöster Form vorliegt. Die HTN-exprimierenden Klone wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von H.-G. Kräusslich elektronenmikroskopisch auf virale Strukturen untersucht. Es zeigte sich, dass NC-Proteine in Bakterien stabile tubuläre Strukturen ausbilden. Vermutet wurde, dass HTN und PUU NC-Proteine eine unterschiedliche Art der Aggregation und daher eine unterschiedliche Löslichkeit besitzen. Die Untersuchungen von Carsten Krieg (Abt. für Virologie, Arbeitsgruppe Hantaviren, BNI) zeigten im Immunfluoreszenzverfahren, dass sowohl in HTV infizierten Zellen als auch in rekombinanten, NC-exprimierenden Zellen unterschiedliche Aggregationsformen der PUU und HTN NC-Proteine nachweisbar waren. In PUU NC exprimierenden Vero E6-Zellen zeigen sich nach Anfärbung mit NC-spezifischen Antikörpern punktförmige Granula während sich in HTN-infizierten Zellen grosse filamentöse NC-Aggregate zeigten. Diese grossen Aggregate der HTN NC-Proteine scheinen der Grund für die verminderte Löslichkeit des Proteins zu sein. Bestätigt wird dieses Ergebnis auch durch die Arbeitsgruppe Gött et al. (1991), die bei der Kartierung der antigenen Epitope und der RNA-bindenden Domäne ebenfalls N-terminale Fusionsproteine des HTN NC-Proteins erstellten. Dabei zeigte sich eine starke Aggregation der exprimierten Proteine und eine damit verbundene Unlöslichkeit. Die Bildung grosser Aggregate der Nucleocapside wurde auch bei einem anderen Bunjavirus, dem *tomato spotted wilt virus* (TSWV), beobachtet. Elektronenmikroskopische Untersuchungen bei TSWV haben gezeigt, dass auch bei diesem Bunjavirus das NC-Protein im Zytoplasma in Form von Aggregaten (*cytoplasmatic dense masses*) vorkommt (Kitajima et al., 1992). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Bunjavirus NC-Proteine sich zu unlöslichen Aggregaten

verbinden können, was eine anschließende chromatographische Reinigung erschwert.

Da das HTN NC-Protein nicht als N-terminale His-Tag Fusion aus *E. coli* gewonnen werden konnte, wurde das entsprechende HTN NC-Gen in den Expressionvektor pET22 umkloniert. In diesem Vektor wurde das NC-Protein ebenfalls als His-Tag Fusionprotein exprimiert. Der His-Tag befindet sich im Unterschied zum pET28 Expressionsvektor am C-terminalen Ende des Proteins. Nach erfolgter Klonierung in pET22 war das NC-Protein mit C-terminalem His Tag löslich und konnte aus dem Extrakt von Bakterien isoliert werden. Vermutlich führt die Anheftung des His-Tag an den C-Terminus des HTN NC-Proteins zu einer verminderten Aggregation und damit zu einer besseren Löslichkeit. Möglicherweise mag die für den C-terminalen Bereich des NC-Proteins als Funktion beschriebene Bindungsfähigkeit von viraler RNA (Gött et al., 1991) eine molekularbiologische Rolle spielen. Auf jeden Fall beeinflusst die Fusion des His-Tag an den C-Terminus des NC-Proteins die Aggregation der NC-Proteine derart, dass sie sowohl unter denaturierenden als auch nicht-denaturierenden Bedingungen löslich sind. Da sich der His-Tag bei der Klonierung in pET22 am C-Terminus befindet, bleibt zudem der immundominante, N-terminale Bereich durch die Histidinabfolge relativ unbeeinflusst. Da die C-terminale Fusion des His-Tag an das HTN-NC-Protein die Expression und chromatographische Aufreinigung des Proteins ermöglichte, wurde das PUU NC-Gen ebenfalls als C-terminales His-Tag Fusionprotein exprimiert und gereinigt. Alle weiteren Untersuchungen wurden mit den C-terminalen His-Tag NC-Proteinen beider Hantavirus-Serotypen durchgeführt.

Um die Expression der NC-Proteine in *E. coli* weiter zu verbessern, wurde gleichzeitig versucht, die Translation des HTN NC-Gens durch die Veränderung der Aminosäure-Codons zu verbessern. Die Sequenz des NC-Gens wurde dahingehend verändert, dass Codons die in humanen Zellen häufig, in Bakterien aber nur selten vorkommen, gegen Codons ausgetauscht wurden, die in Bakterien besser genutzt werden. Diese sog. *Codon usage*-Optimierung für *E. coli*, führte jedoch nicht zu einer relevanten Verbesserung der Ausbeute, auch wurde keine Beeinflussung der Löslichkeit des HTN NC-Proteins beobachtet.

Verschiedene serologische Studien hatten ergeben, daß das NC-Protein das immundominante Hantavirus-Antigen darstellt (Zöller et al., 1989; Gött et al., 1991). Dabei stellt der N-terminale Bereich des NC-Proteins, die ersten 112-117

Aminosäuren, die immundominante Region des NC-Proteins dar (Jenison et al., 1994; Elgh et al., 1996; Gött et al. 1997). Um zu klären, ob sich die verkürzten, sog. trunkierten, Proteine auch zu einer sicheren Diagnostik einer Hantavirusinfektion eignen, wurden analog zu den vollständigen NC-Proteinen die 348 N-terminalen Basenpaare in den pET22 Vektor kloniert und als His-Tag-Fusionsprotein exprimiert (pPUU348, pHTN348).

Die rekombinanten Proteine waren nach einer einmaligen Aufreinigung mit Hilfe der Ni-Chelat-Chromatographie (*Batch*-Verfahren) frei von immunreaktiven *E. coli*-Bestandteilen die zu falsch positiven Reaktionen führen können. Dieser Sachverhalt wurde in den durchgeführten Western-Blot Untersuchungen bestätigt. Im Western-Blot wurden bei der Verwendung von humanen Seren keine zusätzlichen gefärbten Banden, wie sie durch bakterielle *E. coli*-Proteine hervorgerufen werden könnten, beobachtet. Das so gereinigte Antigen wurde daher auch für die Untersuchungen im Dot-Blot eingesetzt, wo im Gegensatz zum Western-Blot keine weitere Aufreinigung des Antigens durch eine Gelelektrophorese erfolgt.

