

Charakterisierung typenspezifischer B-Zell-Epitope der Flaviviren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Diana Ludolfs
aus Uelzen

Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. SCHMITZ

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ

Tag der Disputation: 25. Oktober 2002

Hamburg, den 13. September 2002



A handwritten signature in black ink, which appears to read "Udo Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Schmitz
2. Gutachter: Prof. Dr. L. Renwrantz

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis Oktober 1997 sowie von Januar 1999 bis Juli 2002 in der Abteilung Virologie, Sektion Medizinische Mikrobiologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Hamburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Schmitz danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die stets wertvolle und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Allgemeine Einführung | 1 |
| 1.2 | Klinik und Pathogenese des Denguefiebers | 4 |
| 1.3 | Aufbau der Flaviviren | 8 |
| 1.4 | Die antigene Struktur des E-Proteins | 11 |
| 1.5 | Die Labordiagnose einer Dengueinfektion | 14 |
| 1.6 | Zielsetzung der Arbeit | 17 |
| 2 | Material und Methoden | 18 |
| 2.1 | Material | 18 |
| 2.2 | Methoden für die Zellkultur | 28 |
| 2.2.1 | Kultivierung von Zelllinien | 28 |
| 2.2.2 | Infektion von Zellen | 28 |
| 2.2.3 | Präparation von Zellausstrichen | 29 |
| 2.2.4 | Indirekter Immunfluoreszenztest (IFA) | 29 |
| 2.3 | Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden | 30 |
| 2.3.1 | Sterilisieren von Lösungen und Geräten | 30 |
| 2.3.2 | Lagerung von Bakterien | 30 |
| 2.3.3 | Präparation kompetenter Bakterien | 30 |
| 2.3.4 | Transformation von E. coli | 31 |
| 2.3.5 | Bakterienanzucht und Induktion | 32 |
| 2.3.6 | RNA-Isolierung aus Flavivirus-infizierten Zellen | 32 |
| 2.3.7 | Photometrische Bestimmung von DNA | 33 |
| 2.3.8 | Reverse Transkription | 33 |
| 2.3.9 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 34 |
| 2.3.10 | Diagnostische RNA-Aufreinigung für die 5'-Nuclease-PCR | 35 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.3.11 | 5'-Nuclease-PCR | 36 |
| 2.3.12 | Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten | 36 |
| 2.3.13 | Gelelektrophorese von RNA | 37 |
| 2.3.14 | Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen | 38 |
| 2.3.15 | Plasmid-DNA-Präparation | 38 |
| 2.3.16 | Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen | 38 |
| 2.3.17 | Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren | 39 |
| 2.3.18 | DNA-Sequenzierung | 39 |
| 2.4 | Proteinbiochemische Methoden | 41 |
| 2.4.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 41 |
| 2.4.2 | Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen | 42 |
| 2.4.3 | Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen | 43 |
| 2.4.4 | Konservieren von SDS-Polyacrylamid-Gelen | 44 |
| 2.4.5 | μ -capture ELISA | 44 |
| 2.4.6 | Metall-Chelat-Chromatographie unter nativen Bedingungen | 44 |
| 2.4.7 | Metall-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen | 45 |
| 2.4.8 | Proteinmengenbestimmung durch Image-Quanting | 46 |
| 2.4.9 | Western Blot | 46 |
| 2.4.10 | Ponceau-Rot-Färbung von Nitrozellulosemembranen | 47 |
| 2.4.11 | Herstellung der Blotstreifen | 47 |
| 2.4.12 | Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern | 48 |
| 2.4.13 | Immunoblot mit Patientenseren | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 50 |
| 3.1 | Isolierung und Amplifikation flaviviraler Nukleinsäure | 50 |
| 3.2 | Herstellung der Expressionskonstrukte und Sequenzüberprüfung | 56 |
| 3.3 | Expression und Aufreinigung rekombinanter viraler Antigene | 66 |
| 3.4 | Nachweis der Reaktivität der Antigene mit monoklonalen Antikörpern | 73 |

| | | |
|------|---|-----|
| 3.5 | Test der Patientenseren im Immunoblot | 76 |
| | 3.5.1 Nachweis der typenspezifischen Immunantwort in primärinfizierten Patienten | 79 |
| | 3.5.2 Breitere Reaktivität der Antigene in sekundärinfizierten Patienten | 82 |
| | 3.5.3 Sensitivität und Spezifität des Immunoblots | 84 |
| | 3.5.4 Zeitlicher Verlauf von IgM, IgG, viraler RNA und Immunoblot-Ergebnissen am Beispiel zweier Patienten | 85 |
| | | |
| 4 | Diskussion | 87 |
| | | |
| 5 | Zusammenfassung | 94 |
| | | |
| 6 | Literaturverzeichnis | 97 |
| | | |
| 7 | Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen | 106 |
| | | |
| 8 | Anhang | 108 |
| | 8.1 Abkürzungsverzeichnis | 108 |
| | 8.2 Veröffentlichung | 111 |
| | 8.3 Danksagungen | 112 |
| | 8.4 Lebenslauf | 113 |

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Die Dengueviren gehören zum Genus Flavivirus der Familie Flaviviridae. Zu diesem Genus zählen etwa 70 Vertreter. Sie gliedern sich nach ihrer Kreuzreaktivität im Hämagglutinationshemmtest in neun Serokomplexe (Calisher et al., 1989; Zanotto et al., 1996). Unter ihnen finden sich als weitere humanpathogen bedeutende Viren z. B. das Gelbfiebervirus (YF-Virus), das Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus (FSME- bzw. TBE-Virus), das West Nil-Virus (WN-Virus) und das Japanische Enzephalitis-Virus (JE-Virus).

Ein Großteil der Flaviviren wird durch Arthropoden übertragen (etwa die Hälfte durch Mücken und ein Drittel durch Zecken) und daher auch als Arboviren („arthropod-borne viruses“) bezeichnet. Auch die Dengueviren werden von Mücken auf den Menschen übertragen. Dabei handelt es sich um tagaktive Mücken (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*), in denen sich die Viren aktiv replizieren.

Es existieren vier verschiedene Dengue-Serotypen (Dengue 1 bis Dengue 4). Eine Infektion mit einem dieser vier Serotypen hinterlässt eine lebenslange serotyp-spezifische Immunität, während die Kreuzimmunität mit einem der entsprechenden anderen Serotypen nur wenige Wochen anhält (Sabin, 1952). Personen in Endemiegebieten können daher wiederholt an Denguefieber erkranken.

Die Dengueviren sind in den meisten tropischen und subtropischen Regionen endemisch. In seiner weltweiten Verbreitung ist das Denguefieber zur Zeit die häufigste durch Mücken übertragene Viruserkrankung und der Malaria vergleichbar. Rund 2,5 Milliarden Menschen leben in Gegenden, in denen *Aedes*-Mücken vorkommen. Ungefähr 50 Millionen Infektionen treten jedes Jahr auf,

darin eingeschlossen 400.000 Fälle des Dengue-Hämorrhagischen Fiebers (DHF) und des Dengue-Schocksyndroms (DSS) (WHO, 2000). Die globale Verbreitung des Vektors und der Dengueviren ist in Abbildung 1 dargestellt.

Zur Zeit existiert weder eine spezifische Therapie noch eine käuflich erhältliche Dengue-Vakzine (da Fonseca & Fonseca, 2002). Daher ist die einzige Möglichkeit zur Prävention des Denguefiebers die Bekämpfung der Mücken und die Beseitigung potentieller Brutmöglichkeiten in der Nähe menschlicher Siedlungen, z.B. stehende Gewässer, Wasseransammlungen in Plastikmüll, Blechdosen oder in Autoreifen (WHO, 2001).

Der wichtigste Aspekt im Zusammenhang mit der Entwicklung eines potentiellen Impfstoffs ist, dass die Vakzine tetravalent sein muß, d.h. sie muß vor einer Infektion mit allen vier Dengue-Serotypen schützen. Zwei Lebendimpfstoffe, die auf den vier abgeschwächten Denguevirus-Serotypen basieren, werden zur Zeit getestet (Bhamarapavati & Suthiee, 2000; Eckels et al., 1980). In einem weiteren Ansatz wurde ein Virus eines abgeschwächten Serotyps durch den Einbau von Hüllprotein-Genen der anderen drei Serotypen modifiziert (Huang et al., 2002). Diese Vakzine konnte in Rhesusaffen erfolgreich die Antikörperproduktion induzieren.

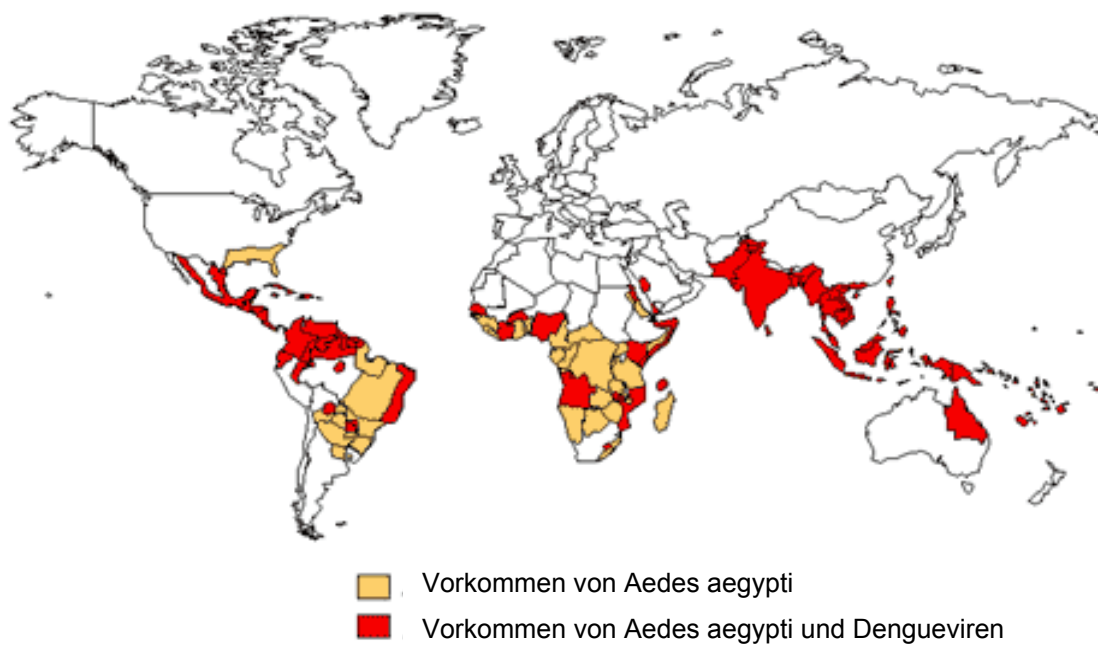


Abb. 1: Verbreitung der Dengueviren und des Vektors *Aedes aegypti* im Jahre 2000.

Abbildung verändert nach der Denguefieber-Homepage des CDC, Fort Collins, Colorado.
(<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>)

1.2 Klinik und Pathogenese des Denguefiebers

Das Denguevirus ist das infektiöse Agens des Denguefiebers (DF) und des Dengue-Hämorrhagischen Fiebers/Dengue-Schocksyndroms (DHF/DSS). Nach den klinischen Symptomen empfiehlt die WHO eine Einteilung in DF (keine spontanen Hämorrhagien) und vier Schweregrade des DHF (DHF1-4, spontane Hämorrhagien). Dabei entsprechen die Grade DHF3 und DHF4 dem DSS (WHO, 1997).

Einfaches Fieber ist die häufigste Manifestation. Viele Infizierte zeigen einen asymptomatischen oder sehr milden Krankheitsverlauf (Burke et al., 1988).

Bei der klassischen Form einer Dengueinfektion, dem DF, das vorwiegend bei älteren Kindern und Erwachsenen auftritt, kommt es nach einer zwei- bis siebentägigen Inkubationszeit zu Fieber mit grippalen Symptomen, insbesondere Gelenk-, Muskel- und Kopfschmerzen. Am ersten oder zweiten Erkrankungstag kann ein vorübergehendes, makuläres Exanthem auftreten. Zwischen dem dritten und fünften Erkrankungstag erscheint ein zweites, makulopapuläres oder morbilliformes Exanthem zunächst am Stamm, das sich zentrifugal ausbreitet. Es besteht eine Leukopenie mit einer absoluten Granulozytopenie und einer Thrombozytopenie (Holzmann & Heinz, 2001). Das Zusammentreffen von drei Symptomen (Dengue-Trias) ist charakteristisch:

- Fieber
- Ausschlag
- Kopf-, Gelenk-, Glieder- oder Muskelschmerzen.

Bei diesem klassischen Verlauf des Denguefiebers kommt es nur selten zu ernsthaften Komplikationen.

Die schwersten Formen der Denguevirus-Infektion sind die hämorrhagischen Formen DHF und DSS. Das DHF/DSS stellt in Südostasien eine der häufigsten

Ursachen für Krankheits- und Sterbefälle bei Kindern unter einem Jahr dar (Monath & Heinz, 1996). Obwohl es in Südostasien überwiegend bei kleinen Kindern auftritt, wird es in Mittel- und Südamerika in allen Altersgruppen beobachtet (da Fonseca & Fonseca, 2002).

Das DHF beginnt üblicherweise mit einem plötzlichen Fieberanstieg. Ferner treten hämorrhagische Manifestationen (positiver Tourniquet-Test, Petechien, gastrointestinale Blutungen), eine Hepatomegalie, eine Thrombozytopenie ($<100.000/\text{mm}^3$) und ein erhöhter Hämatokrit ($\geq 20\%$) als Zeichen der erhöhten Kapillardurchlässigkeit auf. Es kommt zum Plasmaaustritt in die Körperhöhlen (Aszites, pleurale Effusionen). Das DHF kann 3-6 Tage nach Beginn der Symptome in das DSS übergehen. Hierbei handelt es sich um eine Schocksymptomatik infolge der Hypovolämie mit kaltschweißiger Haut, Tachykardie und arterieller Hypotonie. Die Prognose hängt davon ab, ob der Schockzustand früh genug behandelt wird (WHO, 1997).

Die Replikation der Dengueviren findet in den Monozyten und Makrophagen des Lymphsystems, der Leber und der Lunge statt (Bhamarapravati, 1997). In den für Denguefieber typischen Hautläsionen konnte dagegen kein Virus detektiert werden. Vermutlich handelt es sich hierbei um eine immunvermittelte Reaktion.

Die Pathogenese des DHF und des DSS ist bisher nur unvollständig erforscht. Ein Grund dafür ist, dass ein geeignetes Tiermodell bisher fehlt. Mäuse und Affen lassen sich zwar infizieren, zeigen jedoch keine hämorrhagischen Symptome (Clarke, 2002). Die pathophysiologischen Veränderungen, die beim DHF und DSS auftreten, sind im Wesentlichen:

1. eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit und ein dadurch bedingter Plasmaverlust mit Hämokonzentration und Schock
2. eine Störung der Homöostasis mit Gerinnungsstörungen, Thrombozytopenie und Koagulopathie.

Die Schwere des Verlaufs einer Dengue-Infektion korreliert mit dem Immunstatus des Patienten: Eine Zweitinfektion mit bereits existierenden Dengue-Antikörpern durch eine vorangegangene Dengue-Infektion oder eine Infektion in Gegenwart mütterlicher Dengue-Antikörper in Säuglingen verläuft in der Regel schwerer als eine primäre Infektion (Halstead, 1988; Vaughn et al., 2000). Das Risiko eines schweren Krankheitsverlaufes ist bei einer Zweitinfektion 100fach höher als bei einer Primärinfektion (Vaughn DW et al., 2000). Über 90% der Fälle von DHF/DSS werden bei Personen beobachtet, die zuvor mit einem heterologen Denguevirus-Serotyp infiziert waren (Burke et al., 1988). Etwa 3% der sekundärinfizierten Patienten entwickeln DHF, im Unterschied dazu sind es weniger als 0,2% der primärinfizierten Personen.

Halstead schlug als immunpathologische Erklärung für das DHF/DSS den Mechanismus des „antibody-dependent-enhancement“ (ADE) vor. Es handelt sich dabei um eine erleichterte Virusaufnahme in die Monozyten und Makrophagen bei sekundärinfizierten Patienten. Er postulierte, dass sich in Gegenwart heterologer nichtneutralisierender Antikörper Komplexe zwischen den Antikörpern und den Viruspartikeln bilden. Monozyten und Makrophagen können diese Komplexe über ihre Fc γ -Rezeptoren aufnehmen und würden den Viren den Eintritt in die Zellen erleichtern. Eine verstärkte Replikation in diesen Zellen wäre die Folge (Halstead, 1988).

Rothman und Ennis haben ebenfalls ein Modell zur Immunpathogenese des DHF/DSS entwickelt. Sie beziehen in diesem Modell zusätzlich die synergistischen Effekte von γ -Interferon, Tumornekrosissfaktor α (TNF α) und aktivierten Komplementproteinen auf den Endothelzellen ein (Rothman & Ennis, 1999): Nach einer Dengueinfektion sind kreuzreaktive Antikörper im Serum sowie „memory“-T-Zellen im Patienten vorhanden. Bei einer Infektion mit einem weiteren Serotyp bilden sich mit den präexistierenden Antikörpern Virus-Antikörper-Komplexe. Sie führen zu einer verstärkten Infektion Fc γ -Rezeptor-tragender mononukleärer Zellen und zur Komplementaktivierung. Die erneute Gegenwart des Antigens aktiviert „memory“-CD4⁺ T-Lymphozyten, die dann proliferieren und

γ -Interferon produzieren. Das γ -Interferon verstärkt sowohl die Expression der Fc γ -Rezeptoren auf Monozyten als auch die Expression der HLA Klasse I und II-Moleküle. Letztere sind für die Erkennung der infizierten Monozyten durch cytotoxische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verantwortlich. In der Folge kommt es zur Freisetzung von Cytokinen oder zur Lyse der infizierten Zellen und Freisetzung von intrazellulären Enzymen und Aktivatoren. Die Schädigung der Endothelzellen, beispielsweise durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), könnte zum beobachteten Plasmaverlust beitragen (Lin et al., 2002).

Überdurchschnittlich häufig mit Fällen des DHF/DSS assoziiert sind besonders virulente Virusstämme, zum Beispiel ein Dengue 2-Serotyp aus Südostasien (Rico-Hesse et al., 1997; Vaughn et al., 2000). Dennoch können alle vier Dengue-Serotypen das DHF oder DSS auslösen.

Für Personen in hyperendemischen Gebieten, in denen zwei oder mehrere Dengue-Serotypen simultan zirkulieren, existiert aus mehreren Gründen ein erhöhtes DHF/DSS-Erkrankungsrisiko: Die Hyperendemie bedingt eine erhöhte Viruszirkulation und führt zu einem erhöhten Auftreten besonders virulenter Stämme. Gleichzeitig ist durch die Hyperendemie die Wahrscheinlichkeit einer Sekundärinfektion des Individuums und damit die Wahrscheinlichkeit eines Immunenancements erhöht.

1.3 Aufbau der Flaviviren

Flaviviren stellen sich elektronenmikroskopisch als sphärische Partikel mit einer Lipidhülle und einem Durchmesser von etwa 40-60 nm dar.

Abbildung 2 zeigt den Aufbau eines Flaviviruspartikels am Beispiel des TBE-Virus. Reife Viruspartikel enthalten das Core-Protein (C; 12 kDa), ein nichtglycosyliertes Membranprotein (M; 8 kDa) und ein üblicherweise glycosyliertes Envelope-Protein (E; 50-60 kDa) als Strukturproteine. Das C-Protein baut zusammen mit der viralen RNA das Nucleocapsid auf. Die Hüllproteine E und M sind Typ I-Membranproteine, die mit ihren C-terminalen Ankern in die Lipiddoppelschicht eingebettet sind. Die Nichtstrukturproteine sind an der viralen Replikation und der Polyproteinprozessierung beteiligt (Chang, 1997). Das Nichtstrukturprotein NS3 besitzt Protease- und Helikase-Aktivität, das Nichtstrukturprotein NS5 ist die RNA-abhängige RNA-Polymerase des Virus (Tan et al., 1996).

Das flavivirale Genom besteht aus einer einzelsträngigen, etwa 11 kb großen Plusstrang-RNA, die in ein ikosaedrisches Capsid eingelagert ist. Ein einziger offener Leserahmen codiert für einen Polyproteinvorläufer als primäres Translationsprodukt, das von zellulären und viralen Proteasen co- und posttranslational gespalten wird. Die drei Strukturproteine entstehen aus dem N-terminalen Bereich des Polyproteins und die sieben Nichtstrukturproteine aus dem verbleibenden Teil. Die Reihenfolge der Gene, die vom viralen Genom codiert werden, ist in Abbildung 3 dargestellt.

Die Infektion einer Zielzelle beginnt, indem sich die B-Domäne des viralen E-Proteins an ihren zellulären Rezeptor bindet. Für die meisten Flaviviren wurde bisher kein spezifischer Rezeptor identifiziert. Am „*attachment*“ der Dengueviren sind jedoch Heparansulfate beteiligt (Chen et al., 1997; Hilgard & Stockert, 2000). Die Aufnahme des Partikels geschieht endocytotisch, und Virushülle und endosomale Membran fusionieren bei saurem pH, um das Nucleocapsid freizusetzen (Heinz & Allison, 2001). Unmittelbar danach wird das virale Genom

translatiert. Es folgen die Polyproteinprozessierung, die Replikation und der Zusammenbau („assembly“) neuer Viruspartikel (Chang, 1997).

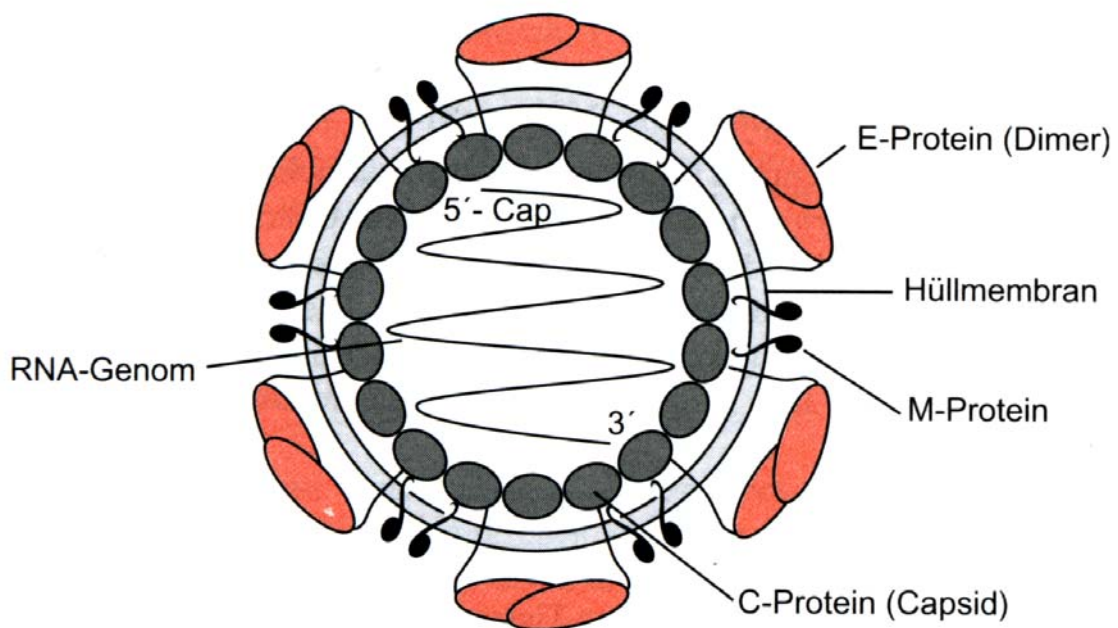


Abb. 2: Aufbau eines Flaviviruspartikels.

Abgebildet ist das TBE-Virus. Die Hüllmembran ist hellgrau dargestellt. In diese eingelagert ist das als Homodimer vorliegende E-Protein (rot) und das M-Protein (schwarz). Das ikosaedrische Capsid wird von den C-Proteinen (dunkelgrau) gebildet, an deren Innenseiten das RNA-Genom assoziiert ist. Abbildung entnommen aus Modrow und Falke: Molekulare Virologie, 1997.

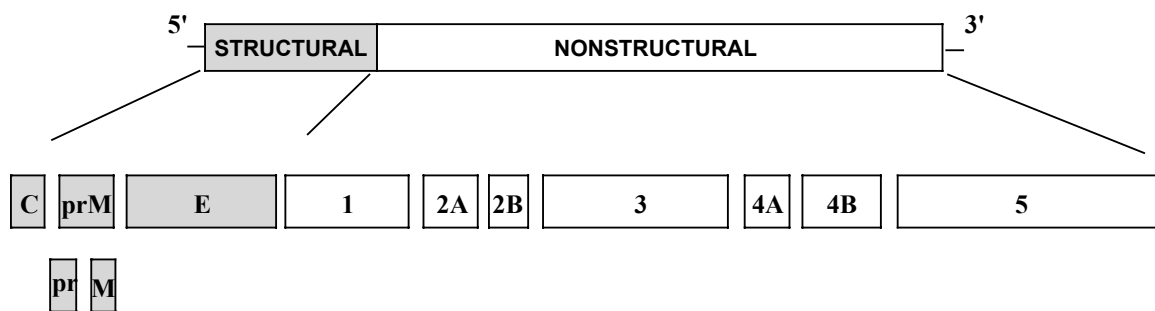


Abb. 3: Schematische Darstellung des flaviviralen Genoms.

Das Genom von ungefähr 11 kb Größe ist flankiert von zwei nichttranslatierten Regionen am 5'- und 3'- Ende. Es besteht aus einem einzigen offenen Leserahmen, der ein Polyprotein von ungefähr 3400 Aminosäuren codiert. Das Polyprotein wird in drei Strukturproteine (grau) und sieben Nichtstrukturproteine (weiß) gespalten.

C: Core-Protein;

prM: Prämembranprotein (Vorläufer);

M: Membranprotein;

E: Envelope-Protein;

1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B, 5: Nichtstrukturproteine NS1 bis NS5.

1.4 Die antigene Struktur des E-Proteins

Das E-Protein ist das immunologisch wichtigste Antigen der Flaviviren. Es induziert neutralisierende Antikörper und die T-Zell-Immunantwort und ist daher Hauptziel der protektiven Immunantwort in infizierten Vertebraten (Leclerc et al., 1993). Im Verlauf einer Flavivirus-Infektion werden allerdings auch Antikörper gegen NS1 gefunden (Kuno et al., 1990). Die anderen Nichtstrukturproteine spielen immunologisch hauptsächlich eine Rolle als Ziel für cytotoxische T-Zellen (Rothman et al., 1993).

Das E-Protein vermittelt außerdem die Virusbindung an den zellulären Rezeptor und die Membranfusion mit der Zielzelle (Randolph et al., 1990). Es ist ferner verantwortlich für die Hämagglutination von Gänseerythrocyten (Schlesinger, 1977).

