

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 reagierte, 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.