Zur weiteren Analyse wurden die klonierten NC-Gene sequenziert. Die gewonnenen Sequenzen wurden mit den publizierten Originalsequenzen der Laborstämme PUU Hällnäs B1, PUSSEG/M32750 (Stohwasser et al., 1990) und HTN 76-118, HANSNC/M14626 (Schmaljohn et al., 1986) verglichen. Bei diesem Sequenzvergleich wurden geringfügige Abweichungen in den S-Segment-Sequenzen der Klone mit den publizierten HTN- und PUU-Stämmen gefunden. Die Sequenzhomologie betrug jeweils etwa 99%. Daraufhin wurden die PCR amplifizierten S-Segment Abschnitte direkt sequenziert und mit den klonierten NC-Genen verglichen. Der Vergleich mit den im Tropeninstitut etablierten HTN- und PUU-Laborstämmen zeigte eine fast 100%-ige Übereinstimmung. Nur bei einem Klon wurde ein einzelner Basenaustausch beobachtet, der als sog. PCR-Artefakt bei der Amplifikation unter Zuhilfenahme der Taq-DNA-Polymerase entstanden ist. Dieser Sequenzbefund zeigt, dass die im Rahmen dieser Arbeit kultivierten Hantaviren Sequenzvarianten, sog. *Quasispecies*, der beiden klassischen Hantavirus-Serotypen HTN 76-118 und PUU Hällnäs B1 darstellen. Möglicherweise sind die beobachteten Abweichungen in der NC-Sequenz zu den beiden klassischen HTV-Stämmen PUU und HTN Resultat einer Adaptation der Hantaviren an die verwendeten Zellkulturbedingungen. Daß Hantaviren sich *in vitro* genetisch verändern und sich Zellkulturbedingungen anpassen können, wurde u.a. in der Arbeit

von Lundkvist et al. (1997) gezeigt. Dieses *in vitro* Phänomen, welches auch für eine Reihe anderer RNA-Viren nachgewiesen worden ist (Domingo et al, 1994), kann beobachtet werden, wenn Viren in bestimmten immortalisierten Labor-Zelllinien oder unter bestimmten Wachstumsbedingungen über längere Zeit kultiviert werden. Ein typisches Beispiel hierfür liefert auch die Kultivierung des Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV), welches sich sehr schnell an *in-vitro* Zellkulturbedingungen anzupassen vermag (von Briesen et al., 1999).

Nach der Sequenzierung und damit auch dem Nachweis der korrekten Insertion der proteincodierenden Sequenz der Hantavirus NC-Klone wurden die exprimierten NC-Proteine denaturierend präpariert und zunächst mit IFT-positiven, bzw. IFT-negativen Kontrollseren im Western-Blot getestet. In den Western-Blot Analysen konnten die Resultate der IFT-Untersuchungen regelmäßig bestätigt werden. Während bei dem IFT immer beide Serotypen gleichzeitig reagieren und nur eine Titerbestimmung mit PUU- und HTN-infizierten Vero E6-Zellen eine grobe Zuordnung des Hanta-Serotyps zuließ, zeigte sich bei der Austestung der Seren im Western-Blot bei einem Großteil der Seren eine PUU- bzw. HTN-NC-spezifische Reaktion. Der grundlegende Unterschied zwischen dem Western-Blot-Verfahren und dem IFT, der diesen Umstand erklären könnte, liegt in der Konformation der eingesetzten NC-Proteine. Während im Western-Blot SDS- und hitzedenaturierte, also in linearer Form vorliegende Proteine eingesetzt wurden, liegen die NC-Proteine in infizierten Zellen in ihrer nativen Struktur und in Form von viralen Aggregaten vor. Daher könnten die HTN- und PUU-spezifischen Epitope nicht oder nur vermindert exponiert und somit für Antikörper unerreichbar sein. In den denaturierten Testverfahren wie dem Western-Blot werden diese serotypenspezifischen Epitope wahrscheinlich besser exponiert und sind dann für Virustyp-spezifische Antikörper leichter zugänglich. Der Western-Blot stellt somit im Vergleich zum IFT ein deutlich geeignetes Verfahren zur Serotypisierung einer HTV-Infektion dar. Ein Problem bei der Durchführung der Western-Blot Analysen ist die benötigte Menge an Serum. Bei einer einmalig durchgeführten serologischen Untersuchung spielt diese Tatsache keine entscheidende Rolle, da 25-50 μ l Serum für eine Westen-Blot Reaktion ausreichen und entsprechende Serummengen bei Einsendung des Untersuchungsmaterials zur Verfügung stehen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten serologischen Reihenuntersuchungen zur Evaluation der Blotverfahren musste allerdings auf Reste einer Serensammlung zurückgegriffen

werden. Für die Teste waren von den im IFT als Hantavirus-positiv getesteten Seren zum Teil nur ca. 50µl verfügbar. Dieser Umstand erschwerte die Arbeiten zur Etablierung eines Blotverfahrens und machte grössere Reihenuntersuchungen mit einem standardisierten Set von Hantavirus-positiven Kontrollseren unmöglich. Trotz der geringen Menge der jeweils zur Verfügung gestellten Kontrollseren war es möglich zu zeigen, dass der Western-Blot eine geeignete Methode zum Nachweis PUU- bzw. HTN-spezifischer Antikörper gegen die NC-Proteine darstellt.

Eine Weiterentwicklung des Western Blot-Verfahrens stellt das Dot Blot-Verfahren dar, in dem ohne vorherige Auftrennung im SDS-Page das Antigen in nativer oder denaturierter Form auf eine Nitrocellulosemembran punktförmig appliziert wird. Alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten NC-Proteine wurden in diesem Verfahren hinsichtlich ihrer Eignung zum Nachweis Hantavirus-spezifischer Antikörper getestet. In dem direkten serologischen Vergleich der verschiedenen Antigenpräparationen im Dot-Blot wurden die vollständigen PUU und HTN NC-Proteine mit den 116 Aminosäuren langen N-terminalen NC-Fragmenten verglichen. Dabei zeigte sich grundsätzlich die gleiche Reaktivität der trunkierten NC-Proteine im Vergleich zu den vollständigen NC-Proteinen. Dieses Ergebnis bestätigt, daß der immundominante Terminus N-terminal lokalisiert ist.