Die Röntgenstrukturaufklärung eines tryptisch verdauten Fragments des E-Proteins des TBE-Virus (Heinz et al., 1991; Rey et al., 1995) trug wesentlich zum Verständnis der räumlichen Proteinstruktur bei. Das E-Protein bildet ein „*head-to-tail*“-Dimer von 170 Å Länge, das sich gekrümmt dem Viruspartikel anlagert. Jedes monomere E-Protein besteht aus drei Domänen, die als Domäne I, II und III bezeichnet werden und die den serologisch definierten Domänen A bis C (Mason et al., 1990; Roehrig et al., 1990) entsprechen. Domäne I entspricht der Antigendomäne C, Domäne II der Antigendomäne A und Domäne III der Antigendomäne B.

Antigendomäne A setzt sich aus zwei langen Schleifen zusammen, die von der Domäne C ausgehen.

Die serologisch definierte B-Domäne ist etwa 100 Aminosäuren groß und besteht aus sieben antiparallelen β -Strängen. Gemeinsam mit dem hydrophoben Membrananker stellt sie den C-Terminus des E-Proteins dar.

Eine flexible Struktur verbindet die B-Domäne mit der zentralen Antigenomäne C, die aus acht fassähnlich zusammengesetzten β -Strängen aufgebaut ist. Bei den Dengue-Viren enthält Domäne C auch die Asparagin-gebundenen Zuckerstrukturen.

Die Domänen A und C des dimerisierten E-Proteins bilden den 17 nm langen Teil, der flach auf der Virusoberfläche aufliegt. Die Epitope dieser Domänen liegen aus sterischen Gründen meist auf der membranabgewandten Seite (Rey et al., 1995). Abbildung 4 zeigt die räumliche Anordnung der Domänen im Bändermodell.

Das E-Protein der Flaviviren trägt Epitope, die allen Flaviviren gemeinsam sind (gruppenspezifische Epitope), Epitope, die sich innerhalb eines Serokomplexes finden (serokomplex-spezifische Epitope) und Epitope, die spezifisch für ein einzelnes Virus der Familie sind (typenspezifische Epitope) (Gritsun et al., 1995). Außerdem existieren innerhalb der vier Denguevirus-Serotypen subkomplex spezifische Epitope: Hierbei handelt es sich um Epitope, die den Serotypen 1 und 4 bzw. den Serotypen 2 und 3 gemeinsam sind (Henchal et al., 1982).

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der verschiedenen E-Proteine innerhalb der Flaviviren, zeigen sich Bereiche großer Homologie, die die breite Kreuzreaktivität der Flaviviren untereinander bedingen. Nowak und Wengler zeigten, dass alle 12 Cysteinreste im E-Protein streng konserviert sind und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden (Nowak & Wengler, 1987). Dennoch existieren Bereiche, beispielsweise Teile der B-Domäne, die divergent sind (Chambers et al., 1990; Heinz et al., 1990).

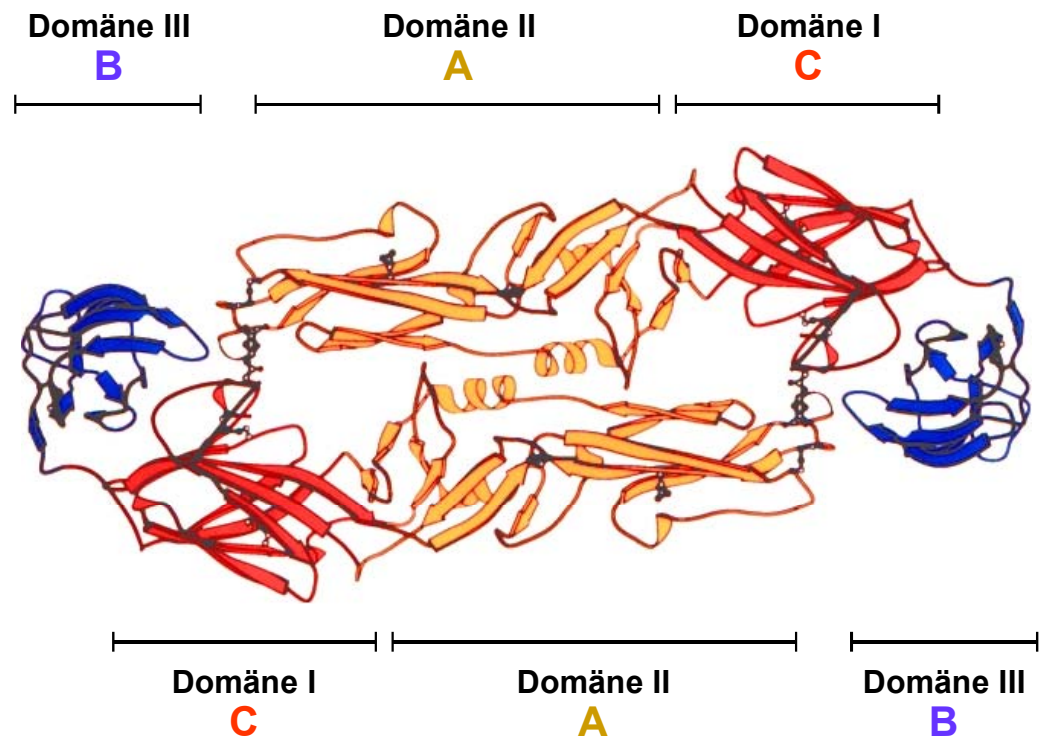


Abb. 4: Röntgenstrukturmodell des E-Proteinfragments.

TBE-Viren wurden mit Trypsin behandelt, woraus ein dimeres Fragment (Reste 1-395) des E-Proteins ohne den Membrananker resultierte. Die Röntgenstruktur des Fragments wurde bei einer Auflösung von 2 Å untersucht. Die drei Domänen des Proteins sind farblich unterschiedlich dargestellt: Domäne I (C) rot; Domäne II (A) gelb; Domäne III (B) blau. Die β -Stränge in der Protein-Sekundärstruktur sind als Bänder mit Pfeilen dargestellt, α -Helices sind durch gedrehte Bänder und verbindende Bereiche durch dünne Schläuche symbolisiert. Abbildung aus Rey et al., 1995.

1.5 Die Labordiagnose einer Dengueinfektion

Die Labordiagnose einer Dengue-Infektion beruht entweder auf der Virusisolation, der Detektion von Dengue-spezifischen-Antikörpern im Patientenserum oder auf dem direkten Nachweis der Virusnukleinsäure mit Hilfe der RT-PCR.

Für die Virusisolation werden Moskito- und Säugerzelllinien (C6/36-Zellen, LLC-MK₂-Zellen) eingesetzt. Zur Anzucht wird außerdem die Technik der intracerebralen Inokulation von ein bis drei Tage alten Babymäusen oder die Inokulation von Mücken (*Aedes* oder *Toxorhynchites*) verwendet (Gubler, 1998).

In fast allen serologischen Testsystemen, wie beispielsweise dem Hämagglutinationshemmtest, dem indirekten IgG-ELISA oder dem Komplementbindungsassay manifestiert sich eine gemeinsame Problematik: Die immunologische Verwandtschaft der Flaviviren führt zur Kreuzreaktivität der einzelnen Vertreter untereinander. In der herkömmlichen Serologie werden sowohl Flavivirus-gruppenspezifische als auch Dengue-Serotyp-spezifische Antikörper nachgewiesen.

Stehen zwei zeitlich aufeinander folgende Seren eines Patienten zur Verfügung, eines aus der akuten Phase und eines aus der Rekonvaleszenzphase, so darf ein mindestens vierfacher Anstieg im IgG-Antikörper-Titer als Beweis für eine Dengue-Infektion gewertet werden. Gubler weist darauf hin, dass als Antigene dabei nicht nur die vier Dengueviren, sondern auch mindestens ein weiteres Flavivirus, z. B. das Gelbfiebervirus, sowie ein Nicht-Flavivirus, z.B. Chikungunya-Virus, und eine nichtinfizierte Zellkulturkontrolle in die Diagnostik einbezogen werden sollten (Gubler, 1998).

Während der akuten Erkrankungsphase lassen sich durch einen IgM-capture-ELISA (MAC-ELISA) auch IgM-Antikörper gegen Dengueviren nachweisen. Sie treten in 90% der primärinfizierten Patienten drei bis fünf Tage nach dem Erkrankungsbeginn auf (Bundo & Igarashi, 1985; Innis et al., 1989). Die IgM-

Antikörper sind jedoch nur zwei bis drei Monate nachweisbar und werden bei sekundärinfizierten Patienten nicht oder erst im späteren Erkrankungsverlauf gefunden.

Ein Problem besteht vor allem in der Unterscheidung der vier Denguevirus-Serotypen voneinander. Die vier Dengue-Serotypen besitzen eine Homologie von 62-77% auf Aminosäureebene. Dabei haben die Serotypen Dengue 1 und Dengue 3 (77%) die größte Ähnlichkeit, gefolgt von den Serotypen Dengue 2 (69%) und Dengue 4 (62%) (Prozentangaben Homologie bezogen auf Dengue 1, Monath & Heinz, 1996). Mit den bisher genannten serologischen Methoden ist eine Unterscheidung der verschiedenen Serotypen nicht möglich.

Zur Zeit kann ein Serum hinsichtlich des Denguevirus-Typs mit serologischen Methoden nur durch den Neutralisationstest (NT) charakterisiert werden. Verglichen mit den anderen Routinetests für Dengueviren besitzt der NT die größte Sensitivität und Spezifität (Russel & Nisalak, 1967). Neutralisierende Antikörper erreichen etwa am 5. bis 6. Erkrankungstag messbare Titer und persistieren bis zu 48 Jahre (Halstead, 1974). Für sekundärinfizierte Patienten wurde festgestellt, dass der Neutralisationstiter für den Denguevirus-Serotyp der Erstinfektion häufig höher war als der Neutralisationstiter für den Denguevirus-Serotyp der aktuellen Sekundärinfektion (sogenannte „*original antigenic sin*“ Halstead et al., 1983). In sekundär oder tertiär infizierten Dengue-Patienten kann daher selbst der Neutralisationstest nicht mehr verlässlich den Serotyp bestimmen (Kuno et al., 1993).

Eine diagnostische Alternative, auch zur Unterscheidung der vier Denguevirus-Serotypen voneinander, stellt die RT-PCR dar (Deubel et al., 1990; Lanciotti et al., 1992; Laue et al., 1999). Sie eignet sich jedoch nur während der Virämie, die im Schnitt bis fünf Tage nach Beginn der Symptome besteht. Mit Auftreten der ersten neutralisierenden Antikörper wird im Blut zirkulierendes Virus rasch eliminiert (Guzman & Kouri, 1996). Aus den Tropen zurückkehrende Touristen werden jedoch oft zu einem so späten Zeitpunkt in der Klinik vorstellig, dass ein Nachweis

viraler RNA im Serum nicht mehr möglich ist. Für seroepidemiologische Studien, in denen oft nur Rekonvaleszentenserum zur Verfügung steht, ist die RT-PCR ebenfalls nicht geeignet.

Da IgG-Antikörper gegen Dengueviren lange persistieren, ist eine auf Antikörpern basierende Nachweismethode in diesen Fällen ein geeigneteres Instrument für die Diagnose einer Dengueinfektion. Es besteht die Notwendigkeit, einen schnell durchführbaren serologischen Test zur Unterscheidung der vier Dengue-Serotypen zu etablieren.

Winkler et al. konnten zeigen, dass die B-Domäne des E-Proteins der Dengueviren eine sich unabhängig faltende Proteindomäne bildet, die als Trypsin-resistentes Fragment aus gereinigten Viren isoliert werden kann (Winkler et al., 1987). Die B-Domäne kann ebenfalls bakteriell exprimiert werden (Mason et al., 1989). Sie wird in beiden Fällen durch die vorhandene Disulfidbrücke stabilisiert.

Die Arbeitsgruppe von Simmons zeigte für die B-Domäne, dass in diesem Bereich die typenspezifischen Epitope zu finden sind. Sie waren in der Lage, mit rekombinant exprimierten trpE-Fusionsproteinen ein Dengue-spezifisches ELISA-System aufzubauen (Simmons et al., 1998). Außerdem werden gegen die B-Domäne neutralisierende Antikörper gebildet: Fusionsproteine vom maltosebindenden Protein und den Dengue-B-Domänen wurden mit Erfolg für Vakzine-Studien in Mäusen verwendet (Simmons et al., 2001).

Aufgrund dieser Eigenschaften stellt die B-Domäne des E-Proteins einen idealen Ansatzpunkt für ein Testsystem zur Unterscheidung der vier Serotypen der Dengueviren dar.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Immunoblot-System mit den rekombinant exprimierten B-Domänen der vier Dengue-Serotypen aufgebaut werden.

Dazu sollten die B-Domänen der Dengueviren 1-4, sowie die von West Nil-Virus und Japanischem Enzephalitis-Virus in Expressionsvektoren kloniert werden. Die rekombinanten Antigene sollten als „His-tag“-Proteine in *E. coli* exprimiert und für den diagnostischen Einsatz mit der Metall-Chelat-Chromatographie aufgereinigt werden.

Frühe Seren verschiedener Patientenkollektive waren durch 5'-Nuclease-PCR charakterisiert worden. An ihren Folgeseren sollte überprüft werden, ob mit den B-Domänen-Antigenen eine Unterscheidung der Dengue-Serotypen in Patientenseren möglich ist.

Schließlich sollte die Sensitivität und die Spezifität der Methode ermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Zelllinien

Vero-E6-Zellen

(von *Cercopithecus aetiops*, aus der Niere) (ATCC CCL81)

C6/36

(von *Aedes albopictus*, aus der Speicheldrüse) (ATCC CRL1660)

Viren

Dengue 1 Stamm Western Pacific

SwissProt P17763

Genbank Accession-Nr. U88535

Dengue 2 Stamm New Guinea C

SwissProt P14340

Genbank-Accession-Nr. AF038403

Dengue 3 Stamm H87

SwissProt AAA99437

Genbank-Accession-Nr. M93130

Dengue 4 Stamm Thailand 1978

SwissProt AAB70692

Genbank-Accession-Nr. U18441

West Nil-Virus Stamm Wengler

SwissProt P06935

Genbank-Accession-Nr. M12294

Japanisches Enzephalitis-Virus Stamm Nakayama

SwissProt P14403

als inaktivierter Impfstoff (Biken, Osaka, Japan)

Genbank-Accession-Nr. U3694

Patientenseren

Seren von vier verschiedenen Patientenkollektiven wurden im Immunoblot eingesetzt:

1. Seren europäischer Touristen, die mit akuter fieberhafter Erkrankung aus Dengue-Endemiegebieten zurückkehrten. Ihre Serumproben wurden freundlicherweise von der diagnostischen Abteilung der Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts zur Verfügung gestellt. Die IgM-Titer wurden mit einem μ -capture-

ELISA (PanBio, Brisbane, Australia), die IgG-Titer mit der indirekten Immunfluoreszenz (IFA) nach der Methode von Weller und Coons (Weller and Coons, 1954) bestimmt. Zusätzlich wurden Serumproben von vier weiteren Dengue-infizierten Patienten freundlicherweise von Dr. T. Niedrig, Robert-Koch-Institut, Berlin zur Verfügung gestellt. IgM- und IgG-Titer der Seren wurden analog wie oben bestimmt. In den akuten Serumproben dieser 41 Patienten wurde der Dengue-Serotyp mittels 5'-Nuclease-PCR (Laue et al., 1999) ermittelt.

2. S. Schilling sammelte während einer Endemie in Hue, PDR Vietnam im Jahr 2000 Patientenseren. Die Patienten zeigten klinisch die Symptome einer akuten Dengueinfektion. Der Denguevirus-Serotyp der Patienten wurde mit der 5'-Nuclease-PCR bestimmt. Acht dieser Patienten wurden im Immunoblot getestet.

3. Vier West-Nil-Positivseren wurden freundlicherweise von Dr. H. G. Zeller, Institut Pasteur, Paris zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um durch RT-PCR und Sequenzierung gesicherte West-Nil-Infektionen (Berthet, 1997).

4. Als negative Kontrollseren dienten zum einen Seren von 67 gesunden Personen ohne Dengue-Antikörper, zum anderen 30 Seren von Gelbfieber-Impflingen.

Antikörper

Für die Immunfluoreszenz:

Ziege anti-human IgG (H+L) FITC-markiert (Sifin, Berlin)

Für die Versuche zur Reaktivität der Antigene:

WN-spezifischer monoklonaler Antikörper (mAB) 15R4 (abteilungseigen)

Dengue 2-typenspezifischer

monoklonaler Antikörper 3H5-1 (ATCC HB-46; Gentry et al., 1982; Henchal et al., 1985)

| | |
|--|--|
| Dengue 2-typenspezifischer monoklonaler Antikörper 6B6 | (Gentry et al., 1982; Henchal et al., 1985) |
| Dengue-subkomplexspezifischer monoklonaler Antikörper 2H3 | (Gentry et al., 1982; Henchal et al., 1985) |
| Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L) Meerrettich-Peroxidase-markiert | (Promega, Mannheim) |

Die Dengue 2-typenspezifischen und subkomplexspezifischen monoklonalen Antikörper wurden freundlicherweise von Dr. T. Niedrig, Robert-Koch-Institut Berlin (monoklonaler Antikörper 3H5-1) und Prof. Dr. V. Deubel, Institut Pasteur, Paris (monoklonale Antikörper 2H3 und 6B6) zur Verfügung gestellt.

| | |
|---|---------------------|
| Für den Immunoblot mit Patientenseren: Kaninchen-anti-Human-IgG (H+L) Meerrettich-Peroxidase-markiert | (Mikrogen, München) |
|---|---------------------|

Bakterienstämme

| | |
|--|---------------------|
| E. coli JM109: endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17(r _k - m _{k+}),relA1, supE44, λ ⁻ , Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ^q ZΔM15] | (Promega, Mannheim) |
| E. coli BL21 DE3 pLysS: F', ompT, hsdS _B (r _B -m _B -), dcm, gal, (DE3), pLysS, Cm ^R | (Promega, Mannheim) |

Enzyme

| | |
|--|-----------------------------------|
| Superscript II Rnase H ⁻ Reverse Transkriptase | (Life Technologies, Karlsruhe) |
| Platinum Taq DNA Polymerase | (Life Technologies, Karlsruhe) |
| Restriktionsendonucleasen BamHI, EcoRI, HindIII, SacI, XhoI | (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) |
| T4-DNA-Ligase | (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) |
| Ribonuklease Inhibitor | (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen) |

Plasmide

Die codierenden Bereiche der flaviviralen B-Domänen wurden in zwei verschiedene Vektoren kloniert. Beide Vektoren sowie ihre Klonierungsstellen sind in den Abbildungen 5 und 6 schematisch dargestellt.

Im Fall des Dengue 1-, Dengue 2-, Dengue 3- und Dengue 4-Virus und im Fall des Japanischen Enzephalitis-Virus handelte es sich um den low copy-Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden). pQE30 gehört zur pDS-Familie von Plasmiden. Die Expression in diesem System beruht auf dem Phagen T5-Promotor Transkriptions-Translationssystem. Am 5'-Ende des Leserahmens befinden sich sechs Codons (CAT bzw. CAC), die für ein 6er „His-Tag“ am N-terminalen Ende des exprimierten Proteins codieren und dadurch die Proteinaufreinigung mittels Metall-Chelat-Chromatographie ermöglichen (Abb. 5).

Die B-Domänen-Region des West-Nil-Virus wurde in den Expressionsvektor pET22b (Novagen, Madison, USA) kloniert. Die Expression der Zielgene in diesem Vektor wird durch die T7-Transkriptions- und Translationssignale kontrolliert. Die Wirtszelle *E. coli* BL21(DE3)pLysS stellt dabei die T7-RNA Polymerase zur Verfügung. pET22b trägt N-terminal eine pelB-Signalsequenz für eine periplasmatische Lokalisation des Expressionsproduktes. Diese Signalsequenz wird posttranslational durch eine Signalprotease abgespalten. C-terminal trägt der Vektor ein aus sechs Histidinen bestehendes „His-tag“ (Abb. 6).

Verwendete Reagentien

| | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| QIAquick Gel Extraction Kit | (Qiagen, Hilden) |
| QIAquick PCR Purification Kit | (Qiagen, Hilden) |
| NucleoSpin Plasmid Kit | (Macherey-Nagel, Düren) |
| Rneasy Mini Kit | (Qiagen, Hilden) |
| ABI PRISM Dye Terminator | |
| Cycle Sequencing Ready Reaction Kit | (Applied Biosystems, Weiterstadt) |

Molekulargewichtsstandards

| | |
|---|--------------------------------|
| Nukleinsäuremarker: 1 kb DNA Leiter | (MBI, Vilnius, Litauen) |
| 100 bp DNA Leiter | (MBI, Vilnius, Litauen) |
| Proteinmarker: Benchmark Protein Leiter | (Life Technologies, Karlsruhe) |

Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für die Reverse Transkription, für die PCR und für die Sequenzierung wurden von TIB MolBiol, Berlin bezogen. Sie sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Chemikalien

| | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung | (Roth, Karlsruhe) |
| Agarose | (Gibco BRL, Eggenstein) |
| Ammoniumpersulfat | (Sigma, Deisenhofen) |
| Ampicillin | (ICN, Eschwege) |
| Bacto-Agar | (Becton-Dickinson, Heidelberg) |
| Bacto-Trypton | (Becton-Dickinson, Heidelberg) |
| Bromphenolblau | (Merck, Darmstadt) |
| Coomassie Brilliant Blue R250 | (Serva, Heidelberg) |
| Diethylpyrocarbonat | (Sigma, Deisenhofen) |
| Dithiotreitol | (Sigma, Deisenhofen) |
| Essigsäure | (Roth, Karlsruhe) |
| Ethanol | (Merck, Darmstadt) |
| Ethidiumbromid | (Merck, Darmstadt) |

| | |
|---|--------------------------------|
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | (Boehringer, Mannheim) |
| Fetales Kälberserum | (Pan Biotech, Aidenbach) |
| 200 mM L-Glutaminlösung | (Life Technologies, Karlsruhe) |
| Glycerol | (Merck ,Darmstadt) |
| Glycin | (ICN, Eschwege) |
| Hefeextrakt | (Becton-Dickinson, Heidelberg) |
| Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) | (MBI Fermentas, Vilnius) |
| β -Mercaptoethanol | (Merck, Darmstadt) |
| Methanol | (Roth, Karlsruhe) |
| Natriumacetat-Trihydrat | (Roth, Karlsruhe) |
| Natrium-Dodecylsulfat (SDS) | (Serva, Heidelberg) |
| Nonidet-P40 | (Merck, Darmstadt) |
| Penicillin | (ICN, Eschwege) |
| Rinderserumalbumin (BSA) | (Serva, Heidelberg) |
| Rotiphorese Gel 30 | (Roth, Karlsruhe) |
| Serva Blue G | (Serva, Heidelberg) |
| Streptomycin | (ICN, Eschwege) |
| N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) | (Biomol, Hamburg) |
| TMB-Substrat | (Mikrogen, München) |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan | (Merck, Darmstadt) |
| Triton-X-100 | (Sigma, Deisenhofen) |
| Trypsin-EDTA-Lösung | (Life Technologies, Karlsruhe) |
| Tween 20 | (Serva, Heidelberg) |
| Urea | (ICN, Eschwege) |

Medium für die Zellkultur

Leibovitz L15 (Life Technologies, Karlsruhe)

Das Medium wurde mit fetalem Kälberserum (Pan Biotech, Aidenbach) zu 5% Endkonzentration angesetzt.

Medium für die Bakterienkultur

LB-Medium: 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl

Das Medium wurde mit H₂O dest. angesetzt. Für festes Medium (LB-Agar) wurde 1,5% Bacto-Agar zugesetzt. Im Anschluß wurde autoklaviert wie unter 2.3.1 beschrieben. Antibiotika entsprechend den üblichen Endkonzentrationen wurden nach dem Abkühlen der Medien zugegeben.

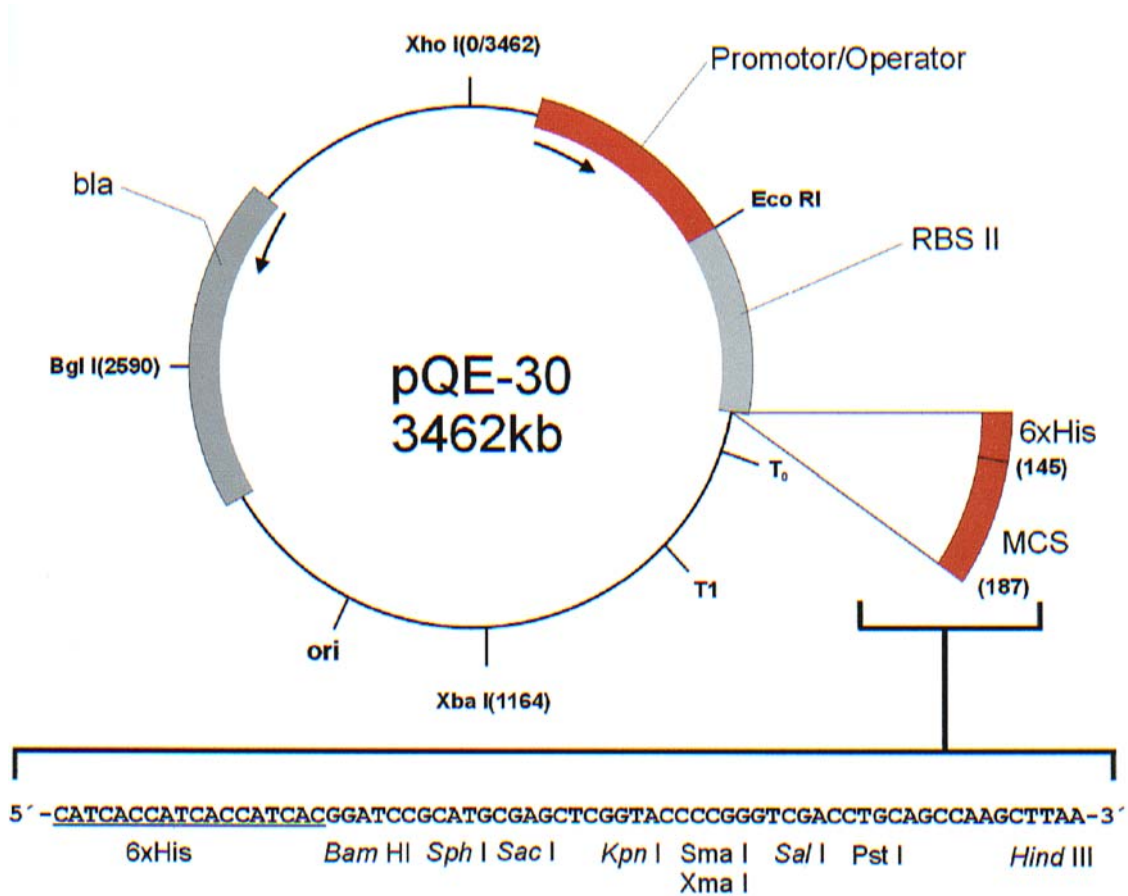


Abb. 5: Der Expressionsvektor pQE30.