Betrachtet man dagegen die Ergebnisse des Dot-Blots bezüglich des Nachweises Serotyp-spezifischer Antikörper, so zeigt der Western-Blot mit denaturiertem NC-Antigen eindeutig Vorteile. Die Auswertung der Western-Blots war eindeutiger und ließ sich exakter den entsprechenden PUU- bzw. HTN-Reaktionen zuordnen. Im Dot-Blot zeigten sich ebenfalls eindeutige Signale für die Anwesenheit Hantavirus-spezifischer Antikörper, aber nur bei einem Serum konnte eine serotypenspezifische, schwache Reaktion beobachtet werden. Auch waren im Dot-Blot falsch positive Reaktionen zu beobachten. So zeigten einige Seren, die im IFT als Hantavirus-negative Seren getestet wurden, sehr schwache positive Reaktionen im Dot-Blot. Im Western-Blot hingegen fanden sich solche falsch-positiven Resultate nicht. Um letztendlich zu zeigen, ob es sich um testabhängige Unterschiede handelt oder ob die unterschiedliche Präsentation des Antigens als natives oder denaturiertes Antigen diese Unterschiede bewirkt, müssen weitere vergleichende Untersuchungen mit einer grösseren Anzahl von Hantavirus-positiven Seren durchgeführt werden. Ein weiteres Problem des Antikörpernachweises im Dot-Blot zeigte sich bei den Untersuchungen mit Zellkulturextrakt aus hantavirusinfizierten Vero-Zellen. Die aufgetragenen

Antigenextrakte waren für den Antikörpernachweis mit der Dot-Blot Methode ungeeignet. Alle untersuchten humanen Seren zeigten starke Immunreaktionen mit den Extrakten der Negativkontrolle, den Protein-Extrakten aus nicht-infizierten Vero E6-Zellen. Diese Protein-Extrakte zeigten eine vergleichbar starke Reaktion mit humanen Seren wie die Extrakte von HTN- oder PUU- infizierten Vero E6-Zellen. Daher ist die Verwendung von Total-Antigen aus infizierten Zellen für den Dot-Blot kein geeignetes Verfahren auch wenn sich in den Extrakten infizierter Vero E6-Zellen alle Hantavirus Antigene, das NC-Protein und die beiden viralen Glycoproteine G1 und G2 befinden.

Prinzipiell ist der Western-Blot für die Serotypisierung von Hantavirus-spezifischen Antikörpern eine geeignete Methode. Im Unterschied zu anderen Untersuchungen wie z.B. der Serotypisierung und Genotypisierung bei Charakterisierung der HIV-spezifischen Immunantwort, ergeben sich bei der Genotypisierung der Immunantwort gegen das Hantavirus weitreichendere Probleme. Bei Hantavirus infizierten Personen finden sich in den Körperflüssigkeiten nur relativ geringe Virusmengen, die dem direkten Nachweis durch die häufig als sog. *nested*-PCR (Hörling et al., 1995) durchgeführte RT-PCR entgehen oder über Kontaminationen zu falsch positiven Resultaten führen können (Kwok und Higuchi, 1989). Nur in Serumproben oder Urinproben aus der frühen akuten Phase der Infektion lässt sich zudem virale RNA nachweisen (Plyusnin et al., 1997). Prinzipiell ist die virale RNA, wenn sie in intakten Capsiden verpackt ist, geschützt gegen eine enzymatische Degradation z. B. durch RNasen. RNA ist jedoch im Unterschied zu DNA sehr empfindlich gegenüber alkalischer oder saurer Hydrolyse. Daher sollten zum Nachweis viraler RNA, Serumproben direkt nach Abnahme mit stabilisierenden Puffern, wie z. B. Puffern mit Guanidiniumthiocyanat (4-6 M) behandelt werden. Derart vorbehandelte Serumproben sind in diesen Puffern für eine längere Zeit stabil und können sogar bei Raumtemperatur gelagert bzw. verschickt werden. Zu bedenken ist allerdings, dass aus diesen mit Guanidiniumthiocyanat behandelten Serumproben keine Antikörper mehr bestimmt werden können. Die zusätzliche Einsendung von Guanidiniumthiocyanat behandelten Urinproben für den Nachweis von Hantavirus RNA ist ebenfalls möglich und sogar zu empfehlen, da im Urin im Vergleich zum Serum über einen längeren Krankheitszeitraum Virus nachgewiesen werden kann. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß der Nachweis einer

Hantavirusinfektion primär serologisch aus normalem Serum erfolgen und nur in Ausnahmefällen durch eine RT-PCR und Genotypisierung ergänzt werden sollte. Der Western-Blot bzw. die Verwendung der Western-Blot Streifen stellen ein einfaches und schnell durchzuführendes diagnostisches Testverfahren zum sicheren Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern dar. Unter Verwendung dieses diagnostischen Verfahrens kann die Charakterisierung eines größeren Patientenkollektives erfolgen. Eine Korrelation der serologischen Ergebnisse mit den erfassten klinischen Daten dieses Patientenkollektives könnte für prognostische Aussagen bezüglich des Krankheitsverlaufes einer Hantavirusinfektion verwendet werden. Da das HFRS und die NE im mitteleuropäischen Raum relativ seltene Erkrankungen darstellen und sie, als den haemorrhagischen Fiebererkrankungen zugehörig, mit einer sehr variablen Klinik einhergehen (Earle et al., 1954), werden Hantavirusinfektionen klinisch häufig übersehen. Ein schneller, sicherer und vor allen einfach durchzuführender Test wäre hilfreich um HTV-Infektion schon in der Frühphase nachzuweisen, was hinsichtlich einer frühzeitig eingeleiteten Therapie von entscheidener Bedeutung für den Krankheitsverlauf der Patienten sein kann (Huggins, 1989 und 1991). Der serotypenspezifische Nachweis, wie ihn der Western-Blot ermöglicht, hat neben der epidemiologischen Bedeutung bezüglich des Krankheitsverlaufes eine nicht unerhebliche prognostische Relevanz, da eine Infektion mit dem Serotyp Hantaan häufig schwerer verläuft, bzw. häufiger letal endet, während eine HTV-Infektion mit dem Serotyp Puumala überwiegend mild verläuft.

Zusammenfassung

Die Nucleocapsid-Proteine der beiden Hantavirus-Serotypen Puumala (PUU) und Hantaan (HTN) wurden in Bakterien (*E. coli* BL21 DE3) kloniert und exprimiert. Die Klonierung erfolgte in die Expressionsvektoren pET28 und pET22. Die Klonierung in die pET Expressionsvektoren führt zur Fusion des NC-Gens mit einer Sequenz, die für sechs Histidine kodiert. Diese sechs Aminosäuren (His-Tag, His₆) lassen sich sowohl an den N- als auch an den C-Terminus des Proteins fusionieren und erlauben die Aufreinigung der Fusionsproteine mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie.

Durch die Klonierung der NC-Gene in den Expressionsvektor pET28 wurden NC-Proteine mit einem am N-Terminus fusioniertem His-Tag erzeugt. Das His₆-NC Fusionsprotein des PUU Virus war löslich, wogegen das HTN His₆-NC-Protein nicht in gelöster Form gewonnen werden konnte, da es unlösliche, grosse Aggregate bildete, die sich elektronenmikroskopisch darstellen ließen. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten, dass sich die rekombinanten NC-Protein in Bakterien in Form von Aggregaten, sogenannten *inclusion bodies* anlagern. Das rekombinante Protein wird dabei in Mengen produziert die ca. 30-50% des Bakterienvolumens ausmachen.