Der Vektor trägt ein N-terminales „His-tag“. Die Leserichtung der aktiven Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet.

6xHis: „His-tag“ aus sechs Histidinen;

*Bam*HI, *Bgl*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I,

*Sac*I, *Sma*I, *Sph*I, *Xba*I, *Xho*I, *Xma*I: Restriktionsschnittstellen;

bla: Gen für β-Lactamase;

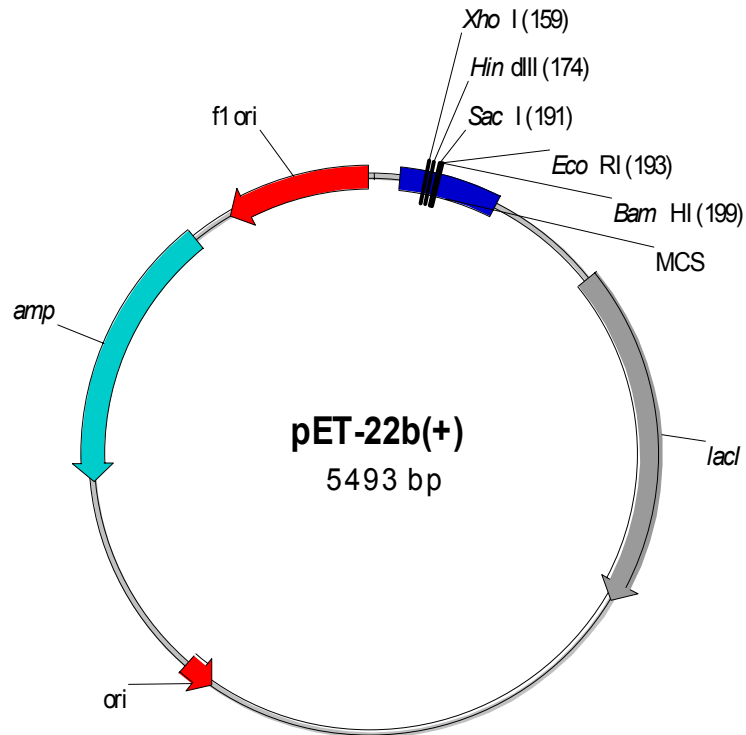
MCS: Klonierungsstelle (*multiple cloning site*);

RBSII: ribosomale Bindungsstelle;

ori: Replikationsstart (*origin*);

*t*₀, T1: Terminatoren.

Die Abbildung ist modifiziert nach dem „QiaExpressionist“-Handbuch, Qiagen, Hilden.



pET22b Klonierungsbereich

```

AGATCTCGATCCC GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC
BgIII          T7-Promotor          lac-Operator
CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATACCTGCTGCCGAC
XbaI          rbs          NdeI    pelB leader
CGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCCGCCGCGATGGCCATGGATATCGGAATTAAT
                                     ↑Signalpeptidase
TCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC GGCCGCAC TCGAGCACCACCACCACC
BamHI EcoRI SacI    SalI  HindIII  NotI    XhoI    6er His tag
ACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCA
Stop
ATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTTG
T7-Terminator
    
```

Abb. 6: Der Expressionsvektor pET22b.

Der Vektor trägt N-terminal ein pelB-leader-Peptid und C-terminal ein „His-tag“ aus sechs Histidinen (beide Sequenzen rot unterstrichen). Der im Vektor blau gezeichnete Bereich entspricht dem unter dem Vektor gezeigten Klonierungsbereich (MCS).

ori, f1 ori: Replikationsstarts; *lac I*: *lac I*-Gen für Expression des lac-Repressors; *amp*: Ampicillin-Resistenzgen; rbs: ribosomale Bindungsstelle; *BgIII*, *XbaI*, *NdeI*, *BamHI*, *EcoRI*, *SacI*, *SalI*, *HindIII*, *NotI*, *XhoI*: Restriktionsschnittstellen; ↑Signalpeptidase: Schnittstelle der Signalpeptidase.

Tab. 1: Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer.

| Verwendung | Richtung | Sequenz des Oligonukleotids, Restriktionsschnittstelle |
|---|-----------|---|
| Reverse Transkription | - | Random Hexamer Primer (N ₆) |
| Klonierungsprimer für Dengue 1 | sense | 5'-ACGG GATCCGTAATGTGCACAGGGTCATTC-3' * |
| | antisense | 5'-ATGGAGCT CACTGCTTCCCTTCTTGAACCA-3' Sacl |
| Klonierungsprimer für Dengue 2 | sense | 5'-ACGG GATCCTCATACTCTATGTGCACAGGA-3' BamHI |
| | antisense | 5'-ATGA AGCTTGCCGATAGAACTTCCTTTCTT-3' HindIII |
| Klonierungsprimer für Dengue 3 | sense | 5'-ACGG GATCCATGAGCTATGCAATGTGCTTG-3' BamHI |
| | antisense | 5'-ATGA AGCTTTTCCCAATCGAGCTTCCCTT-3' HindIII |
| Klonierungsprimer für Dengue 4 | sense | 5'-ACGG GATCCTCATACACGATGTGCTCAGGA-3' BamHI |
| | antisense | 5'-ATGA AGCTTAATGGAGCTCCCTTTCTGAA-3' HindIII |
| Klonierungsprimer für West-Nil | sense | 5'-CCCG AATTCGACAACATATGGA-3' EcoRI |
| | antisense | 5'-CCCC TCGAGAGATTTGTGCCA-3' XhoI |
| Klonierungsprimer für Japanische Enzephalitis | sense | 5'-ACGG GATCCATGTGTACAGAAAATTCTCGTTC-3' BamHI |
| | antisense | 5'-ATGA AGCTTCCAATGGTGGTTGATCTGCTT-3' HindIII |
| Sequenzierprimer für Vektor pET22b | sense | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (T7-Promoter-Primer) |
| | antisense | 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3' (T7-Terminator-Primer) |
| Sequenzierprimer für Vektor pQE30 | sense | 5'-CCCGAAAAGTGCCACCTG-3' |
| | antisense | 5'-GGTCATTACTGGAGTCTTG-3' |

* Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme sind fett hervorgehoben. Die Schnittstelle innerhalb der jeweiligen Erkennungssequenz wird durch einen senkrechten Strich symbolisiert.

2.2 Methoden für die Zellkultur

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Adherent wachsende Vero-E6-Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen (Nunc, Life Technologies, Karlsruhe) in Leibovitz L15-Medium mit 5% FKS und 1% Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die Wachstumskontrolle erfolgte unter dem Durchlichtmikroskop. Die Zellen wurden alle drei bis fünf Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:5 geteilt. Dazu wurden sie kurz mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Untergrund gelöst und in Zellkulturmedium suspendiert. Sämtliche Arbeiten mit Zellkulturen und Zellkulturmedien wurden mit sterilen Lösungen und Pipetten an einer Sterilarbeitsbank durchgeführt.

PBS: 1,37 M NaCl
100 mM Na₂HPO₄
26,8 mM KCl
17,6 mM KH₂PO₄

Leibovitz L15-Medium mit 5% FKS und 1% Glutamin

2.2.2 Infektion von Zellen

Vero-E6-Zellkulturen, die in 75 cm²-Kulturflaschen zu ca. 80% konfluent gewachsen waren, wurden mit 200-400 µl Flavivirus-infiziertem Kulturüberstand angeimpft. Die infizierten Zellkulturen wurden alle zwei Tage lichtmikroskopisch beobachtet und im indirekten Immunfluoreszenztest auf den Status ihrer Infektion getestet. Bei einer Infektionsrate von über 60% wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgeschabt und für 10 min. bei 1000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde für die spätere Infektion weiterer Kulturen bei -70°C eingefroren. Das Zellsediment wurde für die Gesamt-RNA-

Präparation (2.3.6) verwendet oder für die Präparation von Ausstrichen nach 2.2.3.

Alle Arbeiten mit infizierten Zellen und Zellkulturüberständen wurden in einem Labor der biologischen Sicherheitsstufe 3 (L3) durchgeführt.

2.2.3 Präparation von Zellausstrichen

Das Zellsediment einer 250 ml Kulturflasche wurde mit 40 ml PBS gewaschen, abgeschabt, in 500 µl PBS resuspendiert und auf 12-Feld-Objektträgern (IFT-Objektträger, Fa. Franke, Hamburg) ausgestrichen. Pro Feld wurden dabei 25 µl Zellsuspension aufpipettiert und wieder abgezogen, so dass ein dünner Zellfilm auf dem Objektträger verblieb. Nach dem Trocknen des Films für 10 min. bei RT wurden die Zellen durch Inkubation der Objektträger für 20 min. in -20°C kaltem Aceton fixiert. Die trockenen Ausstriche wurden bis zu ihrer Verwendung im indirekten Immunfluoreszenztest (2.2.4) bei -20°C gelagert.

2.2.4 Indirekter Immunfluoreszenztest (Weller & Coons, 1954)

In den zu testenden Patientenseren wurden IgG-Antikörper mit dem indirekten Immunfluoreszenztest (IFA, Weller & Coons, 1954) bestimmt.

Für den IFA wurden auf jedes Feld der nach 2.2.3 vorbereiteten Objektträger 20 µl des seriell in PBS verdünnten Serums aufgebracht. Die Objektträger wurden 1 Std. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3 x 10 min. in PBS gewaschen. Zur Detektion spezifisch gebundener Antikörper wurde je 20 µl eines 1:500 in PBS verdünnten Anti-human-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Konjugates (Sifin, Berlin) aufgetragen und erneut 30 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit einem Deckglas versehen und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) betrachtet.

2.3 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

2.3.1 Sterilisieren von Lösungen und Geräten

Lösungen, Medien, Pipettenspitzen, Eppendorfgefäße und Glasgeräte wurden 20-40 min. bei 121°C und 1,5 bar autoklaviert. Hitzeinstabile Lösungen wie Antibiotika wurden sterilfiltriert.

2.3.2 Lagerung von Bakterien

Zur Isolierung von bakteriellen Einzelkolonien wurden Zellen einer Flüssigkultur in verschiedenen Verdünnungsstufen durch Ausstreichen auf einer Agarplatte vereinzelt. Die Kolonien wuchsen über Nacht (ü. N.) bei 37°C im Brutschrank. Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurden die Agar-Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert. Für eine dauerhafte Lagerung wurden Glycerolstocks (ü. N.-Kultur in LB-Medium, anschließend Zugabe von 25% Glycerol) von bakteriellen Einzelkolonien angelegt und bei -70°C gelagert.

LB-Medium: 10 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g NaCl

LB-Agar: Wie LB-Medium + 15 g Bacto-Agar

2.3.3 Präparation kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien sind in der Lage, fremde DNA aufzunehmen. Die in dieser Arbeit verwendeten E. coli-Stämme wurden dazu mit zweiwertigen Kationen behandelt.

Aus einer Einzelkolonie wurde eine ü. N.-Kultur des Bakterienstammes angezogen. 70 ml LB-Medium wurde mit 500 µl der ü. N.-Kultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₅₆₀ von 0,4 im Schüttelinkubator bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 8 min. bei 4°C und 1000 x g abzentrifugiert. Alle anschließenden Arbeiten erfolgten auf Eis und mit vorgekühlten Lösungen und Gefäßen.

Die Bakterien wurden in 21 ml frisch angesetzter 70 mM CaCl₂/20 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und 30 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min., 4°C und 1000 x g) wurden die Bakterien in 7 ml 70 mM CaCl₂/20 mM MgSO₄-Lösung aufgenommen, erneut 30 min. auf Eis inkubiert und zu je 0,4 ml unter Zugabe von 0,1 ml Glycerol aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Um zu überprüfen, ob die Transformationseffizienz der Zellen den Anforderungen genügt, wurde jeweils eine Testtransformation mit dem Vektor pUC19 (1 µg/µl) nach Protokoll 2.3.4 durchgeführt.

70 mM CaCl₂/20 mM MgSO₄-Lösung

2.3.4 Transformation von E. coli

Ein Aliquot kompetente Zellen wurde auf Eis aufgetaut, 2-3 µl des Ligationsansatzes wurden zupipettiert, vorsichtig gemischt und dann 30 min. auf Eis inkubiert. Danach wurde 2 min. bei 42°C und 2 min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wuchsen die Zellen 1 Stunde im Brutschrank. Je nach der zu erwartenden Transformationsrate wurden dann Aliquots von 50-100 µl auf LB-Amp-Platten plattiert, oder der komplette Ansatz bei 1000 x g 5 min. sedimentiert, das Medium größtenteils abgegossen, das Sediment im Rest des Mediums resuspendiert und plattiert.

Um Kontaminationen durch andere Plasmide auszuschließen, diente bei jeder Transformation ein Aliquot kompetenter Zellen, zu denen H₂O dest. statt des Ligationsansatzes pipettiert wurde, als Negativkontrolle. Außerdem wurde jeweils

ein Aliquot der Zellen mit 1 µl verdautem Vektor transformiert, um einen gegebenenfalls unvollständigen Verdau des Vektors zu erkennen und den daraus resultierenden Hintergrund falsch positiver Kolonien abzuschätzen.

LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin

2.3.5 Bakterienanzucht und Induktion

10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurde aus einem Glycerolstock inokuliert und ü. N. bei 37°C im Schüttler geschüttelt. 400 ml frisches LB-Medium wurde mit 5-10 ml dieser ü. N. Kultur angeimpft und bis zu einer OD₅₆₀ von 0,6 bei 37°C im Schüttler herangezogen (ca. 2,5-3 h). Die Induktion der Bakterien erfolgte mit IPTG in einer Endkonzentration von 2 mM für 2-3 h bei 37°C oder ü. N. bei RT. Abschließend wurden die Zellen 10 min. bei 2000 x g, 4°C abzentrifugiert und das Bakteriensediment bis zur Proteinaufreinigung (2.4.6 oder 2.4.7) bei -20°C gelagert.

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

2.3.6 RNA-Isolierung aus Flavivirus-infizierten Zellen

Alle Arbeitsschritte wurden mit RNase-freien Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Die RNA-Extraktion aus Dengue 1-4- oder West Nil-Virus-infizierten Zellen wurde nach dem Qiagen-Protokoll „RNA-Extraktion aus tierischen Zellen“ (QIAGEN, 1999) mit dem QIAGEN RNeasy-Kit durchgeführt. Dieses Kit isoliert neben der viralen auch die zelleigene RNA. Für die Klonierung der B-Domänen-Region von Japanischem Enzephalitis-Virus wurde die RNA aus Formalin-inaktiviertem Impfstoff (Fa. Biken, Osaka, Japan) mit dem QIAGEN RNeasy-Kit isoliert. Die isolierte RNA wurde sofort für die Reverse Transkription eingesetzt oder bei -70°C gelagert.

2.3.7 Photometrische Bestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde durch photometrische Messung der Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Für doppelsträngige DNA entspricht 1 OD_{260} ca. 50 $\mu\text{g/ml}$, für Oligonukleotide ca. 20 $\mu\text{g/ml}$. Der Quotient der Extinktionen von 260 zu 280 nm gibt die Reinheit der DNA wieder, er sollte über 1,7 liegen.

Auch die Primer für die Reverse Transkription und die PCR wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen und auf 25 pmol/ μl für die Reverse Transkription bzw. 10 pmol/ μl für die PCR eingestellt.

2.3.8 Reverse Transkription

Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase kann RNA in cDNA umschreiben. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Enzyme eingesetzt: zum einen die M-MuLV-Reverse Transkriptase, die ursprünglich aus einem Retrovirus (*Moloney Murine Leukemia Virus*) isoliert wurde, zum anderen die Mutante Superscript II, deren RNase-H-Aktivität 10^{-6} fach vermindert ist. Der RNA-Strang eines RNA-DNA-Hybridmoleküls wird somit nicht enzymatisch abgebaut, außerdem ist das Enzym geringfügig hitzestabiler, was Probleme durch mögliche RNA-Sekundärstrukturen vermeidet.

Für den Ansatz mit M-MuLV-Reverser Transkriptase wurde 6 μl RNA mit 2 μl (50 pmol) RT-Primer 5 min. bei 70°C und anschließend 5 min. auf Eis inkubiert, damit die Sekundär- und Tertiärstruktur der RNA zerstört wurde und sich der Primer an die RNA anlagerte. Dann wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

4 μl 5 x Puffer

4 μl 10 mM dNTPs

2 μl 100 mM DTT

2 μl Ribonuklease-Inhibitor.

Es wurde 5 min. bei 37°C inkubiert, 2 µl M-MuLV-Reverse-Transkriptase zugegeben und 60 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase 10 min. bei 70°C inaktiviert und die entstandene cDNA bis zum Einsatz in der PCR bei –20°C gelagert.

Für die Reverse Transkription mit Superscript II wurden 5 µl RNA mit 5 µl N₆-Primer und 2 µl DEPC-behandeltes H₂O 5 min. bei 70°C und 5 min. auf Eis inkubiert. Hinzugefügt wurden dann:

4 µl 5 x Puffer,
1 µl 10 mM dNTPs,
2 µl 100 mM DTT,

und dieser Ansatz wurde 10 min. bei 25°C inkubiert. Dann wurde 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben, 20 min. bei 37°C und 30 min. bei 42°C inkubiert und schließlich die Reverse Transkriptase 10 min. bei 70°C inaktiviert. Auch hier wurde die entstandene cDNA bis zum Einsatz in der PCR (2.3.9) bei –20°C gelagert.

Als Negativkontrolle wurde in allen Versuchen eine Probe eingesetzt, die an Stelle von RNA Wasser enthält.

5 x Puffer: 250 mM Tris-HCl
375 mM KCl
15 mM MgCl₂

2.3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Doppelstrang-DNA läßt sich durch hohe Temperaturen zu Einzelstrang-DNA aufschmelzen. An diesen Einzelsträngen kann in Gegenwart von dNTPs ausgehend von einem Oligonukleotidprimer doppelsträngige DNA synthetisiert werden. Durch Verwendung von zwei Primern, bei denen sich der eine am sense-Strang, der andere am revers komplementären Strang anlagert, entsteht bei

zyklischer Wiederholung der Vorgänge Schmelzen der DNA, Hybridisierung (Annealing) und Elongation der Primer eine bis zu 10^7 -fach amplifizierte DNA-Sequenz zwischen den Hybridisierungsstellen der Oligonukleotide. Um die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen an den Enden der cDNA-Sequenzen einzuführen, enthalten die Primer an ihren 5'-Enden Erkennungssequenzen für zuvor ausgewählte Restriktionsendonukleasen.

Virale RNA der Dengueviren 1-4, des West-Nil-Virus und des Japanischem Enzephalitis-Virus wurde revers transkribiert. Die entstandene cDNA entsprach dem B-Domänen-Bereich des jeweiligen E-Gens. Sie wurde in einer nachfolgenden PCR amplifiziert.

Alle PCRs wurden in 50 μ l Gesamtvolumen mit 10 μ l des RT-Ansatzes, 0,2 mM Endkonzentration eines jeden dNTPs, 1 U Platinum Taq-DNA-Polymerase, 5 μ l 10x-PCR-Puffer (15mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4) in Anwesenheit von je 200 nmol der jeweiligen Primer durchgeführt. Die Ansätze wurden nach einer einleitenden Denaturierung (5 min. 94°C) in einem Perkin Elmer-Thermocycler (GeneAmp-PCR-System 9600) 40 Amplifizierungszyklen mit 30 sec. Denaturierung bei 94°C, 30 sec. Annealing bei je nach Primer zwischen 45, 50 oder 52°C und 40 sec. Elongation bei 72°C unterzogen. Zur vollständigen Elongation wurden die Ansätze bei 72°C für weitere 6 min. inkubiert.

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden 10 μ l je Ansatz in der Agarose-Gelelektrophorese (2.3.12) aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden dann unter Verwendung des „Qiaquick PCR Purification Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt (2.3.13) und in die Restriktion (2.3.15) eingesetzt.

2.3.10 Diagnostische RNA-Aufreinigung für die 5'-Nuclease-PCR

Virale RNA wurde aus Patientenseren nach dem Protokoll „QiaAmp Viral RNA Mini Kit“ der Firma Qiagen, Hilden nach Angaben des Herstellers extrahiert. Die

Extrakte wurden entweder sofort für die 5'-Nuclease-PCR (2.3.11) eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.3.11 5'-Nuclease-PCR (Laue et al., 1999)

Die Dengue-Serotypen-spezifische RNA wurde mit einer vollautomatisierten 5'-Nuclease-PCR nach Laue et al., 1999 detektiert. Fluorochrommarkierte Sonden wurden synthetisiert wie beschrieben und die Primer kommerziell hergestellt (TibMolBiol, Berlin). Die virale RNA war detektierbar bis zu einer Grenze von 500 Kopien pro ml Patientenserum, das entspricht zwei bis drei Molekülen in 5 µl Extrakt.

2.3.12 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen.

In Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden Fragmente wurde Agarose zu 0,8-1% in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Der Flüssigkeit wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml zugesetzt, bevor sie in das vorbereitete Gelbett gegossen wurde. Nach Aushärtung des Gels wurde der Kamm entfernt. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Gelladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Das Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer bei 5-10 Volt/cm Gellänge 20 min. bis 1 h aufgetrennt. Zur Detektion der Banden wurde das Gel mit UV-Durchlicht bestrahlt und photographiert. Die Molekulargewichte der DNA-Banden bestimmten sich im Vergleich zu den mitlaufenden DNA-Molekulargewichtsmarkern.

Ethidiumbromid-Stocklösung 10 mg/ml

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat
2 mM EDTA

Gelladepuffer: 0,2% Bromphenolblau
0,2% Xylencyanol
60% Glycerol
60 mM EDTA

2.3.13 Gelelektrophorese von RNA

Einzelsträngige RNA bildet durch inter- und intramolekulare Basenpaarung Sekundärstrukturen und Aggregate aus und muss daher in einem denaturierenden Gel untersucht werden. Hierzu wird Formaldehyd verwendet, dessen denaturierende Wirkung darauf beruht, dass die Aldehydgruppe des Formaldehyds mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiffsche Basen bildet. Es können keine Wasserstoffbrücken mehr gebildet werden.

Zur Kontrolle der RNA-Qualität wurde ein Aliquot der isolierten Gesamt-RNA in einem 1%igen Agarosegel mit Formaldehyd aufgetrennt.

Das Agarosegel wurde mit 1 x MOPS ((N-morpholino)-propansulfonsäure)-Puffer und 2,2 M Formaldehyd (Endkonzentration) gegossen. Zu 4,5 µl Gesamt-RNA wurden 2 µl 5 x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid pipettiert. Die RNA wurde vor dem Auftragen 15 min. bei 65°C denaturiert und kurz auf Eis gestellt. Dann wurden 2 µl Formaldehyd-Ladepuffer zugesetzt und die Proben geladen. Als Laufpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Alle Puffer wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt und die Gelkammer mit DEPC-behandeltem Wasser gespült.

5 x MOPS-Puffer: 0,1 M MOPS (pH 7,0)
 40 mM Natriumacetat
 5 mM EDTA (pH 8,0).

Formaldehyd-Ladepuffer: 50% Glycerol
1 mM EDTA (pH 8,0)
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol

2.3.14 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen wurde unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die gewünschte DNA-Bande wurde dazu mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, das Agarosestück in einem chaotropen Puffer aufgelöst, und die Suspension über eine Säule gegeben. Von dieser Säule wurde die DNA in 30 µl H₂O dest. eluiert.

2.3.15 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA-Präparationen für die Transformation von *E. coli*, DNA-Sequenzierungen oder präparative Restriktionen wurden mit dem „NucleoSpin Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Vorschrift des Herstellers aus 2-5 ml ü. N.-Kultur durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.16 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II hydrolysieren doppelsträngige DNA an definierten, meist palindromen Sequenzen.

Alle Restriktionen wurden als Doppelrestriktion mit den Enzymen *Bam*HI/*Hind*III bzw. *Bam*HI/*Sac*I (Dengue 1-4-Amplifikate, Japanisches Enzephalitis-Amplifikat) oder mit den Enzymen *Eco*RI/*Xho*I (West Nil-Amplifikat) in Puffer Y⁺/Tango für 30-60 min. bei 37°C durchgeführt. Die beiden Expressionsvektoren pQE30 und pET22b wurden analog geschnitten. Dabei wurden 5-10 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Um die Reaktion zu stoppen (nicht alle Enzyme sind

hitzeinaktivierbar), schloss sich unmittelbar an die Restriktionen eine Agarose-Gelelektrophorese nach 2.3.12 und die Aufreinigung nach 2.3.14 an.

Puffer Y⁺/Tango: 33 mM Tris-Acetat
10 mM Magnesiumacetat
66 mM Kaliumacetat
0.1 mg/ml BSA, pH 7,9

2.3.17 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die für diesen Vorgang benötigte Phosphodiesterbrücke wird von der T4-Ligase geknüpft. Da die PCR-Fragmente nach der Restriktion über unterschiedliche überhängende Enden (*sticky ends*) verfügen, können sie gerichtet in die analog geschnittenen Vektoren pET22b und pQE30 eingebracht werden.

Die geschnittenen Dengue 1-4- und Japanische Enzephalitis-Fragmente wurden mit dem Vektor pQE30 ligiert, das geschnittene West Nil-Fragment mit dem Vektor pET22b. 5 U T4-Ligase wurden mit 0,1-0,5 µg geschnittenem Vektor und einem 2-5-fachen molarem Überschuss an geschnittenem PCR-Fragment 4 Std. bei 16°C oder ü. N. bei 4°C inkubiert. Dieser Ligationsansatz wurde für die Transformation kompetenter Bakterien nach 2.3.4 verwendet.

10 x Ligationspuffer: 400 mM Tris-HCl
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
5 mM ATP, pH 7,8

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

Die automatische DNA-Sequenzierung erfolgte mit der sogenannten Cycle-Sequenzierung, einer Abwandlung der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISM Dye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) verwendet.