Durch die Klonierung und Expression der NC-Gene in den Expressionsvektor pET22 wurden die NC-Proteine mit einem am C-Terminus fusioniertem His-Tag erzeugt. Die His₆-Fusionsproteine der beiden PUU und HTN Viren waren löslich und konnten aus Bakterienextrakten isoliert werden.

Die Aufreinigung der hergestellten PUU und HTN NC-Proteine erfolgte mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie. Als Affinitätsmatrix wurde *iminodiacetic acid*-(IDA)-Sephrose verwendet, die mit Ni-Ionen beladen wurde.

Für die geplanten serologische Untersuchungen wurden die NC-Proteine der beiden Serotypen HTN und PUU als His₆-Fusionsproteine gereinigt. Zusätzlich wurde von beiden NC-Proteinen die immundominanten 116 N-terminalen Aminosäuren des NC-Proteins in den pET22-Expressionsvektor kloniert.

Die gereinigten Proteine wurden im Western-Blot und im Dot-Blot getestet. Die Antigenität aller hergestellten NC-Proteine wurde im Western-Blot nachgewiesen, wobei definierte Kontrollseren eingesetzt wurden, deren Titer im einem Standard-Immundefizienztest bestimmt wurden. Neben dem Western-Blot wurde der Dot-Blot zum Nachweis von Hantavirus-spezifischen Antikörpern etabliert.

Die Verwendung der HTN und PUU NC-Proteine im Western Blot erlaubte den serotypenspezifischen Nachweis von Hantavirus Antikörpern gegen das PUUV oder das HTNV. Obwohl ein Teil der verwendeten Seren sowohl mit dem PUU- als auch mit dem HTN Antigen reagierten, wurde bei einem Großteil der Seren nur PUU oder HTN-spezifische Antikörper detektiert. Diese Beobachtung zeigt, dass sich die im Western Blot eingesetzten NC-Proteine prinzipiell für Typisierung der Antikörperantwort bei Hantaviruspatienten eignen. Zur genauen Bestimmung typenspezifischer Antikörper war der Western-Blot dem Dot-Blot Test deutlich überlegen. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die N-terminalen Fragmente der NC-Proteine bei den Tests wie die vollständigen NC-Proteine reagierten, da sich die Epitope, die für die typenspezifische Unterscheidung von Hantavirusantikörpern verantwortlich sind, in dieser N-terminalen Region des NC-Proteins befinden.

Ausblick

Die durchgeführten Arbeiten zeigen, dass mit einem N-terminalen Proteinfragment der beiden hantaviralen NC-Proteine der beiden Serotypen PUU und HTN der Nachweis von serotypenspezifischen Antikörpern gegen diese beiden Hantaviren durchgeführt werden kann. Da nur ein 116 Aminosäuren umfassender Abschnitt benötigt wird, ist die Klonierung weiterer Hantavirus NC-Antigene auf der Basis von Sequenzdaten möglich. Das Set der beiden Hantavirus Antigene des PUU und HTN Virus könnte z. B. mit Sequenzen der NC-Proteine anderer Serotypen, wie z.B. Dobrava, Seoul oder Tula bzw. Sequenzen lokal dominierender Virusvarianten ergänzt werden.

Der durchgeführte Dot-Blot Test ist eine einfache Anwendung zum Nachweis von Antikörpern, die aber in der Zukunft in abgewandelter Form, der Chip-Technologie in die Labordiagnostik Einzug halten wird. Mit Proteomics werden Peptid- und Protein-Chips bezeichnet, durch die eine sehr große Anzahl von Seren gleichzeitig getestet und automatisch ausgewertet werden kann. Auf einem solchen Chip können nach dem heutigen Stand der Technik ca. 400-1000 verschiedene Peptide oder Proteine gekoppelt werden. Die Anzahl der Antigene ist damit deutlich geringer als die Anzahl an DNA-Sonden die auf einen solchen Chip gebracht werden kann, reicht aber für die Entwicklung von Antigen-Chips für bestimmte Virusarten wie z. B. die Viren welche haemorrhagische Fieber hervorrufen, aus. Die verschiedenen NC-Antigene könnten dabei Bestandteil eines zu entwickelnden Chips zum Nachweis von Antikörpern gegen verschiedene Viren und deren Varianten sein.

5 Literaturverzeichnis

Alexeyev A, Baranov A (1993): Puumala virus infection without signs of renal involvement. *Scand J Infect Dis* 25(4):525-7

Anonymous (1993): Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Weekly Epidemiological Record, WHO* 68: 189-192

Antic D, Yong Kang C, Spik K, Schmaljohn CS, Vapalahti O, Vaheri A (1992): Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of hantavirus. *Virus Res* 24: 35-46

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994): *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York

Avsic-Zupanc T, Toney A, Anderson K, Chu YK, Schmaljohn CS (1992): Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *J Gen Virol* 76: 2801-2808

Baek LJ, Yanagihara R jr., Gibbs CJ, Miyazaki M, Gajdusek DC (1988): Leakey Virus: a New Hantavirus Isolated from *Mus musculus* in the United States. *J Gen Virol* 69: 3129-3132

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Janseen CL, Wertheim van Dillen PME, van der Noordaa J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3): 495-503

Brackett LE, Rotenberg J, Sherman CB (1994): Hantavirus Pulmonary Syndrome in New England and Europe. *New Engl. J Med* 331(8): 545

Bren AF, Pavlovic SK, Koselj M, Kovac J, Kandus A, Kveder R (1996): Acute Renal Failure Due to Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Renal Failure* 18(4): 635-638

Brummer-Korvenkotio M, Vaheri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker Blom N, Lähdevirta J (1980): Nephropathia Epidemica: Detection of Antigen in Bank Voles and Serologic Diagnosis of Human Infection. *J Infect Dis* 141(2): 131-136

Brus Sjölander K, Elgh F, Kallio Kokko H, Vapalahti O, Hägglund M, Palmcrantz V, Juto P, Vaheri A, Niklasson B, Lundkvist A (1997): Evaluation of Serological Methods for Diagnosis of Puumala Hantavirus Infection (Nephropathia Epidemica). *J Clin Microbiol* 35(12): 3264-3268

Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE, Myers RM (1971): Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res*; 59(11): 1768-60

Chapman LE, Mertz GJ, Peters CJ, Jolson HM, Khan AS, Ksiazek TG, Koster FT, Baum KF, Rollin PE, Pavia AT, Holman RC, Christenson JC, Rubin PJ, Behrman RE, Bell LJ, Simpson GL, Sadek RF (1999): Intravenous ribavirin for hantavirus pulmonary syndrome: safety and tolerance during 1 year of open-label experience. *Ribavirin Study Group. Antivir Ther* 4(4): 211-9

Childs JE, Ksiazek TG, Spiropoulou CF, Krebs JW, Morzunov S, Maupin GO, Gage KL., Rollin PE, Sarisky J, Enscore RE, Frey JK, Peters CJ, Nichol ST (1994): Serologic and Genetic Identification of *Peromyscus maniculatus* as the Primary Rodent Reservoir for a New Hantavirus in the Southwestern United States. *J Infect Dis* 169: 1271-1280

Chu YK, Jennings G, Schmaljohn A, Elgh F, Hjelle B, Lee HW, Jenison S, Ksiazek T, Peters CJ, Rollin P, Schmaljohn CS (1995): Cross-Neutralization of Hantaviruses with Immune Sera from Experimentally Infected Animals and from Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantavirus Pulmonary Syndrome Patients. *J Infect Dis* 172: 1581-1584

Classen M, Diehl V, Kochsiek K (1993): *Innere Medizin*. 2. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

Clement J, McKenna P, Colson P, Damoiseaux P, Penalba C, Halin P, Lombart D (1993): Hantavirus epidemic in Europe, *Lancet* 343: 114-115

Clement J, McKenna P, Groen J, Osterhaus A, Colson P, Vervoort T, van der Groen G, Lee HW (1995): Epidemiology and laboratory diagnosis of Hantavirus (HTV) infections. *Acta Clin Belg* 50(1): 9-19

Clement J, Underwood P, Ward D, Pilaski J, LeDuc J (1996): Hantavirus outbreak during military manoeuvres in Germany. *Lancet* 347(8997): 336

Corbet B (1978): *The Mammals of the Palaearctic Region: A Taxonomic Review*; Cornell University Press, 1978

Cosgriff TM (1989): Hemorrhagic fever with renal syndrome. Four decades of research. *Ann Intern Med* 110: 313

Cosgriff TM, Lewis RM (1991): Mechanisms of disease in hemorrhagic fever with renal syndrome. *Kidney Internat* 40(35): 72-79

Domingo E, Holland JJ (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In Morse SS: *The Evolutionary Biology of Viruses*. Raven Press, New York, 161-184

Dubois-Dalcq M, Holmes KV, Rentier B (1984): Assembly of Bunyaviridae, in: Kingsbury. D.W. (Editors): *Assembly of enveloped RNA viruses*, Springer Verlag, 83-89

Dunst R, Mettang Z, Kuhlmann U (1998): Severe Thrombocytopenia and Response to Corticosteroids in a case of Nephropathia Epidemica. *Am J Kid Dis* 31(1): 116-120

Earle DP (1954): Symposium on epidemic hemorrhagic fevers. *Am J Med* 16: 617-709

Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, Stenlund H, Avsic-Zupanc T, Hjelle B, Lee HW, Smith KJ, Vainionpää R, Wiger D, Wadell G, Juto P (1997): Serological Diagnosis of Hantavirus Infections by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Detection of Immunglobulin G and M Responses to Recombinant Nucleocapsid Proteins of Five Viral Serotypes. *J Clin Microbiol* 35(5): 1122-1130

Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, Wadell G, Juto P (1996): A major antigenic domain for the human response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus. *J Virol Methods* 59: 161-172

Elgh F, Wadell G, Juto P (1995): Comparison of the Kinetics of Puumala Virus Specific IgM and IgG Antibody Responses in Nephropathia Epidemica as Measured by a Recombinant Antigen-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and an Immunofluorescence Test. *J Med Virol* 45: 146-150

Elliott RM (1994): Bunyaviruses, Replication, in: Webster, R.G., Granoff (Editors), *Encyclopedia of Virology*, Academic Press, 192-196

Fauci A, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hanser SL, Longo DL (1998): *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw Hill, 14th Edition

Garcin D, Lezzi M, Dobbs M, Elliott RM, Schmaljohn CS, Yong Kang C, Kolakofsky D (1995): The 5' Ends of Hantaan Virus (Bunyaviridae) RNAs Suggest a Prime-and-Realign Mechanism for the Initiation of RNA Synthesis. *J Virol* 69(9): 5754-5762

Gärtner L, Emmerich P, Schmitz H (1988): Hantavirusinfektionen als Ursache von akutem Nierenversagen. *Dtsch Med Wschr* 113(23): 937-940

George J, Patnaik M, Bakshi E, Levy Y, Ben-David A, Ahmed A, Peter JB, Shoenfeld Y (1998): Hantavirus seropositivity in Israeli patients with renal failure. *Viral Immunol* 11(2): 103-108

Gonzalez Scarano F, Nathanson N: Bunyaviruses, in: Fields BN, Knipe DM (Editors), *Virology*, Raven Press, 1990, 1195-1228

Gonzalez-Scarano F, Nathanson N: Bunyaviridae, in: Fields BN, Knipe DM und Howley PM (Editors), *Fields Virology*, Raven Publishers, 1996, 1473-1504

Gött P, Stohwasser R, Schnitzler P, Darai G, Bautz EKF (1993): RNA binding of recombinant nucleocapsid proteins of hantaviruses. *Virology* 194: 332-337

Gött P, Zöllner L, Darai G, Bautz EKF (1997): A Major Antigenic Domain of Hantaviruses is Located on the Aminoproximal Site of the Viral Nucleocapsid Protein. *Virus Genes* 14(1): 31-40

- Gött P, Zoller L, Yang S, Stohwasser R, Bautz EKF, Darai G (1991): Antigenicity of hantavirus nucleocapsid proteins expressed in *E. coli*. *Virus Res*; 19(1): 1-15
- Gött P, Zöller L, Yang S, Stohwasser R, Bautz EKF, Darai G (1991): Antigenicity of hantavirus nucleocapsid proteins expressed in *E. coli*. *Virus Res* 19: 1-16
- Groen J, v.d. Groen G, Hoofd G, Osterhaus A (1989): Comparison of immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay for the serology of hantaan virus infections. *J Virol Meth* 23: 195-203
- Guang MY, Liu GZ, Cosgriff TM (1989): Hemorrhage in hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *Rev Infect Dis* 11(4): 884-889
- Hanahan D (1983): Studies on Transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580
- Hart CA, Bennett M (1994): Hantavirus: an increasing problem? *Ann Trop Med Parasitol* 88: 347-358
- Henttonen H , Vapalahti O, Vaheiri A (1996): How many kinds of hantaviruses?. *Tree* 11: 7-8
- Hjelle B , Chavez Giles F, Torrez Martinez N, Yamada T, Sarisky J, Ascher M, Jenison S (1994): Dominant glycoprotein epitope of four corners hantavirus is conserved across a wide geographical area. *J Gen Virol* 75: 2881-8
- Hjelle B , Torrez-Martinez N , Koster FT (1996): Hantavirus pulmonary syndrome-related virus from Bolivia. *Lancet* 347: 57
- Hjelle B, Jenison S, Torrez Martinez N, Herring B, Quan S, Polito A, Pichuanes S, Yamada T, Morris C, Elgh F, Lee HW, Artsob H, Dinello R (1997): Rapid and Specific Detection of Sin Nombre Virus Antibodies in Patients with Hantavirus Pulmonary Syndrome by a Strip Immunoblot Assay Suitable for Field Diagnosis. *J Clin Microbiol* 35(3): 600-608
- Hjelle B, Jenison S, Torrez Martinez N, Yamada T, Nolte K, Zumwalt R, MacInnes K, Myers G (1994): A Novel Hantavirus Associated with an Outbreak of Fatal Respiratory Disease in the Southwestern United States: Evolutionary Relationships th known Hantaviruses. *J Virol* 68(2): 592-596
- Holland DJ (1998): Emerging viruses. *Curr Op Pedr* 10: 34-40
- Hooper JW, Kamrud KI, Elgh F, Custer D, Schmaljohn CS (1999): DANN Vaccination with Hantavirus M Segment Elicits Neutralizing Antibodies and Protects against Seoul Virus Infection. *Virology* 255: 269-278
- Hörling J, Chizhikov V, Lundkvist A, Jonsson M, Ivanov L, Dekonenko A, Niklasson B, Dzagurova T, Peters CJ, Tkachenko E, Nichol S (1996): Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east russia. *J Gen Virol* 77: 687-694