Für jede Reaktion wurden 1 µg DNA und 10 pmol Primer eingesetzt. Zu jeder Probe wurden 4 µl Ready-Reaction-Mix gegeben, der neben der AmpliTaq-Polymerase und den vier dNTPs auch jedes der vier ddNTPs als farblich unterschiedlich fluoreszenzmarkiertes Dye-Didesoxynukleotid (Dye-Terminator) enthält. Dann wurden ad 20 µl H₂O dest. zugesetzt. Die Ansätze wurden folgendem Programm in einem Perkin Elmer Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400) unterzogen:

| | |
|----------------|-------------------|
| Denaturierung: | 10 sec. 96°C |
| Annealing: | 5 sec. 50°C |
| Elongation | 4 min. 60°C |
| | jeweils 25 Zyklen |

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde die DNA durch Zugabe von 80 µl H₂O dest., 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6 und 250 µl Ethanol bei Raumtemperatur gefällt und 15 min. bei 16000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und vor dem Auftragen in 4 µl Auftragspuffer gelöst und die DNA bei 90°C 2 min. denaturiert. Die fluoreszenzmarkierten Sequenzierungsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf einem ABI PRISM 377 DNA Sequenzierer (Applied Biosystems) computergestützt detektiert.

3 M Natriumacetat pH 4,6

70% Ethanol

Auftragspuffer: 10 mM EDTA pH 8,0
80% Formamid

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Proteine lassen sich elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem Trenngel auftrennen. Das Sammelgel sorgt für die Fokussierung der Proteine. Ihre Migrationsgeschwindigkeit hängt durch die Anlagerung der SDS-Moleküle und die dadurch bedingte Aufhebung der Tertiärstruktur nur noch von der Proteingröße ab.

Die hier verwendeten Gele hatten folgende Zusammensetzung:

Sammelgel: 5% Acrylamid-Mix (30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid in H₂O)
0,125 M Tris-HCl pH 6,8
0,1% SDS
0,05% Ammoniumpersulfat
0,1% TEMED

Trenngel: 15% Acrylamid-Mix (30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid in H₂O)
0,375 M Tris-HCl pH 8,8
0,1% SDS
0,033% Ammoniumpersulfat
0,067% TEMED

Nach der Polymerisation wurden die Gele in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer (Peqlab, Erlangen) gespannt. Die Proben wurden in 1 Vol. nichtreduzierendem Probenpuffer aufgenommen, 5 min. bei 95°C aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und sofort aufgetragen. Bei den zu blottenden Gelen wurde während der Polymerisation der Kamm umgekehrt ins Gel geschoben, damit eine einzige große Tasche entstand. Die Probe wurde nach der Polymerisation und dem Zusammenbau der Apparatur über die gesamte Gelbreite aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 150 V und im Trenngel bei 200 V für 2-3 h,

danach wurden die Gele entweder geblottet oder Coomassie- bzw. Silbergefärbt. Um die Reaktionen gegen die verschiedenen B-Domänen im Immunoblot vergleichen zu können, wurde der Proteingehalt der eingesetzten Aufreinigungen mittels Image Quanting (2.4.8) errechnet und jeweils 200 µg Protein auf die zu blottenden Gele aufgetragen.

Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl
 200 mM Glycin
 0,1% SDS

Probenpuffer: 0,125 mM Tris-HCl pH 6,8
(nichtreduzierend) 5% SDS
 20% Glycerol
 0,02% Bromphenolblau

2.4.2 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Mit der Coomassie-Färbung können Proteine bis zu einer Konzentration von 4-40 ng/mm² Gel nachgewiesen werden.

Zuerst wurden die Gele mindestens 1 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt, dann in Coomassie-Entfärber entfärbt, bis der Hintergrund der Gele klar war. Der Entfärber wurde dazu mehrmals gewechselt. Die Gele wurden nach 2.4.4 konserviert.

Coomassie-Färbelösung: 50% Methanol
 8% Essigsäure
 0,25% Coomassie Brilliant Blue R250

Coomassie-Entfärber: 5% Methanol
 10% Essigsäure

2.4.3 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen (Heukeshoven & Dernick, 1988)

Die Silberfärbung ist um den Faktor 50 bis 100 sensitiver als die Coomassie-Färbung, sie ermöglicht den Proteinnachweis von 0,08 bis 0,4 ng/mm² Gel.

Das Gel wurde zunächst 30 min. in Fixierlösung inkubiert, dann 30 min. bis ü. N. mit Silber-Inkubationslösung behandelt. Es wurde 3 x 5 min. in H₂O dest. gewaschen und 20 min. in Silberfärbelösung inkubiert. Der Entwickler wurde für 4-7 min. auf das Gel gegeben, bis die Farbreaktion die gewünschte Stärke erreicht hatte, dabei wurde der Entwickler nach 1 min. gewechselt. Die Reaktion wurde abschließend mit Silberstopplösung gestoppt und die Gele konserviert (2.4.4).

Fixierlösung: 30% Ethanol
 10% Essigsäure

Silber-Inkubationslösung: 75 ml Ethanol
 17g Natriumacetat
 1,25 ml Glutaraldehyd (25%)
 0,5 g Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
 Ad 250 ml H₂O dest.

Silber-Färbelösung: 0,5 g AgNO₃
 50 µl Formaldehyd (37%)
 Ad 250 ml H₂O dest.

Silber-Entwickler: 7,5 g Na₂CO₃
 30 µl Formaldehyd (37%)
 Ad 300 ml H₂O dest.
 pH mit NaOH auf <11,5 einstellen.

Silber-Stopplösung: 2,5 g Glycerin in 250 ml H₂O dest.

2.4.4 Konservieren von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit einem Trocknungsrahmens (Roth, Karlsruhe) zwischen zwei Cellophanmembranen nach Anweisung des Herstellers konserviert.

Trocknungspuffer: 20% Ethanol
10% Glycerol

2.4.5 μ -capture-ELISA (Pan Bio, Brisbane, Australia)

In den zu testenden Patientenseren wurden IgM-Antikörper mit dem μ -capture-ELISA der Fa. PanBio, Brisbane, Australia nach Angaben des Herstellers ohne Modifikation bestimmt.

In diesem Testsystem bildet 1. ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter monoklonaler Antikörper Komplexe mit den Dengue-Antigenen (Antigen-mAb-Komplexe), 2. werden Dengue-IgM-Antikörper im Serum des Patienten (falls vorhanden) über anti-Human-IgM-Antikörper an einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Werden beide Komponenten zusammengegeben, lässt sich ihre Bindung mit TMB-Substrat bei 450 nm im ELISA-Reader messen.

2.4.6 Metall-Chelat-Chromatographie unter nativen Bedingungen

In der Metall-Chelat-Chromatographie macht man sich zunutze, dass Histidinreste mit Metallionen Chelate bilden. Enthält das exprimierte Protein Histidinreste, bindet es teilkomplexierte Nickel-Ionen. Das gebundene Protein kann durch eine pH-Wert-Änderung oder durch kompetitive Verdrängung mit anderen Chemikalien, wie Imidazol, eluiert werden.

Für die Aufreinigung wurde Nickel-NTA(Nitrilotriessigsäure)-Agarose (Qiagen, Hilden) als Matrix verwendet. Dieses Material besteht aus Nickel-NTA, die an Sepharose[®] CL6-B gekoppelt ist. Sie ist in der Lage, das Ni²⁺-Ion an 4 von 6

Stellen zu chelatieren und kann Proteine besonders fest komplexieren. Die Elution des Proteins erfolgte durch einen pH-Gradienten. Erhaltene Proben wurden mit der SDS-PAGE (2.4.1) analysiert.

Das Bakteriensediment aus der Bakterienanzucht und Induktion (2.3.5) wurde in 4 ml Na-Puffer pro g Nassgewicht resuspendiert. Durch Ultraschall unter Eiskühlung wurden die Bakterienzellen dann aufgeschlossen (50 Pulse bei 70% Pulszeit, Stärke 7). Unlösliche Komponenten wurden 10 min. bei 30.000 x g, 4°C abzentrifugiert und für die denaturierende Aufreinigung nach 2.4.7 eingesetzt. 5 ml des Überstandes wurden zu 2 ml der Nickel-NTA-Matrix gegeben. Nach 60 min. leichtem Schütteln bei RT wurde das Säulenmaterial mit 10 ml Na-Puffer pH 7.8 und 15 ml Na-Wash-Puffer pH 6,0 gewaschen. Das Protein wurde mit je 3 ml Na-Wash-Puffer der pH-Stufen 5,5; 4,5; 3,5; 2,5 eluiert.

Na-Puffer, pH 7,8: 50 mM Na₂PO₄
 300 mM NaCl

Na-Wash-Puffer 50 mM Na₂PO₄
 300 mM NaCl
 10% Glycerol,
 pH mit NaOH eingestellt: (pH 6,0; 5,5; 4,5; 3,5; 2,5).

2.4.7 Metall-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Das Sediment aus der nativen Aufreinigung (2.4.6) wurde in 7 M Urea (pH 8,0) resuspendiert (2 ml pro g Nassgewicht) und erneut ultraschallbehandelt wie oben. Unlösliche Komponenten wurden 20 min. bei 30.000 x g, 4°C abzentrifugiert. 5 ml des Überstandes wurden zu 1 ml der Nickel-NTA-Matrix gegeben und 60 min. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Matrix in die Säule gefüllt und das Säulenmaterial mit 2 x je 5 Vol. 7 M Urea (pH 6,5) gewaschen. Der Säulendurchlauf und beide Waschfraktionen wurden für die Gelanalyse

aufgehoben. Das Protein wurde mit je 1 ml 7M Urea (pH 6,0; pH 5,0; pH 4,0; pH 3,0; pH 2,0) eluiert und die Fraktionen wurden gesammelt.

7 M Urea pH 8,0; pH 6,5; pH 6,0; pH 5,0; pH 4,0; pH 3,0; pH 2,0, direkt vor Gebrauch eingestellt.

2.4.8 Proteinmengenbestimmung durch Image Quanting

Die Proteinmengen der bei der Aufreinigung (2.4.6 und 2.4.7) erhaltenen Fraktionen wurden durch Image Quanting bestimmt. Als Vergleich diente ein Lysozym-Standard, der zuvor photometrisch vermessen wurde (2.3.7). Die für das Image Quanting verwendeten Programme waren NIH Image 1.61 und Photoshop 5.0 (Adobe).

Lysozym-Stock: 100 mg/ml

2.4.9 Western Blot (Towbin et al., 1979)

Um die Intensität der Reaktion verschiedener Patientenseren vergleichen zu können, wurden gleiche Proteinmengen der verschiedenen B-Domänen-Fragmente auf die gesamte Breite der zu blottenden SDS-Gele aufgetragen.

Jeweils 200 µg Protein (bei einer Gelbreite von 140 mm entsprach dieses etwa 1,4 µg Protein/mm Breite) wurden auf ein SDS-Gel geladen und wie in 2.4.1 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen (Protean II, 0,4 µm, Schleicher&Schüll, Dassel) transferiert. Der Rahmen der Blotkammer (Biorad, München) wurde in einer mit Towbin-Puffer gefüllten flachen Schale luftblasenfrei zusammengesetzt. Alle Komponenten wurden zuvor kurz in Towbin-Puffer getränkt. Schaumgummi, Whatmanpapier, SDS-Gel, Nitrozellulosemembran, Whatmanpapier und wieder Schaumgummi wurden im Rahmen übereinander geschichtet und dieser Stapel mit der „Membranseite“ zur Anode in die mit

Towbin-Puffer gefüllte Blotkammer eingehängt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 2 mA/cm² ü. N. bei 4°C.

Towbin-Puffer: 25 mM Tris-HCl
 192 mM Glycin
 20% Methanol

2.4.10 Ponceau-Rot-Färbung der Nitrozellulosemembranen

Die Ponceau-Rot-Färbung diente dazu, den Erfolg des Proteintransfers auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen. Die Proteinbanden färben sich hierbei rot an. Die Nitrozellulosemembran wurde 3 min. in Ponceau-Färbelösung geschwenkt und anschließend in H₂O dest. entfärbt, bis der Hintergrund farblos war.

Ponceau-Färbelösung: 1% Ponceau-Rot
 5% Essigsäure

2.4.11 Herstellung der Blotstreifen

Die geblottete und Ponceau-Rot gefärbte Nitrozellulosemembran wurde getrocknet. Dann wurde die Proteinbande, die dem Monomer entsprach, am oberen Rand mit schwarzem Kugelschreiber angezeichnet und mit etwa 3 mm „Zugabe“ an beiden Seiten ausgeschnitten. Dieses wurde für jedes Protein analog wiederholt, nur die Dengue 1-Proteinbande wurde mit einer doppelten Markierung angezeichnet und ausgeschnitten. Alle ausgeschnittenen monomeren Banden wurden mit Silikonkleber (Paso Chemie GmbH, Münster) in der Reihenfolge Dengue 1-Antigen, Dengue 2-Antigen, Dengue 3-Antigen, Dengue 4-Antigen, West Nil-Antigen, Japanisches Enzephalitis-Antigen aneinandergeklebt. Der Silikonkleber wurde ü. N. getrocknet. Schließlich wurde mit einem Skalpell die gesamte Breite der Nitrozellulosemembran in 3 mm breite Teststreifen geschnitten.

2.4.12 Immunoblot mit monoklonalen Antikörpern

Die Reaktivität des West Nil-Antigens wurde mit dem West Nil-spezifischen monoklonalen Antikörper 15R4 getestet und die Reaktivität des Dengue 2-Antigens mit den drei Dengue 2-spezifischen monoklonalen Antikörpern 3H5-1, 2H3 und 6B6. Alle Schritte fanden in Inkubationsschalen (Genzyme Virotech, Rüsselsheim) auf dem Schüttler unter leichtem Schwenken statt.

Die in Streifen geschnittenen Nitrozellulosemembranen wurden zwei Stunden bei RT mit Milch (1,5% Fett) geblockt. Der entsprechende monoklonale Antikörper wurde 1:200 in PBS/20% Milch verdünnt zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Streifen dreimal je fünf min. mit PBS gewaschen. Meerrettich-Peroxidase-markiertes Ziege-anti-Maus-IgG (H+L, Promega, Mannheim) wurde 1:1000 in PBS/20% Milch verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Teststreifen gegeben. Die Streifen wurden erneut dreimal je fünf min. mit PBS gewaschen und 10 min. mit TMB-Substrat (Mikrogen, München) entwickelt. Die Reaktion wurde durch Spülen mit H₂O gestoppt.

Milch, 1,5% Fett, homogenisiert und pasteurisiert (EUCO GmbH, Hamburg)

PBS: wie unter 2.2.1 beschrieben

2.4.13 Immunoblot mit Patientenseren

Auf jedem einzelnen Teststreifen waren sechs rekombinante Antigene immobilisiert: die B-Domänen von Dengue 1-, Dengue 2-, Dengue 3-, Dengue 4-Virus, West Nil-Virus und Japanischem Enzephalitis-Virus. Mit dem Immunoblot wurden Patientenseren auf das Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen diese Flaviviren getestet.

Die Teststreifen wurden 2 h bei RT oder ü. N. bei 4°C mit Milch geblockt. Zu testende Patientenseren wurden 1:100 in Milch verdünnt zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Für jede einzelne Schale wurden Positiv- und Negativseren als

Kontrollen mitgeführt. Danach wurden die Teststreifen dreimal je 5 min. mit Waschlösung 1 und einmal mit PBS gewaschen. Meerettich-Peroxidase-markiertes Kaninchen anti-human IgG (H+L, RecombiBlot, Mikrogen, München) wurde 1:2000 in PBS/20% Milch verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Teststreifen gegeben. Nach dreimaligem fünfminütigem Waschen mit Waschlösung 2 und einem Waschschrift mit PBS wurden die Teststreifen 5-10 min. mit TMB-Substrat (Mikrogen, München) entwickelt. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Spülen mit H₂O gestoppt. Nach dem vollständigen Trocknen der Teststreifen wurde der Test ausgewertet, indem die Färbungsintensität von – (negativ) bis +++ (stark positiv) abgeschätzt wurde.

Milch, 1,5% Fett, homogenisiert und pasteurisiert (EUCO GmbH, Hamburg)

PBS: wie unter 2.2.1 beschrieben

Waschlösung 1: PBS

0,5% Tween 20

1% NP40

Waschlösung 2: PBS

0,1% Tween 20

TMB-Substrat (Mikrogen, München).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung und Amplifikation flaviviraler Nukleinsäure

Die Infektion von Zellen mit den vier Denguevirus-Serotypen und dem West Nil-Virus wurde mit infizierten Zellen oder Zellkulturüberständen durchgeführt. Die Infektionsrate der verwendeten Zellen betrug über 60%, wie durch die Immunfluoreszenz der infizierten Zellen abgeschätzt wurde. Die Abbildung 7 zeigt exemplarisch die positive Immunfluoreszenz Dengue 3-infizierter Zellen.

Anschließend wurde die Gesamt-RNA von Dengue 1-4- und West Nil-infizierten Zellen nach Methode 2.3.6 isoliert. Die Isolierung von RNA des Japanischen Enzephalitis-Virus gelang aus inaktiviertem Impfstoffmaterial der Firma Biken, Osaka, Japan.

Abbildung 8 zeigt die aus Dengue 3-infizierten Vero-E6-Zellen aufgereinigte RNA. Man erkennt die 28S- und 18S-RNA-Moleküle als zwei scharfe Banden, die RNA ist also nicht degradiert. Auf diese Art wurde die isolierte Gesamt-RNA aller Ansätze kontrolliert.

Unter Verwendung eines N₆-Primers wurde anschließend die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben (2.3.8). Die cDNA diente als PCR-Template für die Amplifikation der codierenden Regionen der einzelnen B-Domänen aller sechs Viren mit spezifischen Primern.

Die errechnete Größe der amplifizierten Fragmente betrug:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Dengue 1-Amplifikat: | 312 bp |
| Dengue 2-Amplifikat: | 324 bp |
| Dengue 3-Amplifikat: | 329 bp |
| Dengue 4-Amplifikat: | 311 bp |
| West Nil-Amplifikat: | 323 bp |
| Japanisches Enzephalitis-Amplifikat: | 300 bp. |

Die Größen der PCR-Amplifikate und die in sie eingefügten Restriktionsschnittstellen sind in der Abbildung 9 zusammengefasst.

Es wurden Reaktionsansätze mit verschiedenen cDNA-Mengen, Primer- und MgCl₂-Konzentrationen bei verschiedenen „Annealing“-Temperaturen und unterschiedlich vielen Amplifikationszyklen getestet. Die etablierten PCRs wurden mit den unter 2.3.9 angegebenen Konzentrationen und Programmen durchgeführt.

Für alle sechs Viren (Dengueviren 1-4, West Nil-Virus, Japanisches Enzephalitis-Virus) konnte aus der RNA-Präparation mit der RT-PCR ein Amplifikat erhalten werden. Die in den Agarosegelen beobachtete Fragmentgröße entsprach in allen Fällen der rechnerisch erwarteten Größe.

Abbildung 10 gibt als Beispiel das gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Amplifikat des Dengue 3-Virus wieder. In die RT-PCR eingesetzt wurde Gesamt-RNA aus jeweils zwei verschiedenen Dengue 3-infizierten Zellkulturen: C6/36-Zellen und Vero-E6-Zellen. Aus beiden ließ sich das Fragment der gewünschten Größe amplifizieren. Aus den Negativkontrollen der RT und der PCR mit DEPC-behandeltem H₂O als Template wurden keine PCR-Produkte amplifiziert. Analoge Ergebnisse wurden für die anderen fünf Viren erhalten.

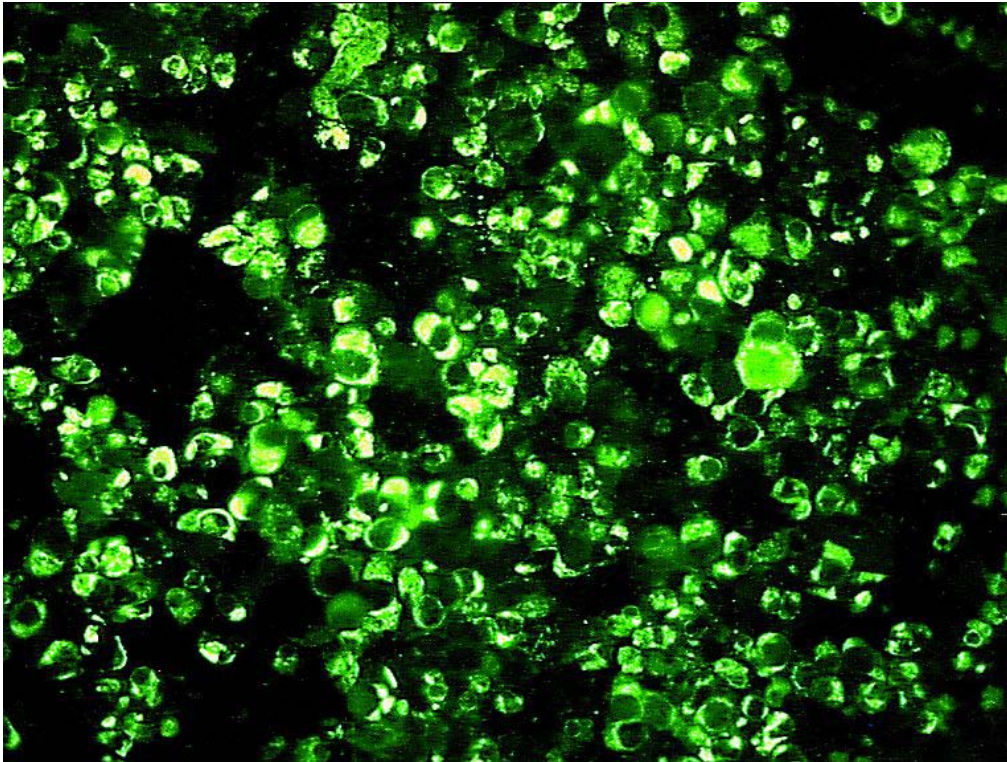


Abb. 7: Immunfluoreszenz Dengue 3-infizierter Vero-E6-Zellen.

Vero-E6-Zellen wurden mit Dengue 3-Virus infiziert (2.2.2). Nach fünf Tagen wurden die Zellen auf Immunfluoreszenz-Objektträger ausgestrichen (2.2.3) und in der indirekten Immunfluoreszenz (2.2.4) getestet. Das Dengue-Patientenserum wurde in einer 1:40-Verdünnung eingesetzt, das anti-human-FITC-Konjugat (Sifin; Berlin) in einer 1:500-Verdünnung. Mikroskopische Vergrößerung 400 x. Ca. 80% der Zellen sind infiziert.

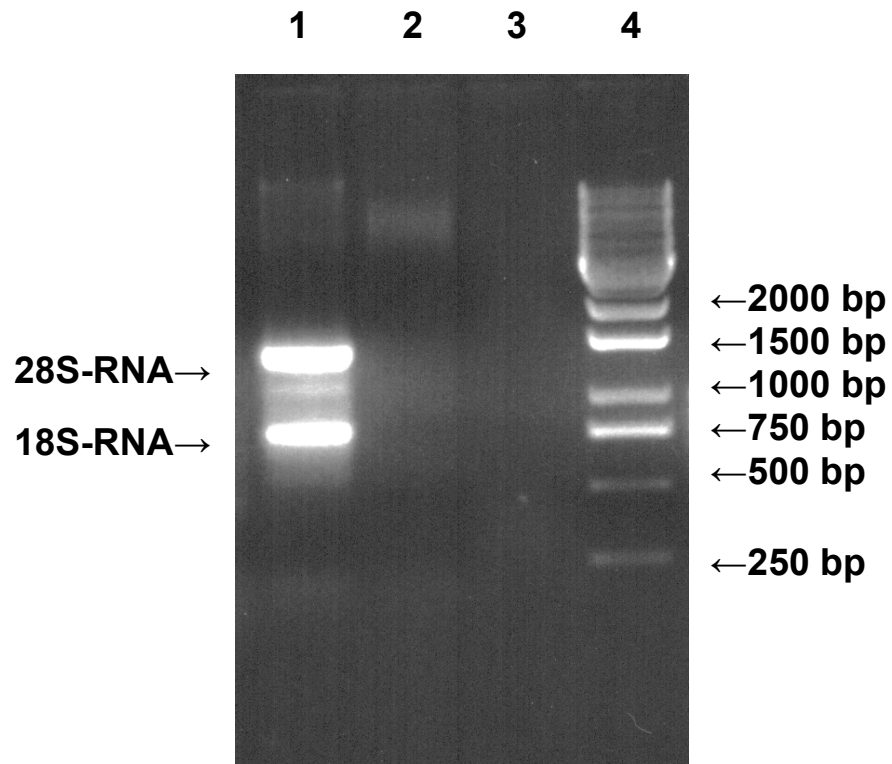


Abb. 8: RNA-Aufreinigung aus Vero-E6-Zellen.

Vero-E6-Zellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben mit dem Dengue 3-Virus infiziert. Die RNA wurde mit dem QIAGEN RNeasy-Kit aufgereinigt (2.3.6) und zur Kontrolle auf ein 1%iges Agarosegel mit Formamid (2.3.14) aufgetragen. Gellauf 100 V, 40 min. Die RNA der Dengue 3-infizierten Zellen zeigt deutliche ribosomale Banden (18S- und 28S-RNA). Der Zellkultur-Überstand (Spuren 2 und 3) enthält zu wenig RNA für sichtbare Banden.

- 1: 10 µl RNA-Präparation aus Dengue 3-infizierten Vero-E6-Zellen
- 2: 20 µl RNA-Präparation aus dem Überstand der Vero-E6-Zellen
- 3: 10 µl RNA-Präparation aus dem Überstand der Vero-E6-Zellen
- 4: DNA-Marker 1 kb Leiter.