Hörling J, Lundkvist A, Persson K, Mullaart M, Dzagurova T, Dekonenko A, Tkachenko E, Niklasson B (1995): Detection and Subsequent Sequencing of Puumala Virus from Human Specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 33(2): 277-282

Huggins JW (1989): Prospects for Treatment of Viral Hemorrhagic Fevers with Ribavirin, a Broad-Spektrum Antiviral Drug. *Rev Infect Dis* 11(4): 750-761

Huggins JW, Hsiang CH, Cosgriff TH, Guang MY, Smith JI, Wu ZO, LeDuc JW, Zheng ZM, Meegan JM, Wang QN, Oland DD, Gui XE, Gibbs PH, Yuan GH, Zhang TM (1991): Prospective Double-Blind, Concurrent, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intravenous Ribavirin Therapy of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *J Infect Dis* 164: 1119-1127

Huggins JW, Kim GR, Brand OM, McKee KT jr (1986): Ribavirin therapy for Hantaan virus infection in suckling mice. *J Infect Dis* 153(3): 489-97

Jenison S, Yamada T, Morris C, Anderson B, Torrez Martinez N, Keller N, Hjelle B (1994): Characterization of Human Antibody Responses to Four Corners Hantavirus Infections among Patients with Hantavirus Pulmonary Syndrome. *J Virol* 68(5): 3000-6

Johnson AM, Bowen MD, Ksiarek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN, Nichol S (1997): Laguna Negra Virus Associated with HPS in Western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238: 115-127

Kadkhodayan S, Knapp MS, Schmidt JJ, Fabes SE, Rupp B, Balhorn R (2000): Cloning, expression, and one-step purification of the minimal essential domain of the light chain of botulinum neurotoxin type A. *Protein Expr Purif* 19(1): 125-30

Kariwa H, Fujiki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Hashimoto N (1998): Urine-associated horizontal transmission of Seoul virus among rats. *Arch Virol* 143: 15-24

Kasahara S, Kitano M (1943): Studies on pathogen of epidemic hemorrhagic fever. *Jap J Path* 33: 476-483

Kerouani G, Binet P, Coudrier D, Lallement PY, Perez C, Rollin PE (1992): Séroprévalence de la fièvre hémorragique avec syndrome rénal chez des travailleurs forsetriers en Ile-de-France. *Presse Med* 21(34): 1636

Khan AS, Khabbaz RF, Armstrong LR, Holman RC, Bauer SP, Graber J, Strine T, Miller G, Reef S, Tappero J, Rollin PE, Nichol ST, Zaki SR, Bryan RT, Chapman LE, Peters CJ, Ksiazek TG (1996): Hantavirus pulmonary syndrome: the first 100 US cases. *J Infect Dis* 173(6): 1297-303

Kim GR, Lee YT, Park CH (1994): A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantaviruses from lung tissues of bats. *Arch Virol* 134(1-2): 85-95

Kitajima EW, Resende RD, de-Avila AC, Goldbach RW, Peters D (1992): Immunoelectron microscopical detection of tomato spotted wilt virus and its nucleocapsids in crude plant extracts. *J Virol Methods* 38(3): 312-22

Kolakofsky D (1991): Bunyaviridae. *Current Topics in Microbiology and Immunology* Band 169. Springer Verlag, New York

Koraka P, Avsic-Zupanc T, Osterhaus AD, Groen J (2000): Evaluation of two commercially available immunoassays for the detection of hantavirus antibodies in serum samples. *J Clin Virol* 17(3): 189-96

Kulzer P, Heidland A (1994): Akutes Nierenversagen durch Hantaviren. *Ther Umsch* 51(12): 824-831

Kwok S, Higuchi R (1989): Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85

Le Guenno B (1998): Hantavirus and pulmonary pathology. *Rev Pneumol Clin* 54(6): 393-8

LeDuc JW (1987): Epidemiology of Hantaan and related viruses. *Lab Anim Sci* 37(4): 413-418

Lee HW, Baek LJ, Johnson KM (1982): Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis* 146(5): 638-644

Lee HW, Lee PW, Lähdevirta J, Brummer Korvenkontio M (1979): Aetiological relation between Korean hemorrhagic fever and nephropathia epidemica. *Lancet* 1: 186-187

Lee HW, Lee WP, Johnson KM (1978): Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 137(3): 298-307

Lee HW, van der Groen G (1989): Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* 36: 62-102

Levis S, Rowe JE, Morzunov S, Enria DA, St Jeor S (1997): New Hantaviruses causing hantavirus pulmonary syndrome in central Argentina. *Lancet* 349: 998-9

Linderholm M, Sandström T, Rinnström O, Groth S, Blomberg A, Tärnvik A (1997): Impaired Pulmonary Function in Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Clin Infect Dis* 25: 1084-1089

Linderholm M, Sandström T, Rinnström O, Groth S, Blomberg A, Tärnvik A (1997): Impaired Pulmonary Function in Patients with Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Clin Inf Dis* 25: 1084-9

López N, Padula P, Rossi C, Lázaro ME, Franze Fernandez MT (1996): Genetic Identification of a New Hantavirus Causing Severe Pulmonary Syndrome in Argentina. *Virology* 220: 223-226

Lundkvist A, Cheng Y, Brus Sjölander K, Niklasson B, Vaheri A, Plyusnin A (1997): Cell Culture Adaptation of Puumala hantavirus Changes the Infectivity for its Natural Reservoir, *Clethrionomys glareolus* and Leads to Accumulation of Mutants with Altered Genomic RNA S Segment. *J Virol* 71(12): 9515-23