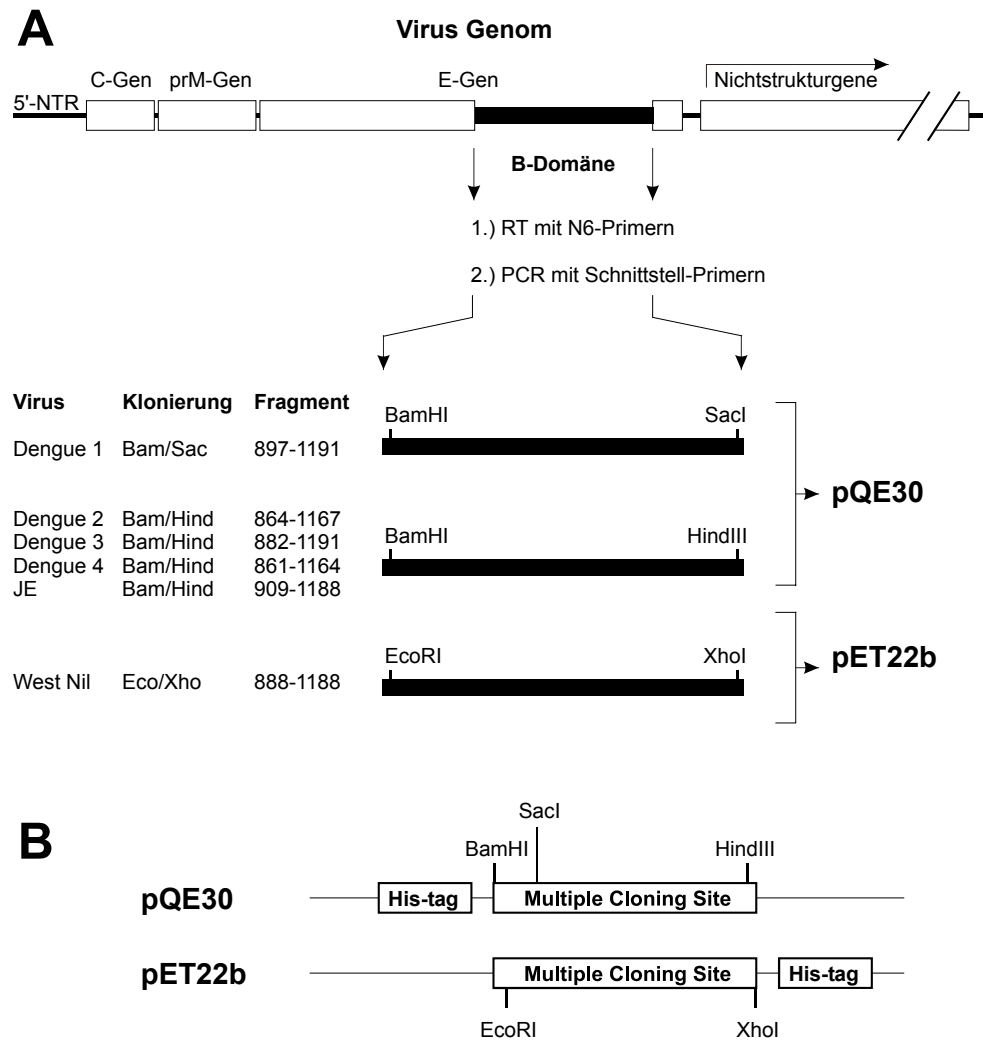


Abb. 9: PCR-Amplifikate und Herstellung der Expressionskonstrukte.

A, Isolierte RNA virusinfizierter Zellen wurde mit einem N₆-Primer in cDNA umgeschrieben (2.3.8). Der Bereich der B-Domäne aller sechs Viren (schwarz) wurde mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 1) amplifiziert (2.3.9). Die PCR-Amplifikate sind ebenfalls schwarz dargestellt. Sie wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten (2.3.15) und in die analog geschnittenen Vektoren inseriert (2.3.16). Die Nukleotidnumerierung entspricht der des E-Gens. *Bam*HI; *Eco*RI, *Hind*III; *Sac*I; *Xho*I: Restriktionsschnittstellen. 5'-NTR: 5'-nichttranslatierte Region.

B, Schematisch dargestellt ist der Klonierungsbereich („multiple cloning site“) der beiden Vektoren mit den verwendeten Schnittstellen. Die Klonierung in pQE30 erzeugt ein Fusionsprotein mit C-terminalem „His-tag“, die Klonierung in pET 22b ein Fusionsprotein mit N-terminalem „His-tag“.

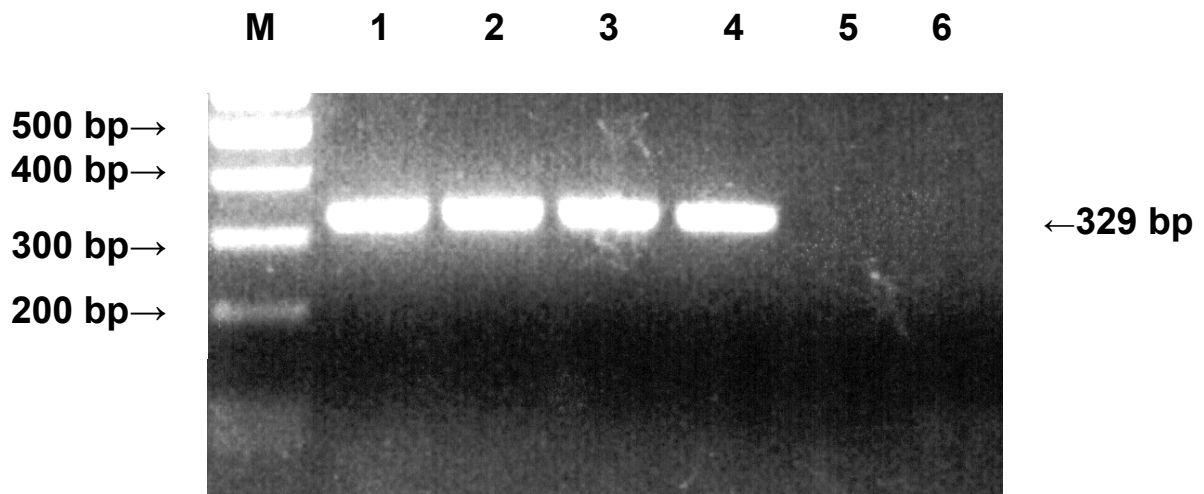


Abb. 10: RT-PCR des Dengue 3-Amplifikats.

Die aus C6/36-Zellen und Vero-E6-Zellen isolierte RNA wurde mit der RT-PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Danach wurden die PCR-Produkte 25 min. bei 100 V in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die rechnerische Fragmentgröße beträgt 329 bp.

M: Marker 100 bp Leiter

1, 2: RT-PCR an Dengue 3-infizierten C6/36-Zellen

3, 4: RT-PCR an Dengue 3-infizierten Vero-E6-Zellen

5: RT-Negativkontrolle

6: PCR-Negativkontrolle.

3.2 Herstellung der Expressionskonstrukte und Sequenzüberprüfung

Für die Ligationsansätze wurden die Vektoren und PCR-Produkte folgendermaßen geschnitten und ligiert (siehe auch Abb. 9)

Tabelle 2: Ligationsansätze

| PCR-Produkt | Vektor | Restriktionsenzyme |
|-------------------------|--------|-----------------------------------|
| Dengue 1 | pQE30 | <i>Bam</i> HI und <i>Sac</i> I |
| Dengue 2 | pQE30 | <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III |
| Dengue 3 | pQE30 | <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III |
| Dengue 4 | pQE30 | <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III |
| West Nil | pET22b | <i>Eco</i> RI und <i>Xho</i> I |
| Japanische Enzephalitis | pQE30 | <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III |

Abbildung 11 zeigt als Beispiel die gelelektrophoretische Kontrolle des für die Ligation mit *Bam*HI und *Hind*III geschnittenen Dengue 1-Inserts und des analog geschnittenen Vektors pQE30. Die gelelektrophoretischen Kontrollen für die anderen Ligationsansätze sind nicht abgebildet.

Nach der Ligation wurden im Falle der pQE30-Konstrukte JM109-Zellen bzw. im Falle des West Nil/pET22b-Konstruktes BL21(DE3)pLysS-Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transformiert und die Transformanden mittels Doppelrestriktion (Restriktionsenzyme siehe Tabelle 2) überprüft. Klone, die nach der Doppelrestriktion und der folgenden Gelelektrophorese ein Fragment der gewünschten Größe aufwiesen, wurden sequenziert (2.3.17).

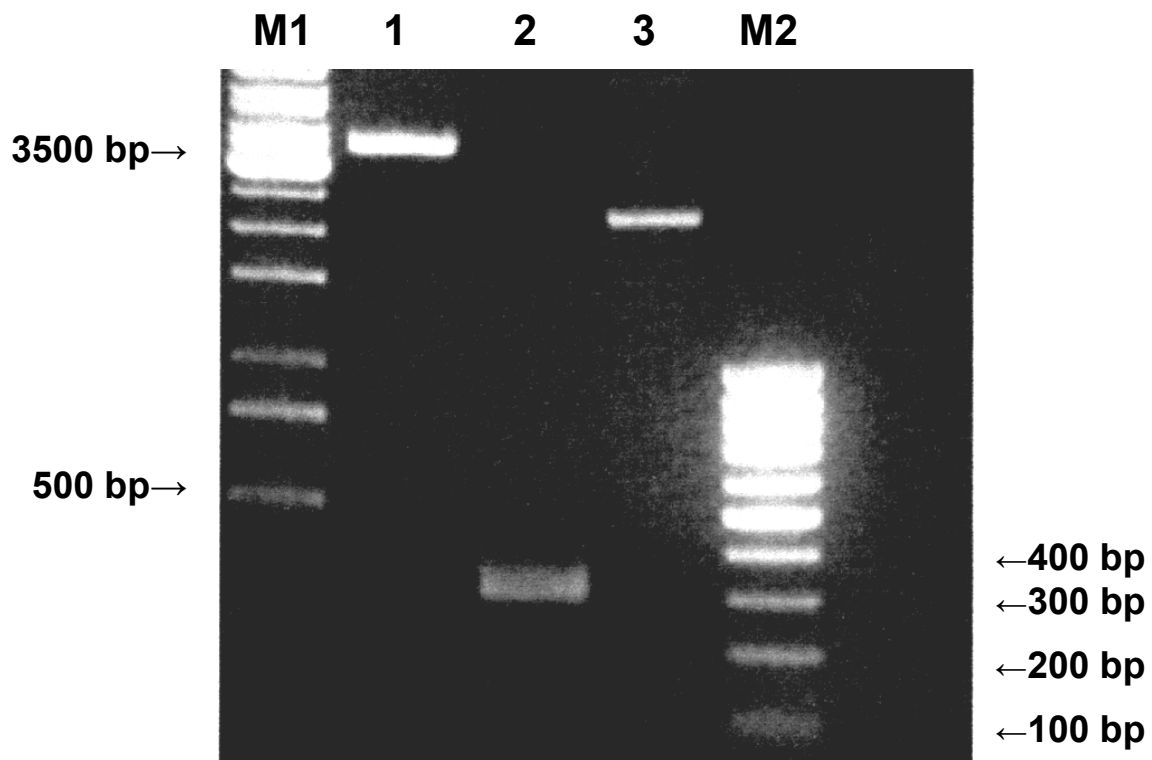


Abb. 11: Doppelrestriktion des Vektors pQE30 und des Dengue 1-Amplifikats für die Ligation.

Der Vektor pQE30 und das Dengue 1-Amplifikat wurden mit *Bam*HI und *Hind*III geschnitten und in einem 1%igen Agarosegel 35 min. bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde ungeschnittener Vektor mit aufgetragen. Fragmentgrößen: geschnittenes Dengue 1-Amplifikat: 300 bp, geschnittener Vektor: 3433 bp.

M1: 1 kb Marker.

1: 1 µg Vektor pQE30 geschnitten.

2: 500 ng Dengue 1-Amplifikat geschnitten.

3: 1 µg Vektor pQE30 ungeschnitten.

M2: Marker 100 bp Leiter.

Vor der Expression der rekombinanten Antigene wurden die Sequenzen der einzelnen Klone mit den Sequenzen ihrer Referenzstämme verglichen. Die Referenzsequenzen sind in der Genbank über das Internet öffentlich zugänglich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Genbank-Accession-Nummern aller sechs Viren sind im Material und Methoden-Teil dieser Arbeit aufgeführt.

Es zeigte sich, dass die klonierten Sequenzen korrekt in die Vektoren inseriert waren und mit den Referenzsequenzen in der B-Domänen-Region zu 96-98% übereinstimmten. Dieses entsprach einer Übereinstimmung von 98-100% auf Aminosäureebene. Im Vergleich mit den aus der Genbank erhaltenen Referenzsequenzen traten vereinzelt Nukleotidaustausche auf. Sie charakterisieren wahrscheinlich die spezifische Virusvariante in der Abteilung, da sie bei allen sequenzierten Klonen nachzuweisen waren.

Für die Dengue 1-Sequenz ergaben sich 13 Punktmutationen gegenüber dem Referenzstamm Dengue 1 Western Pacific. Nur drei dieser Mutationen hatten Einfluss auf die jeweilige codierte Aminosäure. Die Mutation an Position 154 hatte eine Änderung des Codons von TCC nach ACC zur Folge und resultierte in einem Aminosäureaustausch von Serin nach Threonin. Die Mutationen an den Positionen 244 und 246 veränderten das betroffenen Codon von GCG nach ACA und die Aminosäure von Alanin nach Threonin (Abbildung 12).

Die Dengue 2-Sequenz wies gegenüber dem Referenzstamm Dengue 2 New Guinea C sieben Punktmutationen auf. Alle Mutationen befanden sich an der dritten Stelle des betroffenen Codons und waren somit ohne Folgen für die Aminosäuresequenz (Abbildung 13).

Für die Dengue 3-Sequenz ergaben sich im Vergleich mit der Referenzsequenz Dengue 3 H87 zwei Punktmutationen an den Positionen 331 und 332, die ein einzelnes Codon betrafen und es von GGA zu CCA veränderten. Die Folge war ein Aminosäureaustausch von Glycin zu Prolin (Abbildung 14).

Die Dengue 4-Sequenz enthielt, verglichen mit dem Referenzstamm Thailand 1978 zehn Punktmutationen, von denen sich nur die an Position 223 auf Aminosäure-Ebene auswirkte. Sie veränderte das Codon AAT zu TAT und tauschte die Aminosäure Asparagin gegen Tyrosin aus (Abbildung 15).

Die Sequenz des West Nil-Klons ergab, verglichen mit dem Referenzstamm Wengler, zwei Punktmutationen ohne einen Aminosäureaustausch (Abbildung 16).

Die Sequenz des Japanischen Enzephalitis-Virus stimmte im Bereich der B-Domäne exakt mit ihrem Referenzstamm Nakayama überein (Abbildung 17).

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 |
| | | | | | | | | | | | | |
| WestPac | | | | | | | | | | <u>GTAATGTGCACAGGGTCATTCAAG</u> | | |
| Den1 | ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGTAATGTGCACAGGGTCATTCAAG | | | | | | | | | | | |
| | M R G S H H H H H G S V M C T G S F K | | | | | | | | | | | |
| | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 |
| | | | | | | | | | | | | |
| WestPac | TTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAAC TTTCTAGTGCAGGT TAAATACGAA | | | | | | | | | | | |
| Den1 | TTAGAGAAGGAAGTGGCTGAGACCCAGCATGGAAC TTTCTAGTGCAGGT CAAATACGAA | | | | | | | | | | | |
| | L E K E V A E T Q H G T V L V Q V K Y E | | | | | | | | | | | |
| | 125 | 130 | 135 | 140 | 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 |
| | | | | | | | | | | | | |
| WestPac | GGAACAGATGCACCATGCAAGATCCCCCTTCTCGTCCCAAGATGAGAAGGGAGTAACCCAG | | | | | | | | | | | |
| Den1 | GGAACAGATGC GCCATGCAAGATCCCCCTT TCG ACCCAAGATGAGAA AGGAGTAG CCCAG | | | | | | | | | | | |
| | G T D A P C K I P F S S » T Q D E K G V T Q | | | | | | | | | | | |
| | 185 | 190 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 |
| | | | | | | | | | | | | |
| WestPac | AATGGGAGATTGATAACAGCCAACCCCATAGTCACTGACAAAGAAAAACCAGTCAACATT | | | | | | | | | | | |
| Den1 | AATGGGAGATTGATAACAGCCAAT CCCCATAGTCACTGACAAAGAAAAACCAGTCAACATT | | | | | | | | | | | |
| | N G R L I T A N P I V T D K E K P V N I | | | | | | | | | | | |
| | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 |
| | | | | | | | | | | | | |
| WestPac | GAAGCGGAGCCACCTTTTGGTGAGAGCTACATTGTGGTAGGAGCAGGTGAAAAAGCTTTG | | | | | | | | | | | |
| Den1 | GA GACAGA CCACCTTTTGGTGAGAGCTACATTGTGGTAGGAGCAGGTGAAAAAGCTTTG | | | | | | | | | | | |
| | E A » T E P P F G E S Y I V V G A G E K A L | | | | | | | | | | | |
| | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | 360 |
| | | | | | | | | | | | | |
| WestPac | AAACTAAGCTGGTTCAAGAAGGGAAGCAGT~~~~~ | | | | | | | | | | | |
| Den1 | AAACTAAGCTGGTTCAAGAAGGGAAGCAGTGGAGCTCGGTACCCCGGGTTCGACCTGCAGCC | | | | | | | | | | | |
| | K L S W F K K G S S E L G T P G R P A A | | | | | | | | | | | |
| | 365 | 370 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| WestPac | ~~~~~ | | | | | | | | | | | |
| Den1 | AAGCTTAATTAG | | | | | | | | | | | |
| | K L N * | | | | | | | | | | | |

Abb. 12: Sequenz des Klons Dengue 1.

Die Sequenz des Klons ist verglichen mit der des Referenzstammes Western Pacific (Genbank-Accession-Nr. U88535). Der primerbindende bzw. zu den Primern revers komplementäre Teil der Referenzsequenz ist unterstrichen. Die Punktmutationen in der Sequenz des Klons sind blau und unterstrichen hervorgehoben. Aminosäureaustausche sind fett rot gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die von der Vektorsequenz codiert werden, sind grau unterlegt.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NewGuineaC | | | | | | | | | <u>TCATACTCTATGTGCACAGGAAAG</u> | | | | | | | | | | | |
| Den2 | ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCTCATACTCTATGTGCACAGGAAAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | M | R | G | S | H | H | H | H | G | S | S | Y | S | M | C | T | G | K | | |
| | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NewGuineaC | TTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGTACAA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den2 | TTTAAAGTTGTGAAGGAAATAGCAGAAACACAACATGGAACAATAGTTATCAGAGT <u>GCAA</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | F | K | V | V | K | E | I | A | E | T | Q | H | G | T | I | V | I | R | V | Q |
| | 125 | 130 | 135 | 140 | 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NewGuineaC | TATGAAGGGGACGGTCTCCATGTAAGATCCCTTTTGAGATAATGGATTTGGAAAAAAGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den2 | TATGAAGGGGACGG <u>C</u> TCTCCATG <u>C</u> AAGATCCCTTTTGAGATAATGGATTTGGAAAAAAGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Y | E | G | D | G | S | P | C | K | I | P | F | E | I | M | D | L | E | K | R |
| | 185 | 190 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NewGuineaC | CATGTTTTAGGTCGCCTGATTACAGTCAACCCAATCGTAACAGAAAAAGATAGCCCAGTC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den2 | CATGT <u>C</u> TTAGGTCGCCTGATTACAGTCAACCCAAT <u>TGTG</u> ACAGAAAAAGATAGCCCAGTC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | H | V | R | G | R | L | I | T | V | N | P | I | V | T | E | K | D | S | P | V |
| | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NewGuineaC | AACATAGAAGCAGAACCTCCATTTCGGAGACAGCTACATCATCATAGGAGTAGAGCCGGGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den2 | AACATAGAAGCAGAACCTCCATTTCGGAGACAGCTACATCATCATAGGAGTAGAGCCGGGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | N | I | E | A | E | P | P | F | G | D | S | Y | I | I | I | G | V | E | P | G |
| | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NewGuineaC | CAATTGAAGCTCAACTGGTTTAAAGAAAGGAAGTTCTATCGGC~~~~~ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den2 | CAA <u>C</u> TGAAGCTCAACTGGTTTAAAGAAAGGAAGTTCTATCGGCAAGCTTAATTAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Q | L | K | L | N | W | F | K | K | G | S | S | I | G | K | L | N | * | | |

Abb. 13: Sequenz des Klons Dengue 2.

Die Sequenz ist verglichen mit der des Referenzstammes New Guinea C (Genbank-Accession-Nr. AF038403). Der primerbindende bzw. zu den Primern revers komplementäre Teil der Referenzsequenz ist unterstrichen. Die Punktmutationen in der Sequenz des Klons sind blau und unterstrichen hervorgehoben. Die Aminosäuren, die von der Vektorsequenz codiert werden, sind grau unterlegt.

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|-----|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 |
| | | | | | | | | | | | | |
| H87 | | | | | | | | | <u>ATGAGCTATGCAATGTGCTTGAAT</u> | | | |
| Den3 | ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGAGCTATGCAATGTGCTTGAAT | | | | | | | | | | | |
| | M R G S H H H H H G S M S Y A M C L N | | | | | | | | | | | |
| | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 |
| | | | | | | | | | | | | |
| H87 | ACCTTTGTGTTGAAGAAAGAAGTCTCCGAAACGCAGCATGGGACAATACTCATTAAGGTT | | | | | | | | | | | |
| Den3 | ACCTTTGTGTTGAAGAAAGAAGTCTCCGAAACGCAGCATGGGACAATACTCATTAAGGTT | | | | | | | | | | | |
| | T F V L K K E V S E T Q H G T I L I K V | | | | | | | | | | | |
| | 125 | 130 | 135 | 140 | 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 |
| | | | | | | | | | | | | |
| H87 | GAGTACAAAGGGGAAGATGCACCCTGCAAGATTCCTTTCTCCACGGAGGATGGACAAGGG | | | | | | | | | | | |
| Den3 | GAGTACAAAGGGGAAGATGCACCCTGCAAGATTCCTTTCTCCACGGAGGATGGACAAGGG | | | | | | | | | | | |
| | E T K G E D A P C K I P F S T E D G Q G | | | | | | | | | | | |
| | 185 | 190 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 |
| | | | | | | | | | | | | |
| H87 | AAAGCTCACAATGGCAGACTGATCACAGCCAATCCAGTGGTGACCAAGAAGGAGGAGCCT | | | | | | | | | | | |
| Den3 | AAAGCTCACAATGGCAGACTGATCACAGCCAATCCAGTGGTGACCAAGAAGGAGGAGCCT | | | | | | | | | | | |
| | K A H N G R L I T A N P V V T K K E E P | | | | | | | | | | | |
| | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 |
| | | | | | | | | | | | | |
| H87 | GTCAACATTGAGGCTGAACCTCCTTTTGGGGAAAGTAATATAGTAATTGGAATTGGAGAC | | | | | | | | | | | |
| Den3 | GTCAACATTGAGGCTGAACCTCCTTTTGGGGAAAGTAATATAGTAATTGGAATTGGAGAC | | | | | | | | | | | |
| | V N I E A E P P F G E S N I V I G I G N | | | | | | | | | | | |
| | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | |
| | | | | | | | | | | | | |
| H87 | AAAGCCCTGAAAATCAACTGGTACAGGAAGGGAAGCTCGATTGGGAA~~~~~ | | | | | | | | | | | |
| Den3 | AAAGCCCTGAAAATCAACTGGTACAGGAAG <u>CCA</u> AGCTCGATTGGGAAAGCTTAATTAG | | | | | | | | | | | |
| | K A L K I N W Y R K G>P S S I G K L N * | | | | | | | | | | | |

Abb. 14: Sequenz des Klons Dengue 3.

Die Sequenz ist verglichen mit der des Referenzstammes H 87 (Genbank-Accession-Nr. M93130). Der primerbindende bzw. zu den Primern revers komplementäre Teil der Referenzsequenz ist unterstrichen. Die Punktmutationen in der Sequenz des Klons sind blau und unterstrichen hervorgehoben. Aminosäureaustausche sind fett rot gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die von der Vektorsequenz codiert werden, sind grau unterlegt.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|-----|---|----------|------------|----------|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thai78 | | | | | | | | | <u>TCATACACGATGTGCTCAGGAAAG</u> | | | | | | | | | | | |
| Den4 | ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCTCATAACGATGTGCTCAGGAAAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | M | R | G | S | H | H | H | H | G | S | S | Y | T | M | C | S | G | K | | |
| | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thai78 | TTCTCAATTGATAAAGAGATGGCAGAAACACAGCATGGGACAACAGTGGTAAAAGTCAAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den4 | TTCTCAATTGACAAAGAGATGGCAGAAACACAGCATGGGACAACAGTGGTAAAAGTCAAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | F | S | I | D | K | E | M | A | E | T | Q | H | G | T | T | V | V | K | V | K |
| | 125 | 130 | 135 | 140 | 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thai78 | TATGAAGGTGCTGGAGCTCCATGTAAAGTCCCCATAGAGATAAGAGATGTGAACAAGGAA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den4 | TATGAGGGTGCTGGAGCTCCATGTAAAGTCCCCATAGAGATAAGAGATGTGAACAAGGAA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Y | E | G | A | G | A | P | C | K | V | P | I | E | I | R | D | V | N | K | E |
| | 185 | 190 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thai78 | AAAGTGGTTGGGCGTATCATCTCATCTACCCCTTTTGCTGAGAATACCAACAGTGTGACC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den4 | AAAGTGGT <u>AGGGCGTATCATCTCATCTACCCCTTTTGCTGAGT</u> <u>TATACCAACAGTGT</u> <u>AACC</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | K | V | V | G | R | I | I | S | S | T | P | F | A | E | N»Y | T | N | S | V | T |
| | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thai78 | AATATAGAATTGGAACCCCTTTTGGGGATAGCTACATAGTAATAGGTGTAGGAGACAGT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den4 | AA <u>CATAGAATT</u> <u>AGAACCCCTTTTGGGGATAGCTACATAGTAATAGGTGT</u> <u>TGGAGACAGT</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | N | I | E | L | E | P | P | F | G | D | S | Y | I | V | I | G | V | G | D | S |
| | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Thai78 | GCATTAACACTCCATTGGTTCAGGAAAGGGAGCTCCATT~~~~~ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Den4 | GCATTAACACTCCATTGGTTCAGGAAAGGGAGCTCCATTAAGCTTAATTAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | A | L | T | L | H | W | F | R | K | G | S | S | I | <u>K</u> | <u>L</u> | <u>N</u> | * | | | |

Abb. 15: Sequenz des Klons Dengue 4.

Die Sequenz ist verglichen mit der des Referenzstammes Thailand 1978 (Genbank-Accession-Nr. U18441). Der primerbindende bzw. zu den Primern revers komplementäre Teil der Referenzsequenz ist unterstrichen. Die Punktmutationen in der Sequenz des Klons sind blau hervorgehoben und unterstrichen. Aminosäureaustausche sind fett rot gekennzeichnet. Die Aminosäuren, die von der Vektorsequenz codiert werden, sind grau unterlegt.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WestNile | ATGGATATCGGAATTAATTCGGATCCGAATTCGACAACAACATATGGAGTATGTTCAAAA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WN | <u>ACAACATATGGAGTATGTTCAAAA</u> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | M | D | I | G | I | N | S | D | P | N | S | S | T | T | Y | G | V | C | S | K |
| | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WestNile | GCGTTCAAATTCGCTAGGACTCCCGCTGACACTGGCCACGGAACGGTGGTGTGGAACTG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WN | GCGTTCAAATTCGCTAGGACTCCCGCTGACACTGGCCACGGAACGGTGGTGT <u>AGA</u> ACTG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | A | F | K | F | A | R | T | P | A | D | T | G | H | G | T | V | V | L | E | L |
| | 125 | 130 | 135 | 140 | 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WestNile | CAATATACCGGAACAGACGGTCCCTGCAAAGTGCCCATTTCTTCCGTAGCTTCCCTGAAT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WN | CAATATACCGGAACAGACGG <u>A</u> CCCTGCAAAGTGCCCATTTCTTCCGTAGCTTCCCTGAAT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Q | Y | T | G | T | D | G | P | C | K | V | P | I | S | S | V | A | S | L | N |
| | 185 | 190 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WestNile | GACCTCACACCTGTTGGAAGACTGGTGACCGTGAATCCATTTGTGTCTGTGGCCACAGCC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WN | GACCTCACACCTGTTGGAAGACTGGTGACCGTGAATCCATTTGTGTCTGTGGCCACAGCC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | D | L | T | P | V | G | R | L | V | T | V | N | P | F | V | S | V | A | T | A |
| | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WestNile | AACTCGAAGGTTTTGATTGAACTCGAACCCCGTTTTGGTGACTCTTACATCGTGGTGGGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WN | AACTCGAAGGTTTTGATTGAACTCGAACCCCGTTTTGGTGACTCTTACATCGTGGTGGGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | N | S | K | V | L | I | E | L | E | P | P | F | G | D | S | Y | I | V | V | G |
| | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | 360 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WestNile | AGAGGAGAACAGCAGATAAACCATCACTGGCACAAATCT~~~~~ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WN | AGAGGAGAACAGCAGATAAACCATCACTGGCACAAATCTCTCGAGCACCACCACCACCAC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | R | G | E | Q | Q | I | N | H | H | W | H | K | S | L | E | H | H | H | H | H |
| | 365 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WestNile | ~~~~~ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WN | CACTGA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | H * | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Abb. 16: Sequenz des Klons WN.

Die Sequenz ist verglichen mit der des Referenzstammes West Nile Wengler (Genbank-Accession-Nr. M12294). Der primerbindende bzw. zu den Primern revers komplementäre Teil der Referenzsequenz ist unterstrichen. Die Punktmutationen in der Sequenz des Klons sind blau hervorgehoben und unterstrichen. Die Aminosäuren, die von der Vektorsequenz codiert werden, sind grau unterlegt.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------------|-----|-----|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nakayama | | | | | | | | | <u>ATGTGTACAGAAAAATTCTCGTTC</u> | | | | | | | | | | | |
| JE | ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGTGTACAGAAAAATTCTCGTTC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | M | R | G | S | H | H | H | H | G | S | M | C | T | E | K | F | S | F | | |
| | 65 | 70 | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 100 | 105 | 110 | 115 | 120 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nakayama | GCGAAAAATCCGGTGGACACTGGTCACGGAACAGTTGTCATTGAACTCTCCTACTCTGGG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JE | GCGAAAAATCCGGTGGACACTGGTCACGGAACAGTTGTCATTGAACTCTCCTACTCTGGG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | A | K | N | P | V | D | T | G | H | G | T | V | V | I | E | L | S | Y | S | G |
| | 125 | 130 | 135 | 140 | 145 | 150 | 155 | 160 | 165 | 170 | 175 | 180 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nakayama | AGTGATGGCCCCTGCAAAATTCCGATTGTTTCCGTTGCGAGCCTCAATGACATGACCCCC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JE | AGTGATGGCCCCTGCAAAATTCCGATTGTTTCCGTTGCGAGCCTCAATGACATGACCCCC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | S | D | G | P | C | K | I | P | I | V | S | V | A | S | L | N | D | M | T | P |
| | 185 | 190 | 195 | 200 | 205 | 210 | 215 | 220 | 225 | 230 | 235 | 240 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nakayama | GTTGGGCGGCTGGTGACAGTGAACCCCTTCGTGCGGACTTCCAGTGCCAACTCAAAGGTG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JE | GTTGGGCGGCTGGTGACAGTGAACCCCTTCGTGCGGACTTCCAGTGCCAACTCAAAGGTG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | V | G | R | L | V | T | V | N | P | F | V | A | T | S | S | A | N | S | K | V |
| | 245 | 250 | 255 | 260 | 265 | 270 | 275 | 280 | 285 | 290 | 295 | 300 | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nakayama | CTGGTCGAGATGGAACCCCTTCGGGAGACTCCTACATCGTAGTTGGAAGGGGAGACAAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JE | CTGGTCGAGATGGAACCCCTTCGGGAGACTCCTACATCGTAGTTGGAAGGGGAGACAAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | L | V | E | M | E | P | P | F | G | D | S | Y | I | V | V | G | R | G | D | K |
| | 305 | 310 | 315 | 320 | 325 | 330 | 335 | 340 | 345 | 350 | 355 | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nakayama | <u>CAGATCAACCACCATTTGG</u> ~~~~~ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| JE | CAGATCAACCACCATTTGGAAGCTTAATTAG | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Q | I | N | H | H | W | K | L | N | * | | | | | | | | | | |

Abb. 17: Sequenz des Klons JE.

Die Sequenz ist verglichen mit der Referenzsequenz Nakayama (Genbank-Accession-Nr. U3694). Der primerbindende bzw. zu den Primern revers komplementäre Teil der Referenzsequenz ist unterstrichen. Die Aminosäuren, die von der Vektorsequenz codiert werden, sind grau unterlegt. Die Sequenzen stimmen vollständig überein.

3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter viraler Antigene

Alle sequenzierten Klone wurden in Vorversuchen in einem kleinvolumigen Ansatz (4 ml) auf die Expression der jeweiligen Dengue-B-Domäne untersucht. Nach der Induktion wurden die Zellen lysiert und das Lysat durch Zentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Beides wurde mit einer SDS-PAGE analysiert. Für die exprimierten B-Domänen wurden folgende Größen errechnet:

| | |
|-------------------------|-----------|
| Dengue 1 | 13,5 kDa |
| Dengue 2 | 12,9 kDa |
| Dengue 3 | 13,0 kDa |
| Dengue 4 | 12,8 kDa |
| West Nil | 13,3 kDa |
| Japanische Enzephalitis | 12,0 kDa. |

Alle sechs Klone exprimierten ein Protein der gewünschten Größe. Die sechs Proteine fanden sich regelmäßig als Einschlusskörper im Sediment. Bereits beim Auftragen des unaufgereinigten Zellsediments auf ein SDS-Polyacrylamidgel waren die Proteine aufgrund ihrer Menge deutlich erkennbar. Um das bakterielle Wachstum zu verlangsamen, die Einschlusskörperbildung zu verhindern und die Proteine in löslicher Form im Überstand zu erhalten, wurde eine Expression aller Proteine bei RT und ü. N. durchgeführt. Jedoch konnte lediglich bezüglich des West Nil/pET22b-Konstruktes etwa 1/3 der Proteinmenge löslich im Überstand erhalten werden. Für die pQE30-Konstrukte ergab sich keine Änderung der Expressionsrate und eine nur geringe Änderung des Proteinverhältnisses von Überstand und Sediment (maximal 1/10 der Proteinmenge fand sich löslich im Überstand).

Die N-terminale pelB-Signalsequenz im Vektor pET22b codiert für ein Signalpeptid, das die Sekretion des Proteins in den periplasmatischen Raum bewirkt und nach dem erfolgten Übertritt vom Protein abgespalten wird. Daher war

im Falle des West Nil/pET22b-Konstruktes zu erwarten, dass das Protein im periplasmatischen Raum zu finden sein würde. Das West Nil-Antigen wurde jedoch nicht sezerniert, sondern lag nach der Expression überwiegend in Einschlusskörpern vor, wie die SDS-PAGE des Überstands und des wasserunlöslichen Sediments zeigte (Abbildung 18).

Um die Expression der rekombinanten viralen Antigene zu optimieren, wurden zwei Parameter getestet: Die IPTG-Menge wurde zwischen 0,2 mM und 2 mM variiert. Die Menge der exprimierten Proteine veränderte sich hierdurch nicht. Eine Verlängerung der Induktionsdauer von 3 h auf 4, 5 und 6 h (bei 37°C und 0,2 mM IPTG) führte nur zu einer sehr geringen Steigerung der Expressionsrate (Daten nicht gezeigt). Für die Induktion wurde daher einheitlich für alle Konstrukte nach Methode 2.3.5 vorgegangen (Induktion bei 37°C mit 0,2 mM IPTG, Expressionsdauer 3 h bei 37°C).

Das West Nil-Protein ließ sich nach der Induktion ü. N. bei RT durch eine Metall-Chelat-Chromatographie unter nativen Bedingungen (2.4.6) problemlos aufreinigen. Hingegen trat bei den pQE30-Konstrukten das Problem auf, daß die nativen Proteine nicht an die Säulenmatrix banden oder mit dem ersten Waschen sofort von der Säule gespült wurden. Auch durch die Variation der Wasch- und Elutionsparameter sowie die Verwendung einer anderen Matrix (Chelating Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Erlangen) konnten keine Proteine aufgereinigt werden. Selbst nach Aufkonzentrieren der Eluate mittels Ultrafiltration (Centricon-Röhrchen, Millipore, Eschborn) und anschließender Silberfärbung ließ sich im Eluat kein Protein nachweisen.

Im Gegensatz dazu gelang die denaturierende Aufreinigung für alle Proteine ohne Schwierigkeiten. Die Proteine wurden zwischen pH-Werten von pH 4,5 und pH 2,5 in 7 M Harnstoffpuffer von der Säule eluiert. Für den Immunoblot wurden nur die pH 4,5 bis pH 3-Fractionen der Antigene verwendet. Um den Gesamttablauf zu vereinheitlichen, wurden in der Folge alle Proteine denaturierend nach Methode 2.4.7 aufgereinigt. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die Säulenfraktionen der

Aufreinigung des Dengue 1-Antigens in der SDS-PAGE. Im nichtaufgereinigten Harnstoff-Lysat ist das überexprimierte Protein bereits sichtbar (Abb. 19, Spur 2). Es wird bei einem pH-Wert von 3,0 von der Säule eluiert (Abb.19, Spuren 9 und 10). Entsprechendes wurde für die anderen fünf Proteine beobachtet. Der pH-Wert, bei dem die Proteine von der Säule eluiert wurden, schwankte im oben erwähnten Bereich.

Die Proteinmenge pro Aufreinigung variierte von Klon zu Klon: In einer typischen Aufreinigung ließ sich etwa 2-4 mg Protein/l Zellkultur erhalten. Die Dengue 2- und Dengue 4-Klone lieferten generell eine geringere Proteinmenge als beispielsweise der Dengue 1-Klon. Die größten Proteinmengen exprimierten der West Nil- und der Japanische Enzephalitis-Klon. Abbildung 20 zeigt die aufgereinigten Proteine von Dengue 4-Virus und Dengue 1-Virus nach der Coomassie- bzw. Silberfärbung. Lediglich die Silberfärbung zeigt unterhalb der Monomer-Bande des Dengue 1-Proteins sehr geringe Mengen proteolytischer Abbauprodukte bzw. Verunreinigungen (Abb. 20, A). Mit der Coomassie-Färbung waren generell keinerlei Verunreinigungen des Proteins (hier gezeigt: Dengue 4-Protein) sichtbar (Abb.20, B)

Um später die Färbungsintensität der einzelnen Banden im Immunoblot vergleichen zu können, wurde die Proteinmenge für den Western Blot auf 200 µg je Blot eingestellt. Die Proteinbestimmung nach Lowry oder nach Bradford schied aus, weil die Proteine in 7 M Harnstoff vorlagen und außerdem in variablen Anteilen Dimere und Trimere bildeten. Die einzig geeignete Methode war daher das Image Quanting (verwendete Programme unter 2.4.8 angegeben) der monomeren Banden im Coomassie-Gel. Abbildung 21 zeigt die SDS-PAGE und Coomassie-Färbung aller sechs Proteine mit Lysozym als Mengenstandard für das Image Quanting.

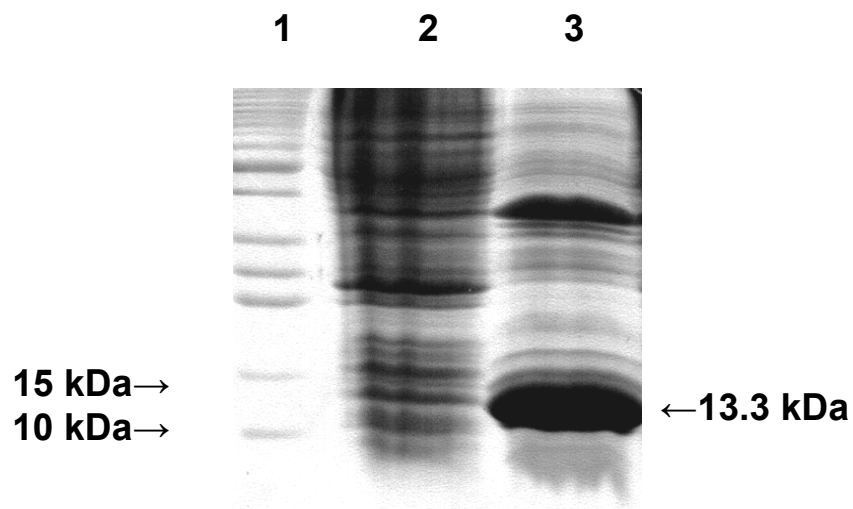


Abb. 18: Proteinverteilung in Sediment und Überstand.

Das West Nil-Protein wurde exprimiert wie unter 2.3.5 beschrieben. Die Bakterien wurden sedimentiert, sonifiziert, und das erhaltene Lysat erneut abzentrifugiert (2.4.6). Nach der Zentrifugation wurden Sediment und Überstand getrennt in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel auf die Expression des West Nil-Proteins untersucht.

1: 20 µl Proteinmarker

2: 40 µl Überstand

3: 10 µl Sediment.

Gellauf 190 V, 2h.

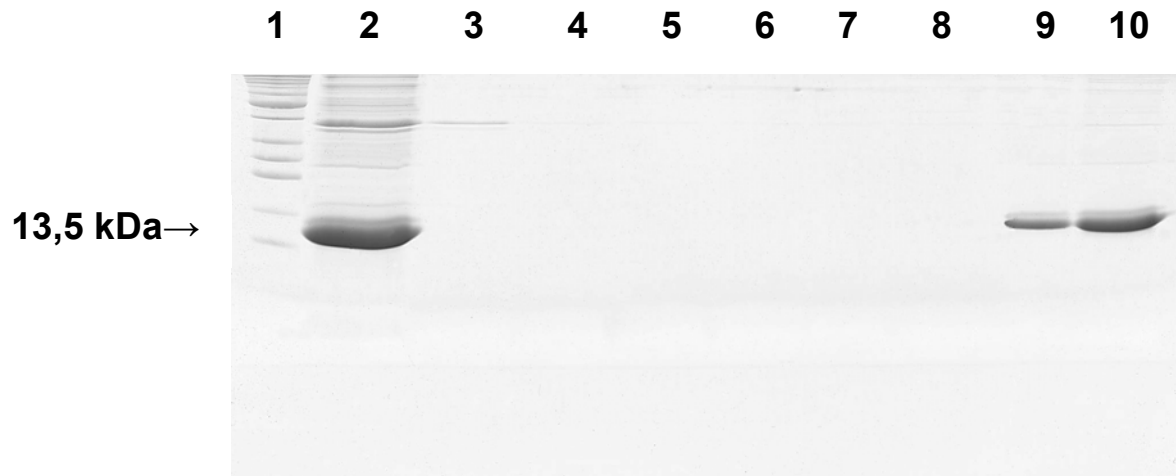


Abb. 19: Säulenfraktionen der Metall-Chelat-Chromatographie.

Das Dengue 1-Protein wurde in *E. coli* exprimiert (2.3.5) und über Metall-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (2.4.7). Je 40 μ l der verschiedenen Säulenfraktionen wurden auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und 2 h bei 190 V aufgetrennt.

1: Proteinmarker

2: auf die Säule aufgetragenes Lysat

3: Säulendurchlauf

4: Waschdurchlauf 1

5: Waschdurchlauf 2

6: Eluat pH 5,0

7 und 8: Eluat pH 4,0

9 und 10: Eluat pH 3,0

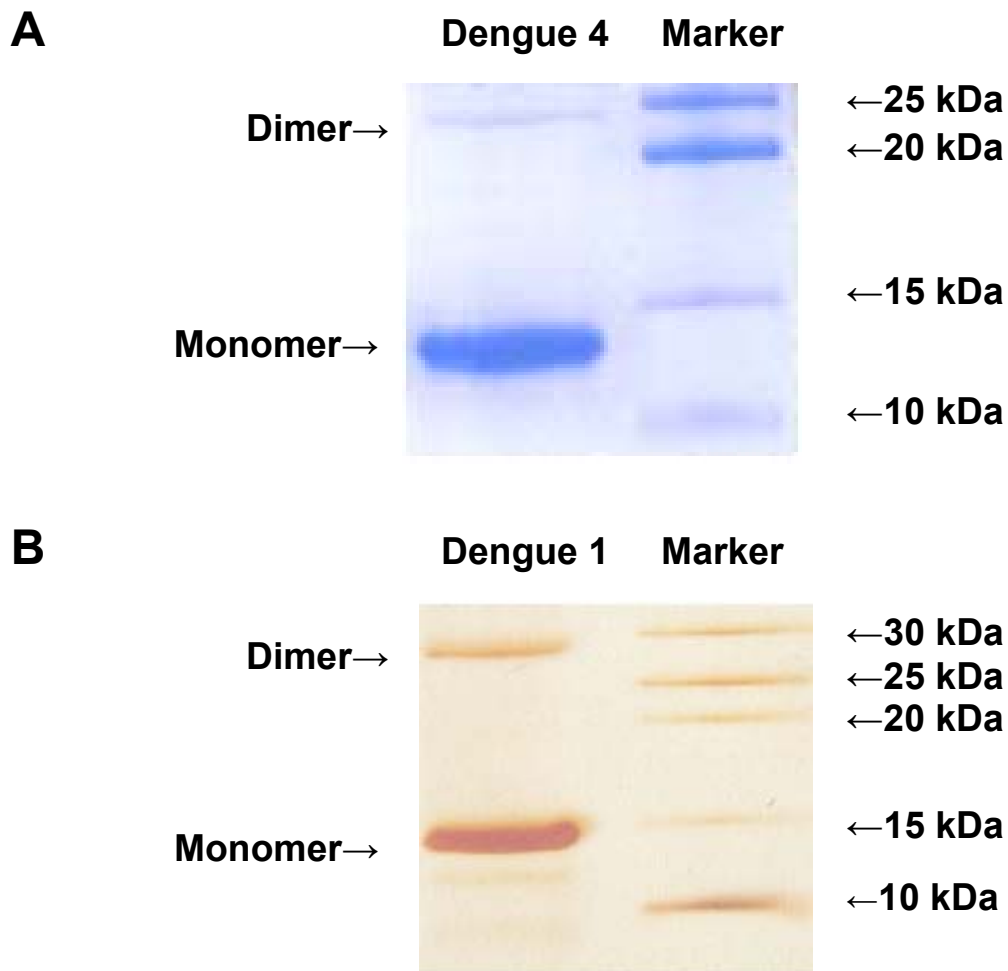


Abb. 20: Dengue 4- und Dengue 1-Proteine nach der Aufreinigung.

Die Proteine wurden in *E. coli* exprimiert (2.3.5) und über Metall-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (2.4.7). Anschließend wurde ein Aliquot auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und 2 h bei 190 V aufgetrennt.

A: Coomassiefärbung (2.4.2) des aufgereinigten Dengue 4-Proteins. Dengue 4: 5 µg Dengue 4-Protein; Marker: Proteinmarker.

B: Silberfärbung (2.4.3) des aufgereinigten Dengue 1-Proteins. Dengue 1: 1 µg Dengue 1-Protein; Marker: Proteinmarker.

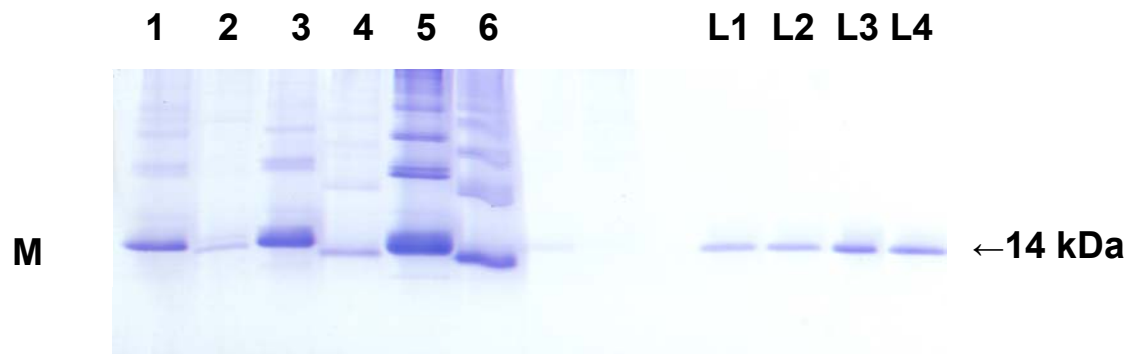


Abb. 21: Coomassie-Färbung zur Quantifizierung der sechs gereinigten Proteine.

Alle sechs Proteine wurden durch Metall-Chelat-Chromatographie aufgereinigt (2.4.7) und jeweils 20 μ l des Eluats zur Quantifizierung auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Verschiedene Mengen Lysozym (14 kDa groß) dienten als Mengen- und Größenstandard.

1: Dengue 1-Protein

2: Dengue 2-Protein

3: Dengue 3-Protein

4: Dengue 4-Protein

5: West Nil-Protein

6: Japanisches Enzephalitis-Protein

L1: Lysozym 1 μ g

L2: Lysozym 1 μ g

L3: Lysozym 2 μ g

L4: Lysozym 2 μ g

M: Monomere

D: Dimere, weitere Multimere der Proteine sind im oberen Gelbereich sichtbar.

3.4 Nachweis der Reaktivität der Antigene mit monoklonalen Antikörpern

In den ersten Immunoblot-Experimenten reagierte das West Nil-Antigen mit dem monoklonalen Antikörper (mAb) 15R4, die Reaktion fand jedoch nur unter nichtreduzierenden Bedingungen statt. Für die Aufreinigung und die Handhabung der Antigene wurden daher nichtreduzierende Bedingungen gewählt. Die Reaktivität des West-Nil-Antigens konnte mit mAb 15R4 bewiesen werden. Die fünf anderen Antigene reagierten nicht mit dem monoklonalen Antikörper. Abbildung 22 zeigt die Reaktion des West Nil-Antigens mit mAb 15R4 im Immunoblot.

Das Dengue 2-Antigen wurde mit den drei Dengue 2-spezifischen monoklonalen Antikörpern 3H5-1, 2H3 und 6B6 getestet. Der mAb 3H5-1 erkennt ein lineares Epitop, mAb 6B6 dagegen ein konformationelles. Die Bindungsstelle von mAb 2H3 im E-Protein ist nicht genau bekannt.

Das Antigen reagierte mit mAb 3H5-1 und mAb 6B6, nicht jedoch mit mAb 2H3. Alle anderen fünf Antigene reagierten mit keinem der drei monoklonalen Antikörper. Die Reaktion des Dengue 2-Antigens mit dem monoklonalen Antikörper 3H5-1 war stärker als die Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper 6B6. (Abbildung 23).

Für die anderen drei Dengue-Antigene standen keine typenspezifischen monoklonalen Antikörper zur Verfügung.

Die Antigenität des Japanischen Enzephalitis-Antigens konnte bisher nicht bewiesen werden, da leider kein entsprechender Antikörper und auch kein Patientenserum zur Verfügung stand. Vor diesem Hintergrund kann das Antigen nur mit Einschränkung als zusätzliche interne Negativkontrolle auf den Teststreifen betrachtet werden.

15R4 Neg.

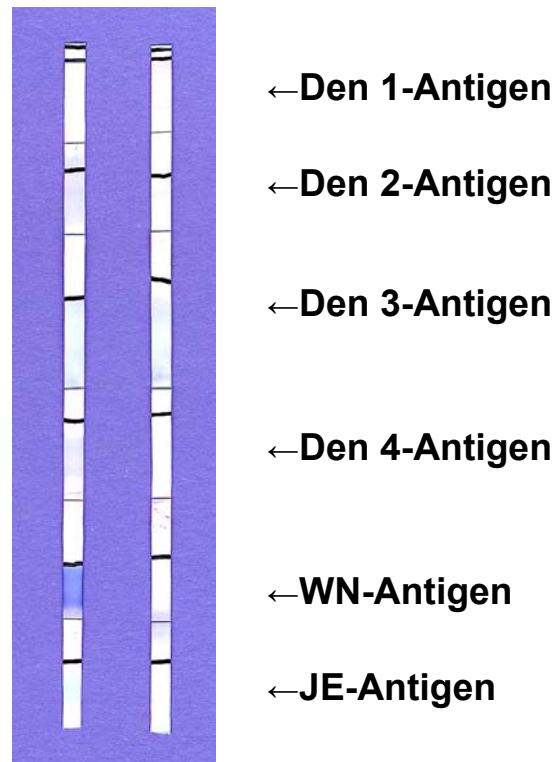


Abb. 22: Immunoblot der Antigene mit dem monoklonalen Antikörper 15R4.

Die sechs Antigene wurden mit der SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt (2.4.1) und auf Nitrozellulose geblottet (2.4.9). Die Nitrozellulose wurde in Teststreifen geschnitten wie unter Methode 2.4.11 angegeben. Auf jedem Teststreifen befinden sich sechs Antigene. Sie sind mit schwarzem Kugelschreiber am oberen Rand angezeichnet. Die Reaktivität der Antigene mit dem monoklonalen Antikörper 15R4 wurde im Immunoblot untersucht (2.4.12). Als sekundärer Antikörper wurde Ziege-anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase (1:1000) verwendet.

15R4: Immunoblot mit mAB 15R4

Neg.: Immunoblot ohne 1. Antikörper.