Lundkvist A, Wiger D, Hörling J, Brus-Sjölander K, Plyusnin A, Mehl R, Vaheri A, Plyusnin A (1998): Isolation and characterization of Puumala hantavirus from Norway: evidence for a distinct phylogenetic sublineage. *J Gen Virol* 79(11): 2603-14

McKenna P, Clement J, Matthys P, Coyle PV, McCaughey C (1994): Serological Evidence of Hantavirus Disease in Northern Ireland. *J Med Virol* 43: 33-38

Meisel H, Lundkvist A, Gantzer K, Bar W, Sibold C, Krüger DH: First case of infection with hantavirus Dobrava in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17(12): 884-5

Mentel R, Bordihn N, Wegner U, Wendel H, Niklasson B (1999): Hantavirus Dobrava infection with pulmonary manifestation. *Med Microbiol Immunol* 188(1): 51-3

Mertz GJ, Hjelle B, Bryan RT (1998): Hantavirus Infection. *Disease-a-Month* 44(3): 85-138

Moll-van-Charante AW, Groen J, Osterhaus A (1994): Risk of infections transmitted by arthropods and rodents in forestry workers. *Europ J Epidemiol* 10(3): 349-351

Mullis KB, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350

Murphy FA, Harrison AK, Whitfield SG (1973): Bunyviridae: morphologic and morphogenetic similarities of bunyviridae supergroup viruses and several other arthropod borne viruses. *Intervirology* 1: 297-316, 1973

Mustonen J, Brummer-Korvenkoti M, Hedman K, Pasternack A, Pietilä K, Vaheri A (1994): Nephropathia Epidemica in Finland: A Retrospective Study of 126 Cases. *Scand J Infect Dis* 26: 7-13

Mustonen J, Partanen J, Kanerva M, Pietilä K, Vapalahti O, Pasternack A, Vaheri A (1996): Genetic Susceptibility to severe course of nephropathia epidemica caused by Puumala hantavirus. *Kidney Internat* 49: 217-221

NCBI Datenbank (Medline): www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed

Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ (1993): Genetic Identification of a Hantavirus Associated with an Outbreak of Acute Respiratory Illness. *Science* 262: 914-917

Niklasson B, Tkachenko EA, Ivanov AP, van-der-Groen G, Wiger D, Andersen HK, LeDuc J, Kjelsson T, Nyström K (1990): Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Evaluation of ELISA for Detection of Puumala-virus-specific IgG and IgM. *Res Virol* 141: 637-648

Novo R, Gagnadoux MF, LeGuenno Y, Gubler MC, Niaudet P, Guyot C, Broyer M (1999): Chronic renal failure after Puumala virus infection. *Pediatr Nephrol* 13: 934-935

Nowotny N (1996): Serologic studies of domestic cats for potential human pathogenic virus infections from wild rodents. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 198(5): 452-461

Papa A, Johnson AM, Stockton PC, Bown MD, Spiropoulou CF, Alexiou-Daniel S, Ksiazek TG, Nichol ST, Antoniadis A (1998): Retrospective Serological and Genetic Study of the Distribution of Hantaviruses in Greece. *J Med Virol* 55: 321-327

Pilaski J, Ellerich C, Kreutzer T, Benik W, Lewandowski B, Lang A, Autenrieth IB, Vanek E (1991): Endemisches Vorkommen des Hämorrhagischen Fiebers mit renalem Syndrom (HFRS) in der Bundesrepublik Deutschland. *Z ärztl Fortbild* 85: 869-874

Pilaski J, Ellerich C, Kreutzer T, Lang A, Benik A (1991): Haemorrhagic fever with renal syndrome in Germany. *Lancet* 337: 111

Pluysnin A, Hörling J, Kanerva M, Mustonen J, Cheng Y, Partanen J, Vapalahti O, Kukkonen SMJ, Niememaa J, Henttonen H, Niklasson B, Lundkvist A, Vaheri A (1997): Puumala Hantavirus Genome in Patients with Nephropathia Epidemica: Correlation of PCR Positivity with HLA Haplotype and Link to Viral Sequences in Local Rodents. *J Clin Microbiol* 35(5): 1090-6

Pluysnin A, Vapalahti O, Lehvälaiho H, Apekina N, Mikhailova T, Gavrilovskaya I, Laakkonen J, Niemimaa J, Henttonen H, Brummer-Korvenkontio M, Baheri A (1995): Genetic variation of wild Puumala viruses within the serotype, local rodent populations and individual animal. *Virus Res* 38: 25-41

Pluysnin A, Vapalahti O, Vaheri A (1996): Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77: 2677-2687

Pluysnin A, Vapalahti O, Lankinen H, Lehvälaiho H, Apekina N, Myasnikov Y, Kallio-Kokko H, Henttonen H, Lundkvist A, Brummer-Korvenkontio M (1994): Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J Virol* 68(12): 7833-9

Rebibou JM, Kiestermann JP, Cercueil JP, Tanter Y, Portier H, Rifle G, Chevet D (1997): Papillary necrosis: a late complication of nephropathia epidemica? Clin Nephrol 46(4): 263-265

Reinhardt B, Schmitz H, L'ag-Stehr J, Niedrig M (1996): Steckbriefe seltener und „importierter“ Virusinfektionen. Informationsschrift des Robert Koch Institutes (RKI), Berlin

Rollin PE, Bowen MD, Kariwa H, Saluzzo JF, Guerard S, Flechaire A, Coudrier D, Sureau P, Peters CJ, Nichol ST (1995): Short report: isolation and partial characterization of a puumala virus from a human case of nephropathia epidemica in france. Am J Trop Med Hyg 54(6): 577-578

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491

Salonen EM, Parren PWHI, Graus YF, Lundkvist A, Fisticaro P, Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Vaehri A, Burton DR (1998): Human recombinant Puumala virus antibodies: cross-reaction with other hantaviruses and use in diagnostics. J Gen Virol 79: 659-665

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-7

Schmaljohn CS, Dalrymple JM (1983): Analysis of Hantaan virus RNA: Evidence of a new genus of Bunyaviridae. Virology 131: 482-491

Schmaljohn CS, Hjelle B (1997): Hantaviruses: A Global Disease Problem. NIH 3(2)

Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, Dalrymple JM (1986): Coding Strategy of the S Genome Segment of Hantaan Virus. Virology 155: 633-643

Schreiber M, Laue T, Wolff C (1996): Hantavirus pulmonary syndrome in Germany. Lancet 347: 336-337

Schubert U, Metzler B, Braun B (1991): Hantanephritis: Endemisch im Kreis Reutlingen. Z ärztl Fortbild 85: 1107-1109

Shutov AM, Lesnikov IR (1999): Chronic renal dysfunction after Hantavirus infection. Nephrol Dial Transplant 14: 1041

Stohwasser R, Giebel LB, Zöller L, Bautz EKF, Darai G (1990): Molecular Characterization of the RNA S Segment of Nephropathia Epidemica Virus Strain HällnäsB1. Virology 174: 79-86

Tsai TF (1987a): Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Clinical Aspects. Lab Anim Sci 37(4): 419-427

Tsai TF (1987b): Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Mode of Transmission to Humans. *Lab Anim Sci* 37(4): 428-430

Ulrich R, Lundkvist A, Meisel H, Koletzki D, Brus-Sjölander K, Gelderblom HR, Borisova G, Schnitzler P, Darai G, Krüger DH (1997): Chimaeric HBV core particles carrying a defined segment of Puumals hantavirus nucleocapsid protein evoke protective immunity in an animal model. *Vaccine* 16(2-3): 272-280

Vahlenkamp M, Müller T, Tackmann K, Löschner U, Schmitz H, Schreiber M (1998): The muskrat (*Ondatra zibethicus*) as a new reservoir for puumala-like hantavirus strains in Europe. *Virus Res* 57: 139-150

Van-Ypersele-de-Strihou C, Méry JS (1989): Hantavirus-related Acute Interstitial Nephritis in Western Europe. Expansion of a World-wide Zoonosis. *Q J Med* 73(270): 941-950

von-Briesen H, Grez M, Ruppach H, Raudonat I, Unger RE, Panhans B, Dietrich U, Rübsamen-Waigmann-H (1999): Selection of HIV-1 genotypes by cultivation in different primary cells. *AIDS* 13(3): 307-15

Warner GS (1996): Hantavirus Illness in Humans: *Review and Update*. *South Med J* 89(3): 264-270

Wells RM, Sosa-Estani S, Yadon ZE, Enria D, Padula P, Pini N, Mills JN, Peter CJ, Segura EL (1997): An Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group of Patagonia: An Unusual Hantavirus Outbreak in Southern Argentina: Person-to-Person Transmission? *EID* 3(2)

Wünschmann S (1993): PCR-Nachweis von Hantaviren in Nagetieren und humanen Sektionsgeweben. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen

Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, Schmaljohn CS (1994): Phylogenetic Analysis of Virus Isolates in the Genus Hantavirus, Family Bunyaviridae. *Virology* 198: 205-217

Xiao SY, Yanagihara R, Godec MS, Eldadah ZA, Johnson BK, Gajdusek DC, Asher DM (1991): Detection of hantavirus RNA in tissues of experimentally infected mice using reverse transcriptase-directed polymerase chain reaction. *J Med Virol* 33(4): 277-82

Yoshimatsu K, Arikawa J, Tamura M, Yoshida R, Lundkvist A, Niklasson B, Kariwa H, Azuma I (1996): Characterization of the nucleocapsid protein of Hantaan virus strain 76-118 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 77: 695-704

Zeier M, Ritz E (1996): Hantavirus-induziertes akutes Nierenversagen. *Internist* 37: 1092-1095

Zöller L, Faulde M, Meisel H, Ruh B, Kimmig P, Schelling U, Zeier M, Kulzer P, Becker C, Roggendorf M, Bautz EKF, Krüger DH, Darai G (1995): Seroprevalence of Hantavirus Antibodies on Germany as Determined by a New Recombinant Enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14: 305-313

Zöller L, Scholz J, Stohwasser R, Giebel LB, Sethi KK, Bautz EKF, Darai G (1989): Immunoblot Analysis of the Serological Response in Hantavirus Infections. *J Med Virol* 27: 231-237

Zöller L, Yang S, Gött P, Bautz EKF, Darai G (1993): A Novel μ -Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Recombinant Proteins for Sensitive and Specific Diagnosis of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *J Clin Microbiol* 31(5): 1194-1199

Zöller L, Yang S, Gött P, Bautz EKF, Darai G (1993): A novel mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Clin Microbiol* 31(5):1194-9

Zöller L, Yang S, Gött P, Bautz EKF, Darai G (1993): Use of Recombinant Nucleocapsid Proteins of the Hantaan and Nephropathia Epidemica Serotypes of hantaviruses as Immunodiagnostic Antigens. *J Med Virol* 39: 200-207

Zöller L, Yang S, Zeyer M (1991): Rapid diagnosis of haemorrhagic fever with renal syndrome due to hantavirus. *Lancet* 338: 183

Zöller L, Zeier M (1990): Serologische Diagnostik der Hantavirusinfektionen. *Dtsch Med Wschr* 115: 1673-1677

Danksagung

Herrn Dr. Michael Schreiber danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine ständige Bereitschaft zur Hilfe und Diskussion.

Herrn Prof. Dr. H. Schmitz danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, sein stetes Interesse an meiner Arbeit sowie seiner Bereitschaft zur Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. F. Zedler, mit dem ich zusammen das Labor 214 teilte, gilt mein besonderer Dank, mir viele der im Rahmen dieser Arbeit benötigten molekularbiologische Techniken beigebracht zu haben. Ohne seine praktischen Anregungen wäre mir der experimentelle Abschnitt der vorliegenden Arbeit sehr schwer gefallen.

Frau Anette Seifert danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft, ihre konstruktiven Anregungen und ihre ruhige Art, die das Arbeiten im Labor deutlich erleichterte. Auf Ihre Urlaubstipps werde ich früher oder später auf jeden Fall zurückkommen.

Den Mitarbeitern der Gruppe für virologische Diagnostik, insbesondere Frau Petra Emmerich gilt mein Dank, da sie mich in den Umgang mit Zellkulturen einführte und die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Patientenseren bereitstellte.

Weiter seien namentlich erwähnt und für hilfreiche Anregungen und Diskussionen gedankt: Svenja Polzer, Wole Odemuyiwa und Sonja Ziegelmaier

Diese Arbeit ist meiner Frau Andrea sowie meiner Tochter Henrike gewidmet

Curriculum vitae

Name:	Ole Rathje
02.02.1972	geboren in Stade als Sohn von Hans-Joachim Rathje, Fernmeldetechniker und Hannelore Rathje, geb. Bunge, MTRA
1978 - 1991	Schulausbildung
1991	Abitur am Gymnasium Athenaeum, Stade
1991-1992	Zivildienst im Rettungsdienst des DRK Stade
1993-2000	Studium der Humanmedizin an den Universitäten Hamburg und Kiel
1996-1999	Doktorarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Abteilung für Virologie, Hamburg
2000-2002	Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Rendsburg, Chefarzt Prof. Dr. Herrlinger

Die praktischen Arbeiten dieser Dissertation wurden in der Zeit von August 1996 bis Oktober 1999 am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg in der Abteilung für Virologie durchgeführt.

Erklärung:

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Kiel, den 16.05.2001