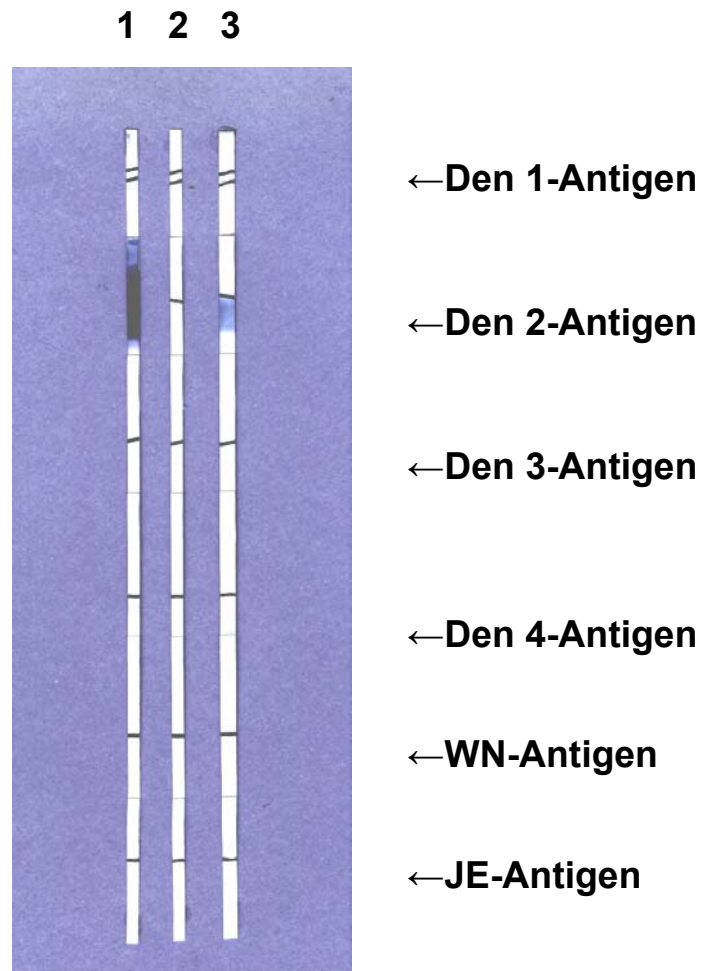


Abb. 23: Immunoblot der Antigene mit den monoklonalen Antikörpern 3H5-1, 2H3 und 6B6.

Die sechs Antigene wurden mit der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (2.4.1) und auf Nitrozellulose geblottet (2.4.9). Die Nitrozellulose wurde in Teststreifen geschnitten wie unter Methode 2.4.11 angegeben. Auf jedem Teststreifen befinden sich sechs Antigene. Sie sind mit schwarzem Kugelschreiber am oberen Rand angezeichnet. Die Reaktivität der Antigene mit den drei Dengue 2-spezifischen monoklonalen Antikörpern 3H5-1, 2H3 und 6B6 (1:200) wurde im Immunoblot untersucht (2.4.12). Als sekundärer Antikörper wurde Ziege-anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase (1:1000) verwendet.

1: Immunoblot mit mAB 3H5-1

2: Immunoblot mit mAB 2H3

3: Immunoblot mit mAB 6B6.

3.5. Test der Patientenseren im Immunoblot

Dengue-Patientenseren aus Vietnam, Dengue-Seren von Touristen nach Tropenaufenthalt und West Nil-Seren wurden im Immunoblot getestet. Die Dengue-Seren waren als gepaarte Seren wie folgt charakterisiert worden: Der Denguevirus-Serotyp der Seren war in den frühen Seren durch 5'-Nuclease-PCR bestimmt worden (2.3.11). Die IgM-Titer der Seren waren durch einen μ -capture-ELISA (2.4.5) bestimmt worden, ihre IgG-Titer durch indirekte Immunfluoreszenz (2.2.4). Bei den West Nil-Seren handelte es sich um durch RT-PCR und Sequenzierung gesicherte West-Nil-Infektionen (Berthet, 1997). Ihre IgG-Titer wurden mit der indirekten Immunfluoreszenz (2.2.4) bestimmt.

Auf jedem Immunoblot-Teststreifen befanden sich insgesamt sechs Antigene: die vier verschiedenen Dengue-B-Domänen, die West Nil-B-Domäne und die Japanische Enzephalitis-B-Domäne. Beide zuletzt genannten Proteine dienten als interne Negativkontrollen, da weder in der Gruppe der Touristen noch bei den Patienten aus Vietnam Antikörper gegen West Nil-Virus und Japanisches Enzephalitis-Virus zu erwarten waren.

Unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigten alle vier Dengue-Antigene eine starke homologe Reaktion mit den entsprechenden Seren von Dengue 1-, 2-, 3-, oder 4-infizierten Patienten. Beide Kontroll-Antigene (West Nil-Antigen und Japanisches Enzephalitis-Antigen) waren negativ. Vier Serumproben von West Nil-infizierten Patienten reagierten hingegen ausschließlich mit dem West Nil-Antigen, allerdings in einem Fall mit einer grenzwertigen Beteiligung des Dengue 2-Antigens. Abbildung 24 zeigt den Immunoblot der Antigene mit den verschiedenen Dengue- und West Nil-Seren.

Eines der Dengue 1-positiven Seren wurde getitert. Dieses Serum besaß in der IgG-Immunfluoreszenz einen Titer von 1:80. Im Immunoblot konnte bis zu einer Serumverdünnung von 1:3200 eine Farbreaktion mit dem Dengue 1-Antigen festgestellt werden (Abbildung 25).

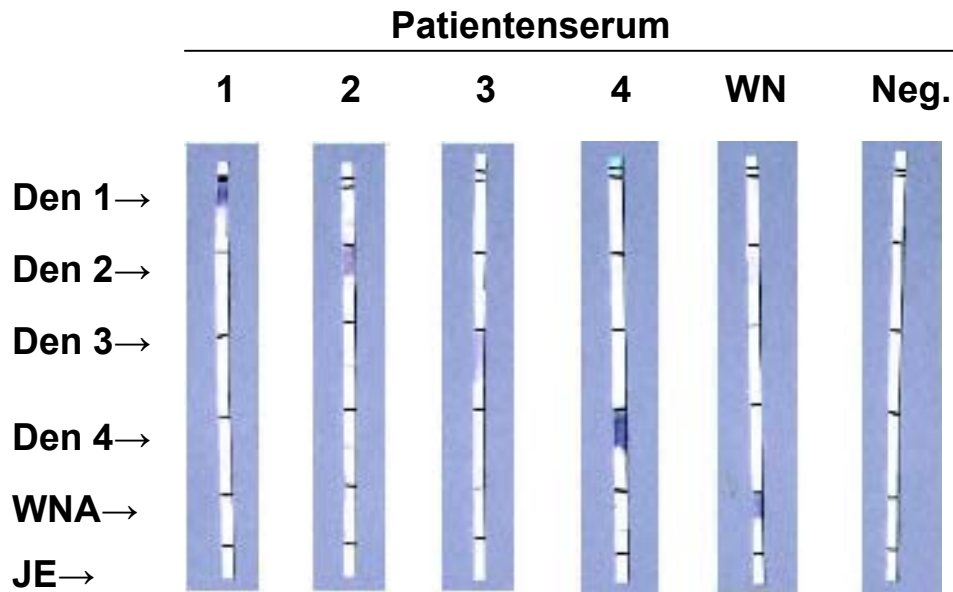


Abb. 24: Immunoblot der B-Domänen-Antigene mit Patientenserum.

Alle rekombinanten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert (2.3.5), mit der Metall-Chelat-Chromatographie aufgereinigt (2.4.7) und in einer SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt (2.4.1). Die Proteine wurden auf Nitrozellulose geblottet und die monomeren Banden zusammengeklebt, so dass sich auf jedem Teststreifen sechs Antigene befanden (Den 1, Den 2, Den 3, Den 4, WNA: West Nil-Antigen und JE: Japanisches Enzephalitis-Antigen). Durch 5'-Nuclease-PCR charakterisierte Dengue- und West Nil-Seren wurden im Immunoblot mit den Antigenen auf den Teststreifen getestet. Zur besseren Identifizierung der Proteinbanden wurde der obere Rand der Bande mit schwarzem Kugelschreiber angezeichnet. Die Dengue 1-Bande wurde als oberste Bande zweifach angezeichnet.

1: Serum eines Patienten mit definierter Dengue 1-Infektion.

2: Serum eines Patienten mit definierter Dengue 2-Infektion.

3: Serum eines Patienten mit definierter Dengue 3-Infektion.

4: Serum eines Patienten mit definierter Dengue 4-Infektion.

WN: West Nil-positives Serum.

Neg.: Serum ohne Flavivirus-Antikörper.

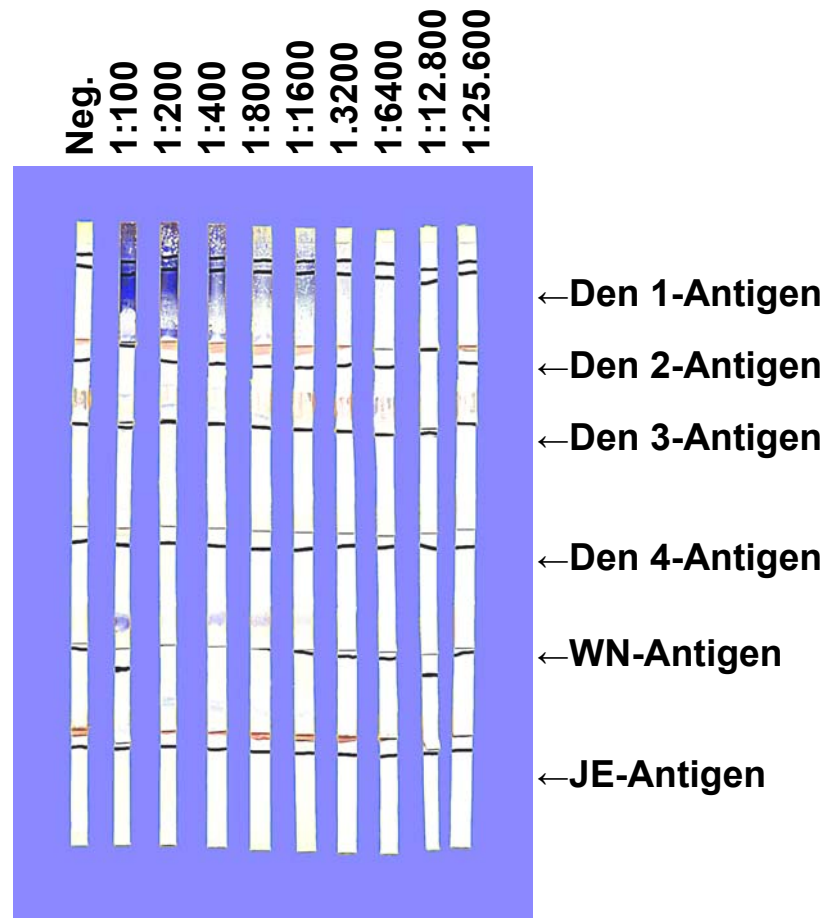


Abb. 25: Titerbestimmung eines Dengue 1-positiven Serums im Immunoblot.

Die über Metall-Chelat-Chromatographie (2.4.7) aufgereinigten Antigene wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.4.1) und auf Nitrozellulose geblottet (2.4.9). Aus der Nitrozellulose wurden nach Methode 2.4.11 Streifen geschnitten. Die Streifen wurden mit seriellen Verdünnungen eines Dengue 1-positiven Serums im Immunoblot (2.4.13) getestet. Neg.: Negativserum ohne flavivirale Antikörper. Daneben ist die serielle Serumverdünnung des Dengue 1-positiven Serums in Zweierschritten von 1:100 bis 1:25.600 aufgetragen. Eine Reaktion mit dem Serum mit dem Dengue 1-Antigen im Immunoblot ist bis zu einer Serumverdünnung von 1:3200 zu erkennen. Das eingesetzte Serum besaß in der Immunfluoreszenz einen Titer von 1:80.

3.5.1 Nachweis der typenspezifischen Immunantwort in primärinfizierten Patienten

Ein bis drei Tage nach Erkrankungsbeginn wurden den Patienten frühe Seren entnommen. Die Dengue-IgM-Titer der Seren wurden mit einem μ -capture-ELISA (PanBio, Brisbane, Australia) bestimmt. Die Dengue IgG-Antikörpertiter wurden mit der indirekten Immunfluoreszenz ermittelt. Alle frühen Seren waren noch IgG-negativ. In 40 frühen Patientenseren konnte mit der 5'-Nuclease-PCR Denguevirus-RNA nachgewiesen und der Serotyp ermittelt werden. Bei diesen Patienten handelte es sich ausnahmslos um primärinfizierte Individuen: Virus-RNA war im Serum nachweisbar, aber es lag kein IgG-Titer vor.

Die Folgeseren dieser frühen Serumproben wurden 3-6 Tage nach den ersten Proben entnommen. Diese Seren wiesen IgG-Titer auf. Im Immunoblot wurden die späten Seren der 40 primärinfizierten Dengue-Patienten sowie vier Seren von West Nil-Patienten getestet. Die Testergebnisse des Immunoblots sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Färbungsintensität der Banden im Immunoblot wurde von – (negativ) bis +++ (stark positiv) bewertet.

Alle Seren der 21 Dengue 1-infizierten Patienten reagierten auch mit dem Dengue 1-Antigen auf den Teststreifen. 10 der 11 Seren Dengue 2-infizierter Patienten reagierten mit dem Dengue 2-Antigen und sämtliche acht Seren Dengue 3-infizierter Patienten reagierten mit dem Dengue 3-Antigen. Seren primärinfizierter Dengue 4-Fälle standen uns leider bisher nicht zur Verfügung.

Alle Seren der vier Patienten mit akuter West Nil-Infektion reagierten selektiv mit dem West Nil-Antigen auf den Teststreifen. Lediglich in einem Fall gab es eine leichte (grenzwertige) Beteiligung des Dengue 2-Antigens.

97 Seren gesunder Personen ohne Dengue-Antikörper, darin eingeschlossen 30 Seren von Gelbfieber-Impflingen, dienten als Negativkontrollen. 93 dieser Seren

reagierten mit keinem der sechs Antigene auf den Teststreifen und nur vier der Seren reagierten schwach mit dem Dengue 2-Antigen.

Bei 11 der insgesamt 40 Dengue-positiven Seren konnte eine Kreuzreaktivität mit den heterologen Dengue-Antigenen festgestellt werden.

Fünf Seren der 21 Dengue 1-infizierten Patienten reagierten außer mit dem homologen auch mit den heterologen Antigenen: Alle fünf Seren reagierten mit dem Dengue 2-Antigen, eines der fünf mit dem Dengue 3-Antigen und ein weiteres der fünf mit dem Dengue 4-Antigen.

Ein Serum der 11 Dengue 2-infizierten Patienten reagierte ebenfalls mit dem Dengue 1-Antigen, zwei Seren reagierten mit dem Dengue 3-Antigen und eines der Seren reagierte nicht mit den sechs Antigenen auf den Teststreifen.

Ein Serum der acht Dengue 3-infizierten Patienten reagierte zusätzlich mit dem Dengue 1-Antigen, eines mit dem Dengue 2-Antigen und ein weiteres mit dem Dengue 4-Antigen.

Einer der vier West Nil-infizierten Patienten reagierte zusätzlich leicht mit dem Dengue 2-Antigen.

Von allen 44 getesteten primärinfizierten Dengue und West Nil-Patienten waren 12 Seren (27%) kreuzreaktiv. Diese Kreuzreaktivität zeigte sich in der Regel als eine weniger intensiv gefärbte heterologe Bande, verglichen mit der homologen Reaktion. Einzige beobachtete Ausnahme war ein Patient mit einer Dengue 1-Infektion, bei dem die heterologe Bande des Dengue 3-Antigens stärker angefärbt war als die homologe Bande des Dengue 1-Antigens.

Der Serotyp ließ sich somit in 38 der 40 primären Dengue-Fälle korrekt mit dem Immunoblot ermitteln.

Tabelle 3: Reaktion der späten Serumproben von 44 Patienten mit primärer Dengue- oder West Nil-Infektion im Immunoblot.

| Serotyp in 5'- Nuclease- PCR | Den 1 positiv | Den 2 positiv | Den 3 positiv | Den 4 positiv | WN positiv | Σ kreuz- reaktiv | negativ |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|---------------------|-----------|
| Den 1 (n=21) | 21 | 5 | 1* | 1 | 0 | 5 | 0 |
| Den 2 (n=11) | 1 | 10 | 2 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| Den 3 (n=8) | 1 | 1 | 8 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| Den 4 (n=0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| WN (n=4) | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 |
| Kontrollen (n=97) | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 93 |

Der Serotyp wurde in den frühen Seren der Patienten mit 5'-Nuclease-PCR bestimmt. Die entsprechenden späten Seren sowie Kontrollseren ohne flavivirale Antikörper wurden mit den rekombinanten Antigenen im Immunoblot (2.4.13) getestet. *: starke heterologe Reaktion mit dem Dengue 3 Antigen, n: Zahl der Patienten; Den 1: Dengue 1; Den 2: Dengue 2; Den 3: Dengue 3; Den 4: Dengue 4; WN: West Nil.

3.5.2 Breitere Reaktivität der Antigene in sekundärinfizierten Patienten

Die Seren der sekundärinfizierten Patienten mussten, um in die Untersuchung aufgenommen zu werden, folgende Kriterien erfüllen: In den frühen Seren durften keine IgM-Antikörper nachzuweisen sein. Gleichzeitig musste ein IgG-Titer von mindestens 1:40 vorhanden sein. Zusätzlich musste die 5'-Nuclease-PCR zeigen, dass Denguevirus-RNA vorhanden war. Eine zweite, spätere Serumprobe des Patienten musste ebenfalls erhältlich sein.

Die frühen und die späten Serumproben der Patienten wurden im Immunoblot getestet. Die Ergebnisse des Immunoblots für diese sekundärinfizierten Patienten gibt Tabelle 4 wieder.

Fünf der insgesamt acht sekundärinfizierten Patienten waren Patienten aus Vietnam (VN) mit einer Dengue 2-Infektion. Bei einem weiteren sekundärinfizierten Dengue 2-Patienten sowie den zwei sekundärinfizierten Dengue 4-Patienten handelt es sich um Touristen (EU).

Beide späte Seren Dengue 4-infizierter Patienten reagierten mit dem Dengue 4-Antigen auf den Teststreifen und fünf der insgesamt sechs späten Seren Dengue 2-infizierter Patienten reagierten mit dem Dengue 2-Antigen. Das verbleibende Serum reagierte nur mit dem Dengue 3- und dem Dengue 4-Antigen. Der Serotyp ließ sich also in sieben der acht sekundärinfizierten Dengue-Fälle korrekt ermitteln.

Abgesehen von den Seren eines Patienten (Patient 3) reagierten alle Seren ebenfalls zusätzlich mit den heterologen Dengue-Antigenen. Die Reaktivität der Seren sekundärinfizierter Patienten mit den rekombinanten Antigenen ist also deutlich breiter.

Tabelle 4: Reaktion von acht Patienten mit sekundärer Dengue-Infektion im Immunoblot.

| Patient | Krankheitstag | Serotyp in 5'- Nuclease -PCR | Reaktivität im Immunoblot | | | |
|---------|---------------|---------------------------------------|---------------------------|-------|-------|-------|
| | | | Den 1 | Den 2 | Den 3 | Den 4 |
| 1 | 4 | Den 4 | - | - | +++ | +++ |
| EU | 42 | - | - | - | - | +++ |
| 2 | 4 | Den 4 | - | - | +++ | - |
| EU | 42 | - | - | - | ++ | +++ |
| 3 | 2 | Den 2 | - | + | - | ++ |
| EU | 36 | - | - | ++ | - | - |
| 4 | 5 | Den 2 | - | ++ | - | +++ |
| VN | 8 | - | - | +++ | - | + |
| 5 | 4 | Den 2 | - | ++ | ++ | ++ |
| VN | 15 | - | - | +++ | ++ | ++ |
| 6 | 5 | Den 2 | - | - | - | +++ |
| VN | 6 | - | - | + | - | +++ |
| 7 | 5 | Den 2 | - | - | + | + |
| VN | 7 | - | - | - | - | + |
| 8 | 3 | Den 2 | + | - | + | - |
| VN | 8 | - | +++ | + | + | + |

Der Serotyp wurde mit der 5'-Nuclease-PCR aus den frühen Patientenseren ermittelt. Die frühen Seren enthielten spezifische IgG-, jedoch keine IgM-Antikörper. Im Immunoblot getestet wurden die frühen sowie die späten Serumproben. EU: europäisches Serum; VN: Serum aus Vietnam; Den 1: Dengue 1; Den 2: Dengue 2; Den 3: Dengue 3; Den 4: Dengue 4. Die Färbeintensität wurde von – (negativ) bis hin zu +++ (stark positiv) abgeschätzt.

3.5.3 Sensitivität und Spezifität des Immunoblots

Um die Gesamtsensitivität des Immunoblots zu errechnen, wurden Serumproben von 142 akuten Dengue-Fällen getestet. Alle Patienten besaßen spezifische Dengue-IgM- und Dengue-IgG-Antikörper. Die Seren wurden zwei bis sieben Tage nach Krankheitsbeginn entnommen. Der Immunoblot reagierte positiv mit mindestens einer Bande in 127 der 142 Fälle (89% Gesamtsensitivität).

Die Sensitivität des Immunoblots für die Detektion serotyp-spezifischer Antikörper errechnet sich aus den Patienten, für die PCR-Daten vorliegen (alle primär- und sekundärinfizierte Patienten zusammen: 52 Dengue- und West Nil-Patienten). Sie ergibt sich zu 100% für Dengue 1, 88% für Dengue 2 (15 von 17 Fällen erkannt) und 100% für Dengue 3, Dengue 4 und West Nil, wobei hier die geringe Zahl der getesteten Seren (insgesamt nur vierzehn Seren waren erhältlich) zu berücksichtigen ist.

Um Angaben über die Spezifität des Immunoblots machen zu können, wurden 97 Kontrollseren ohne Dengue-Antikörper getestet (67 gesunde Personen sowie 30 Gelbfieber-Impflinge). 93 dieser Seren waren negativ mit allen sechs Antigenen, so dass sich eine Spezifität von 96% ergibt.

Betrachtet man die Testspezifität getrennt nach Serotypen, so ergibt sich für Dengue 1 eine Spezifität von 95%, da in einem der 21 Dengue 1-Fälle eine korrekte Identifikation des Serotyps mit dem Immunoblot nicht möglich war. In diesem Fall war die Antikörperantwort gegen das Dengue 1- und das Dengue 3-Antigen gleich stark. Für die drei anderen Dengue-Serotypen sowie für West Nil beträgt die Spezifität 100%.

3.5.4 Zeitlicher Verlauf von IgM, IgG, viraler RNA und Immunoblot-Ergebnissen am Beispiel zweier Patienten

Von zwei Dengue 1-Patienten waren mehr als jeweils zwei Serumproben erhältlich. Die IgM-Titer, IgG-Titer, PCR-Daten und Immunoblot-Ergebnisse der Seren beider Patienten sind als Serumverlauf in Tabelle 5 dargestellt.

In beiden Fällen handelte es sich um primärinfizierte Patienten, da in ihren frühen Seren nur virale RNA nachzuweisen war, aber keine IgG-Antikörper vorhanden waren. In den entsprechenden späten Seren (entnommen an Tag 10 bzw. an Tag 39) ließ sich eine Serokonversion beobachten.

Spezifische IgM-Antikörper konnten ebenfalls in beiden Patienten nachgewiesen werden. Interessanterweise wurden in beiden Patienten IgM-Antikörper in Gegenwart der viralen RNA gefunden. IgM-Antikörper scheinen im Gegensatz zu IgG-Antikörpern nicht in der Lage zu sein, das Virus aus dem Plasma zu eliminieren.

Die Antikörperantwort gegen die B-Domäne erfolgte sehr früh, zu einem Zeitpunkt, an dem IgM-Antikörper mit dem μ -capture-ELISA bereits detektierbar waren, aber noch keine IgG-Antikörper mit der indirekten Immunfluoreszenz nachweisbar waren (Patient A, Tag 7; Patient B, Tag 10).

Bei Patient A wurde eine Kreuzreaktivität gegenüber dem Dengue 3 Antigen beobachtet (Tag 10 und Tag 19), die aber vorübergehend war. Die heterologe Reaktion gegen das Dengue 3-Antigen war außerdem deutlich schwächer als die homologe Reaktion gegen das Dengue 1-Antigen. Beide Reaktionen konnten daher gut voneinander unterschieden werden.

Tabelle 5: Kinetik von IgM, IgG, viraler RNA und Immunoblot-Ergebnissen in konsekutiven Serumproben.

| Serumprobe | Krankheitstag | 5'-Nuclease-PCR | IgM | IgG | Immunoblot |
|------------------|---------------|-----------------|-----|------|--------------------|
| Patient A | | | | | |
| 1. Serum | 7 | Den 1+ | + | <10 | Den 1++ |
| 2. Serum | 10 | - | + | 80 | Den 1++ Den 3+ |
| 3. Serum | 19 | n.t. | + | 1280 | Den 1+++ Den 3+ |
| 4. Serum | 33 | n.t. | + | 640 | Den 1+++ |
| 5. Serum | 57 | n.t. | - | 320 | Den 1+++ |
| Patient B | | | | | |
| 1. Serum | 2 | Den 1+ | - | <10 | - |
| 2. Serum | 10 | Den 1+ | + | <10 | Den 1++ |
| 3. Serum | 39 | n.t. | + | 2560 | Den 1+++ |

Die Serumproben zweier Patienten mit primärer Dengue 1-Infektion wurden mit der 5'-Nuclease-PCR auf virale RNA untersucht und der Serotyp ermittelt (2.3.11). IgM-Antikörper wurden durch den μ -capture-ELISA (2.4.5) und IgG-Antikörper durch die indirekte Immunfluoreszenz (2.2.4) bestimmt. Den 1: Dengue 1; Den 3: Dengue 3; n.t.: nicht bestimmt; -: negativ; + bis +++: positiv bis stark positiv.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die B-Domänen-Bereiche von sechs ausgewählten Flaviviren (Denguevirus Typ 1-4, West Nil-Virus und Japanisches Enzephalitis-Virus) zu klonieren und sie als „His-tag“-Proteine mit der Metall-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufzureinigen. Der Reinheitsgrad der gereinigten Proteine wurde mit der Silberfärbung untersucht. Die hergestellten „His-tag“-Proteine zeigten nur sehr geringe Mengen an Verunreinigungen, vermutlich handelte es sich um Degradationsprodukte der Proteine (<1%). Durch die anschließende Gelelektrophorese und das Ausschneiden der monomeren Bande nach dem Blotting konnten die Proteine sehr rein als Antigene für den Immunoblot erhalten werden. Eine Präinkubation der Patientenseren mit E. coli-Extrakt, um gegen E. coli-Proteine gerichtete Antikörper vor dem Einsatz im Immunoblot zu eliminieren, war danach nicht mehr notwendig.

Auffällig waren die dimeren und trimeren Proteinbanden, die in den SDS-Gelen unter nichtreduzierenden Bedingungen beobachtet werden konnten. Solche nichtkovalent assoziierten Dimere und Trimere findet man bei den Glycoproteinen von Flaviviren häufig. Stiasny et al. konnten zeigen, dass das E-Protein des TBE-Virus bei saurem pH seine Konformation ändert und sich von Dimeren zu Trimeren umlagert (Stiasny et al., 2001). Nach der Elektroelution einer monomeren Bande und einem daran anschließenden erneuten Gellauf tauchen die dimeren und trimeren Banden im gleichen Verhältnis im neuen Polyacrylamidgel wieder auf. Obwohl sie (in geringerem Maße) ebenfalls mit den Seren und auch mit den getesteten monoklonalen Antikörpern reagieren, wurden sie für den Immunoblot nicht verwendet. Es wurden lediglich die monomeren Proteinbanden aus der Nitrozellulose ausgeschnitten. Die Nitrozellulose-Stücke wurden dann zu einem Teststreifen mit sechs Antigenen zusammengesetzt.

Winkler et al. (Winkler et al., 1987) zeigten für das TBE-Virus, dass die B-Domäne durch eine intramolekulare Disulfidbrücke stabilisiert wird und gegenüber Hitze und SDS sehr widerstandsfähig ist. Ein reduzierendes Agens wie DTT oder β -

Mercaptoethanol zerstört jedoch die Disulfidbrücke und damit die konformationellen Epitope. In Übereinstimmung mit Winkler et al. mussten daher nichtreduzierende Bedingungen für die Aufreinigung gewählt werden, um die „loop-Struktur“ der B-Domäne zu erhalten. Dazu passt die Beobachtung, dass das West Nil-Antigen in ersten Versuchen nur unter nichtreduzierenden Bedingungen mit dem West Nil-spezifischen monoklonalen Antikörper 15R4 reagierte.

Die hier exprimierten B-Domänen-Antigene waren ohne Fusions-elemente wie beispielsweise *trpE* oder Maltose-Bindungsprotein (MBP) reaktiv. Die Arbeitsgruppe um Simmons exprimierte die Dengue-B-Domänen als MBP-Fusionsproteine in *E. coli* (Simmons et al., 1998b; Simmons et al., 2001) und stellte fest, dass das Dengue 2-MCP-Fusionsprotein nach der Abspaltung der MCP-Fusionsdomäne nicht mehr mit Dengue 2-spezifischen monoklonalen Antikörpern und deutlich schlechter mit humanen Seren reagierte. Im Unterschied zu diesen Ergebnissen konnten die in dieser Arbeit exprimierten B-Domänen ihre typenspezifischen Epitope ohne die Hilfe eines Fusionsproteins korrekt präsentieren. Das Dengue 2-Antigen reagierte mit zwei der drei getesteten Dengue 2-spezifischen monoklonalen Antikörpern: Es reagierte stark mit dem mAb 3H5-1 und etwas schwächer mit dem mAb 6B6. Mit dem mAb 2H3 war keine Reaktion festzustellen. Die Bindungsstelle des mAbs 3H5-1 im E-Protein von Dengue 2 ist bekannt, sie ist linear und liegt innerhalb der B-Domäne (Aminosäuren 386-397 des E-Proteins, Trirawatanapong et al., 1992). Von den beiden anderen Dengue 2-spezifischen monoklonalen Antikörpern ist bekannt, dass mAb 6B6 ebenfalls gegen einen Bereich innerhalb der B-Domäne des E-Proteins gerichtet ist (Megret et al., 1992). Bei mAb 2H3 handelt es sich um einen subkomplex-spezifischen Antikörper. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass das Bindungsepitop des mAbs 6B6 ebenfalls im Bereich der B-Domäne liegt, nicht jedoch das des mAbs 2H3. Die schwächere Reaktion des Dengue 2-Antigens mit dem mAb 6B6 im Vergleich zu dem mAb 3H5-1 erklärt sich vermutlich damit, dass der monoklonale Antikörper 6B6 ein konformationelles und kein lineares Epitop erkennt (Megret et al., 1992). Aufgrund der Reaktion mit mAb

6B6 kann davon ausgegangen werden, dass das Dengue 2-Antigen in der hier exprimierten Form korrekt gefaltet ist.

In dieser Arbeit wurden Seren primärinfizierter und sekundärinfizierter Denguefieber-Patienten untersucht. Die vorliegenden Daten zeigen, dass der Denguevirus-Serotyp fast aller untersuchten Dengue-Patienten (46 der 48 Patienten) durch den Immunoblot eindeutig bestimmt werden konnte. Verglichen mit der Routinedetektion von Dengue-Antikörpern durch die indirekte Immunfluoreszenz hat der Immunoblot eine Gesamtsensitivität von 89% und eine Gesamtspezifität von 96%.

Bei einigen Seren primärinfizierter Patienten (Tabelle 3) zeigte sich eine zusätzliche (schwächere) Reaktion des Serums mit den heterologen Antigenen. In der Regel ließ sich die Färbung des homologen Antigens visuell gut von der des heterologen Antigens unterscheiden. Bei dem bislang einzigen Fall, in dem eine solche Unterscheidung nicht möglich war (ein Dengue 1-Fall mit einer Reaktion des Dengue 1-Antigens und einer stärkeren Reaktion des Dengue 3-Antigens) spielt sicherlich die von Fonseca beschriebene hohe Ähnlichkeit der B-Domänen des Dengue 1- und Dengue 3-Virus (70% Homologie) eine Rolle (da Fonseca & Fonseca, 2002).

Wegen der geringen Zahlen der primärinfizierten Dengue 2-, Dengue 3- und Dengue 4-Patienten in dieser Studie liegen noch nicht genug Daten für diese Antigene vor. Um ähnliche Aussagen wie über die Typenspezifität des Dengue 1-Antigens machen zu können, sollte die Zahl dieser Patienten unbedingt erweitert werden. Aufgrund religiöser Überzeugungen der Patienten in Endemiegebieten und mangelndem Kooperationswillen gestaltet sich die Blutentnahme häufig schwierig. Vor allem Proben von Folgeseren sind schwer erhältlich, da die Patienten oft bei Verbesserung ihres Zustandes die Klinik verlassen und zur Abgabe einer weiteren Serumprobe nicht bereit sind. Diese allgemeine Problematik spiegelt sich in der relativ geringen Zahl der Seren wieder. Der Umfang der in dieser Arbeit getesteten Serumproben entspricht jedoch der

Größenordnung, die in vergleichbaren Studien getestet wurde (Simmons et al., 1998a: 55 Individuen).

Untersucht man mit dem Immunoblot die Seren sekundärinfizierter Patienten, ist die Situation komplexer als bei primärinfizierten. Die Mehrfachreaktion der Seren sekundärinfizierter Patienten ist ein anderes Phänomen als die beschriebene Kreuzreaktivität der Seren primärinfizierter Patienten. In sekundärinfizierten Dengue-Patienten ist die Reaktivität eines Serums mit mehreren Antigenen (Tabelle 4) üblicherweise auf die aufeinanderfolgende Infektion mit mehreren Denguevirus-Serotypen zurückzuführen. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich hier um Kreuzreaktivität handelt, da sich bei der Gruppe der primärinfizierten Patienten ebenfalls wenig Kreuzreaktivität zeigte.

In dieser Arbeit wurden Seren aus einem Dengue-Endemiegebiet (Vietnam) in die Untersuchungen einbezogen, um die Frage zu klären, ob die B-Domänen-Antigene in epidemiologischen Studien über die geographische Verteilung der verschiedenen Dengue-Serotypen eingesetzt werden können. Die 5'-Nuclease-PCR-Daten der Patienten aus Hue, Vietnam zeigten eine zum aktuellen Zeitpunkt überwiegende Präsenz des Dengue 2-Virus. Übereinstimmend dazu reagierten im Immunoblot sechs der sieben Dengue 2-Patienten (86%) mit dem Dengue 2-Antigen. Darüber hinaus ermöglicht der Immunoblot jedoch auch eine Aussage über die „serologische Vergangenheit“ der Patienten, denn zusätzlich zum Dengue 2-Antigen reagierte ein Patient mit dem Dengue 1-Antigen, vier Patienten mit dem Dengue 3-Antigen und fünf Patienten mit dem Dengue 4-Antigen. Die Antikörperantwort der sekundärinfizierten Patienten setzt sich somit aus der gegenwärtigen Antikörperantwort als auch aus der früherer Epidemien zusammen und stimmt mit den Daten zur Denguevirus-Isolation in Vietnam in den letzten Jahren überein (Ha et al., 2000). Der Immunoblot konnte einen guten Überblick über den Antikörper-Status dieser sekundärinfizierten Patienten geben. Dennoch sollten weitere Seren sekundärinfizierter Patienten mit dem Immunoblot untersucht werden. Aufgrund der geringen Zahl der bisher untersuchten sekundärinfizierten Patienten kann nicht ausgeschlossen werden, dass es in dieser Patientengruppe

schwierig wird, die akute Antikörperantwort und die „alten“ Antikörpertiter zu unterscheiden.

Simmons et al. (Simmons, 1998a), die vier B-Domänen-Antigene als trpE-Fusionsproteine exprimierten, konnten keine Kreuzreaktivität ihrer Antigene mit Seren von Gelbfieber- oder Japanische Enzephalitis-Impflingen feststellen. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis konnten wir in den von uns getesteten Seren der 48 Dengue-Patienten keine Kreuzreaktivität mit dem West Nil- oder dem Japanische Enzephalitis-Antigen beobachten. In einem der vier West Nil-Fälle wurde eine leichte zusätzliche Reaktion mit dem Dengue 2-Antigen verzeichnet. Ob es sich tatsächlich um eine Kreuzreaktivität oder um eine vorhergehende Dengue-Infektion handelt, konnte nicht restlos geklärt werden.

Die vorläufigen Daten mit West Nil-Seren deuten darauf hin, dass die West Nil-B-Domäne in dieser Form als rekombinantes Antigen auf Teststreifen für eine spezifische West Nil-Diagnose herangezogen werden kann. Die spezifische und konzentrationsabhängige Bindung des rekombinanten West Nil-Antigens an ein West Nil-Serum konnte außerdem mit einer BIAcore-Messung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Ein Tourist, der mit einer Murray-Valley-Enzephalitis aus Australien zurückkehrte, reagierte mit dem West Nil-Antigen kreuz. Wegen der großen Sequenzähnlichkeit von Murray-Valley-Enzephalitis-Virus, West Nil-Virus und Japanischem Enzephalitis-Virus im Bereich der B-Domäne (da Fonseca & Fonseca, 2002) könnte sich das West Nil-Antigen dazu eignen, Antikörper gegen die Enzephalitis-Gruppe der Flaviviren zu detektieren.

Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Daten von Simmons et al. liegt die Serotyp-spezifische Sensitivität des Immunoblots bei fast 100%. Zwei Dengue 2-Seren, jeweils aus einem primär- und einem sekundärinfizierten Patienten, reagierten allerdings nicht (oder noch nicht) mit dem Dengue 2-Antigen. Da unsere Seren

relativ früh entnommen wurden (in diesen beiden Fällen an Tag 4 und Tag 7) ist dies vermutlich der Grund für eine etwas niedrigere Sensitivität des Immunoblots.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse mit sehr frühen Seren, in denen virale RNA vorhanden war und noch keine IgG-Antikörper nachgewiesen werden konnten. Ein Drittel dieser Patienten (sieben von 20) zeigte eine positive homologe Reaktion im Immunoblot, obwohl im Immunoblot ein γ -Ketten-spezifisches Konjugat verwendet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Produktion von IgG-Antikörpern gegen die B-Domäne scheint also in einigen Seren bereits sehr früh zu beginnen.

Wie diese Arbeit an Seren von insgesamt 48 Patienten mit gesicherter Dengue-Infektion darlegt, bietet der Immunoblot eine diagnostische Erweiterung der etablierten Nachweisverfahren für Dengueviren. Ein Patientenserum lässt sich bezüglich des infizierenden Flavivirus und des Denguevirus-Serotyps durch die 5'-Nuclease-PCR charakterisieren. Ein solcher Nachweis ist jedoch nur zeitlich limitiert während der wenigen ersten Krankheitstage möglich, da mit dem Auftreten der ersten IgM-Antikörper die virale RNA aus dem Serum entfernt wird. Weil der Immunoblot IgG-Antikörper detektiert, kann er auch zu einem späten Zeitpunkt oder in gesunden seropositiven Individuen den Denguevirus-Serotyp ermitteln. Der Zeitraum, in dem eine Bestimmung des Denguevirus-Serotyps möglich ist, wird dadurch verlängert.

Die Vorteile des Immunoblots liegen ferner in der schnellen Durchführbarkeit (ca. sechs Stunden), der einfachen visuellen Auswertung und der hohen Stabilität der Antigene auf den Teststreifen. Die Teststreifen konnten mehrere Wochen bei 4°C ohne Reaktivitätsverlust der Antigene gelagert werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass ein Bedarf nach einer serotyp-spezifischen Dengue-Diagnostik sowohl in seroepidemiologischen Studien als auch für Touristen besteht, die wiederholt in tropische Gebiete reisen. Eine weitere Verwendungsmöglichkeit des Immunoblots, die noch experimentell untersucht

werden sollte, stellen Dengue-Vakzinierungsprogramme dar. Die Antikörperantwort gegen die vier Serotypen ist hier grundsätzlich einzeln zu ermitteln, um auszuschließen, dass zu niedrige Antikörper-Level eines Dengue-Serotyps eine Dengue-Infektion durch das *antibody-enhancement* verstärken könnten (da Fonseca & Fonseca, 2002). Mit den B-Domänen-Antigenen wäre eine solche typenspezifische Differenzierung der Antikörperantwort möglich. In diesem Zusammenhang sollte in Zukunft auch die B-Domäne des Gelbfieber-Virus in den Immunoblot einbezogen werden, um mit der typenspezifischen Immunantwort den Erfolg der Gelbfieber-Impfung abschätzen zu können.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die B-Domänen der E-Proteine der vier Denguevirus-Serotypen sowie die B-Domäne von West Nil-Virus und Japanischem Enzephalitis-Virus als „His-tag“-Proteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die rekombinanten Antigene wurden für einen Immunoblot mit Patientenseren verwendet, um serotyp-spezifische Antikörper zu detektieren. Die Sensitivität und die Spezifität der Methode wurden ermittelt.

Virale RNA wurde aus infizierten Zellen (im Falle der Dengueviren 1-4 und des West Nil-Virus) und einem kommerziell erhältlichen Impfstoff (im Falle des Japanischen Enzephalitis-Virus) isoliert. Durch Reverse Transkription wurde cDNA synthetisiert. Die B-Domänen-Fragmente aller sechs Viren (in etwa Nukleotide 860-1190 des E-Gens) wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und gerichtet in die Expressionsvektoren pET22b oder pQE30 kloniert. Die Konstrukte wurden mit exemplarisch ausgewählten Sequenzen aus der Genbank verglichen und stimmten mit diesen Referenzsequenzen zu 96-98% auf Nukleotidebene (98-100% auf Aminosäureebene) überein. Die beobachteten Unterschiede charakterisieren vermutlich die spezifische, durch wiederholte Passage in der Zellkultur entstandene Virusvariante unserer Abteilung. Die sechs B-Domänen wurden in *E. coli* JM 109 oder BL21(DE3)pLysS exprimiert. Nachdem die Aufreinigung der pQE30-Konstrukte unter nativen Bedingungen nicht möglich war, gelang die Aufreinigung aller sechs B-Domänen über die Metall-Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen. Aus einem Liter Zellkultur konnten durchschnittlich 1-2 mg Protein aufgereinigt werden. 200 µg jedes Antigens wurde auf Nitrozellulose geblottet. Aus den geblotteten Proteinen wurden Teststreifen für den typenspezifischen Antikörpernachweis hergestellt.

Für die Evaluierung des Immunoblots wurden die sechs rekombinanten Antigene mit Seren von Denguefieber- und West Nil-Patienten getestet. Es handelte sich dabei um gepaarte Seren 40 primärinfizierter Denguefieber-Patienten, gepaarte Seren acht sekundärinfizierter Denguefieber-Patienten und vier West Nil-

Einzelseren. Diese Seren waren wie folgt charakterisiert worden: In den frühen Seren aller Patienten war der Serotyp mit der 5'-Nuclease-PCR bestimmt worden. IgM-Titer waren mit dem μ -capture-ELISA, IgG-Titer mit der indirekten Immunfluoreszenz bestimmt worden.

Im Immunoblot getestet wurden die späten Seren der primärinfizierten Patienten sowie die frühen und späten Seren der sekundärinfizierten Patienten. Der Immunoblot bestätigte in 46 der 48 Fälle den durch die 5'-Nuclease-PCR ausgewiesenen Serotyp (95% Sensitivität für die Detektion serotyp-spezifischer Antikörper). In 11 von 40 Seren der primärinfizierten Dengue-Patienten wurde eine zusätzliche, schwächere Reaktion mit den heterologen Dengue-Antigenen beobachtet. Jedoch führte diese nur in einem Fall zu einer falschen Beurteilung des Serotyps. In allen Patienten mit einer sekundären Dengue-Infektion wurden mindestens zwei Banden im Immunoblot angefärbt. Die Seren der vier West Nil-Patienten reagierten selektiv mit dem West Nil-Antigen.

Zur Ermittlung der Gesamtsensitivität des Immunoblots wurden Serumproben von 142 weiteren akuten Dengue-Fällen getestet, die Dengue-spezifische IgM- und IgG-Titer besaßen und zwischen Tag 2 und 7 der Erkrankung entnommen worden waren. Mit diesen Seren wies der Immunoblot eine Gesamtsensitivität von 89% (127 der 142 Fälle erkannt) auf. 93 der 97 Kontrollseren gesunder Personen ohne Dengue-Antikörper waren negativ mit allen sechs Antigenen (96% Spezifität).

Der in dieser Arbeit vorgestellte Antikörpernachweis (Immunoblot) konnte sowohl in den meisten primären als auch in den meisten sekundären Dengue-Fällen die viralen Serotypen identifizieren und ergänzt damit die Methode der 5'-Nuclease-PCR. Im Unterschied zur 5'-Nuclease-PCR basiert der Immunoblot auf der Detektion von IgG-Antikörpern und kann deshalb auch den Serotyp rekonvaleszenter Individuen und gesunder Seropositiver ermitteln. Damit ist es zum ersten Mal relativ einfach und schnell möglich, anhand von Serumproben auch lange Zeit nach einer Dengueinfektion den viralen Serotyp zu bestimmen.

Der Immunoblot eignet sich außerdem, wie die vorliegenden Daten mit Seren aus Vietnam beweisen, zu epidemiologischen Untersuchungen über die Verteilung der Denguevirus-Serotypen in Endemiegebieten. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass die Immunoblot-Ergebnisse besser mit dem klinischen Bild der Patienten korrelieren als die von der WHO empfohlene Einteilung der Denguefälle (WHO, 1997) in Primär- und Sekundärinfektionen aufgrund der Höhe und des Verhältnisses von IgM- und IgG-Titer (S. Schilling, Daten nicht veröffentlicht).

Eine weitere denkbare Verwendung des Immunoblots wäre die Ermittlung der typenspezifischen Antikörperantwort in Impfstudien. Sie sollte, beispielsweise für den Gelbfieberimpfstoff oder den in der Erprobung befindlichen tetravalenten Denguefieber-Impfstoff, experimentell mit den rekombinanten B-Domänen-Antigenen überprüft werden.

6 Literaturverzeichnis

Altenschmidt J. 2000. Expression der B-Domäne des E-Glykoproteins von Dengueviren. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Berthet FX, Zeller HG, Drouet MT, Rauzier J, Digoutte JP & Deubel V. 1997. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses. *J Gen Virol* **78(9)**:2293-2297.

Bhamarapravati N. 1997. Pathology of dengue infections. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Edited by Gubler DJ, Kuno, G. Cambridge: CAB International. 115-132.

Bhamarapravati N. & Suthes Y. 2000. Live attenuated dengue vaccines. *Vaccine* **18 (2)**:44-47.

Bundo K & Igarashi A. 1985. Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J Virol Methods* **11(1)**:15-22.

Burke DS, Nisalak A & Johnson DE. 1988. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg* **38**:172-180.

Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG & Brandt WE. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralisation tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* **70**:37-43.

CDC. Dengue Fever Homepage:

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/index.htm>

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R & Rice CM. 1990. Flavivirus genome organisation, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* **44**:649-688.

Chang G-J. 1997. Molecular biology of dengue viruses. In: *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Edited by Gubler DJ, Kuno G. Cambridge: CAB International:175-198.

Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ & Marks RM. 1997. Dengue virus infectivity depends on envelope binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* **3**:866-871.

Clarke T. 2002. Dengue virus: break-bone fever. *Nature* **416 (6882)**:672-674.

Eckels KH, Harrison VR, Summers PL, & Russel, PK. 1980. Dengue 2-vaccine:preparation from a small-plaque virus clone. *Infect Immun* **27**:175-180.

Entrez Data Base.

[http://: www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

da Fonseca BAL & Fonseca SNS. 2002. Dengue virus infections: *Curr Opin Pediatr*, **14**:67-71.

Deubel V, Laille M, Hugnot JP, Chungue E, Guesdon JL, Drouet MT, Bassot S & Chevrier D. 1990. Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. *J Virol Methods* **30(1)**:41-54.

Gentry MK, Henchal EA, McCown JM, Brandt WE & Dalrymple JM. 1982. Identification of distinct antigenic determinants on dengue-2 virus using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* **31**:548-555.

Gritsun TS, Holmes EC & Gould EA. 1995. Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Res* **35(3)**:307-321.

Gubler DJ. 1998. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* **11(3)**:480-496.

Guzman MG & Kouri G. 1996. Advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**:217-222.

Ha DQ, Tien NT, Huong VT, Loan HT & Thang CM. 2000. Dengue epidemic in southern Vietnam, 1998. *Emerg Infect Dis* **6(4)**: 422-425.

Halstead SB. 1974. Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg* **23**:974-982.

Halstead SB, Rojanasuphot S & Sangkawibha N. 1983. Original antigenic sin in dengue. *Am J Trop Med Hyg* **32**:154-156.

Halstead SB. 1988. Pathogenesis of dengue: Challenges to molecular biology. *Science* **239(4839)**:476-481.

Heinz FX, Mandl C, Holzman H, Guirakhoo F, Tuma W & Kunz C. 1990. The antigenic structure and function of the flavivirus envelope protein E. In: Brinton MA, Heinz FX, eds. 2nd International Symposium on Positive Strand Viruses, Vienna. Washington, DC: American Society Microbiology Press:294-300.

Heinz FX, Mandl CW, Holzman H, Kunz C, Harris BA, Rey F & Harrison SC. 1991. The flavivirus envelope protein E: isolation of a soluble form from tick-borne encephalitis virus and its crystallisation. *J Virol* **65**:5579-5583.

Heinz FX & Allison SL. 2001. The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr Opin Mikrobiol* **4**:450-455.

Henchal EA, Gentry MK, McCown JM & Brandt WE. 1982. Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* **31(4)**:830-836.

Heukeshoven J & Dernick R. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit I: Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**:28-32.

Hilgard P & Stockert R. 2000. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* **32**:1069-1077.

Holzmann H & Heinz FX. 2001. Flaviviren, Hepatitis C-Virus (HCV) und Hepatitis G-Virus (HGV). In: Köhler W, et al.(Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie*, Urban & Fischer Verlag München: 625-630.

Huang CY, Butrapet S, Pierro DJ, Chang GJ, Hunt AR, Bhamarapravati N, Gubler DJ & Kinney RM. 2002. Chimeric dengue type 2 (vaccine strain PDK-53) /dengue type 1 virus as a potential candidate dengue type 1 virus vaccine. *J Virol* **74**:3020-3028.

Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongwasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P & Hoke CH. 1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* **40(4)**:418-427.

Kuno G, Vorndam AV, Gubler DJ & Gomez I. 1990. Study of anti-dengue NS1 antibody by western blot. *J Med Virol* **32**:102-108.

Kuno G, Gubler DJ & Olivier A. 1993. Use of original antigenic sin theory to determine the serotypes of previous dengue infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**:103-105.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang G & Vorndam V. 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**:545-551.

Laue T, Emmerich P & Schmitz H. 1999. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J Clin Microbiol* **37(8)**:2543-2547.

Leclerc C, Deriaud E, Megret F, Briand JP, Van Regenmortel MH & Deubel V. 1993. Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein. *Mol Immunol* **30(7)**:613-625.

Lin CF, Lei HJ, Shiau AL, Liu HS, Yeh TM, Chen SH, Liu CC, Chiu SC & Lin YS. 2002. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol* **169(2)**:657-664.

Megret F, Hugnot JP, Falconar A, Gentry MK, Morens DM, Murray JM, Schlesinger JJ, Wright PJ, Young P, van Regenmortel MHV & Deubel V. 1992. Use of recombinant fusion proteins and monoclonal antibodies to define linear and discontinuous antigenic sites on the dengue virus envelope glycoprotein. *Virology* **187**:480-491.

Mason PW, Dalrymple JM, Gentry MK, McCown JM, Hoke CH, Burke DS, Fournier MJ & Mason TL. 1989. Molecular characterisation of a neutralizing

domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. *J Gen Virol* **70(8)**:2037-2049.

Mason PW, Zugel MU, Semproni AR, Fournier MJ, & Mason TL. 1990. The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in *Escherichia coli*. *J Gen Virol* **71(9)**: 2107-2114.

Modrow S & Falke W. 1997. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Monath TP & Heinz FX. 1996. Flaviviruses. In: Fields BN; Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology* Lippincott Raven Publishers, Philadelphia.

Nowak T & Wengler G. 1987. Analysis of disulfides present in the membrane proteins of the West Nile flavivirus. *Virology* **156**:127-137.

Qiagen. 1999 a. QIAprep Miniprep Handbook, Hilden.

Qiagen. 1999 b. QIAquick Spin Handbook, Hilden.

Qiagen. 1999 c. RNeasy Mini Handbook, Hilden.

Randolph VB, Winkler G & Stollar V. 1990. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology* **174**:450-458.

Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C & Harrison SC. 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375(6529)**:291-298.

Rico-Hesse R, Harrison L, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM & da Rosa AT. 1997. Origins of dengue type 2

viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* **230**:244-251.

Roehrig JT, Johnson AJ, Hunt AR, Bolin RA & Chu MC. 1990. Antibodies to dengue 2 virus E-glycoprotein synthetic peptides identify antigenic conformation. *Virology* **177(2)**:668-675.

Rothman AL, Kurane I, Lai CJ, Bray M, Falgout B, Men R & Ennis FA. 1993. Dengue virus protein recognition by virus-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* **67**:801-806.

Rothman AL & Ennis FA. 1999. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever: *Virology* **257**:1-6.

Rusell PK & Nisalak A. 1967. Plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol* **99**:285-290.

Sabin AB. 1952. Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* **1**:30-50.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74(12)**:5463-5467.

Schlesinger RW. 1977. Dengue viruses. *Virol Monogr* **16**:1-132.

Schmitz H & Emmerich P. 1984. Detection of specific immunoglobulin M antibody to different flaviviruses by use of enzyme-labeled antigens. *J Clin Microbiol* **19(5)**:664-667.

Simmons M, Porter KR, Escamilla J, Graham R, Watts DM, Eckels KH & Hayes CG. 1998a. Evaluation of recombinant dengue viral envelope B domain protein antigens for the detection of dengue complex-specific antibodies. *Am J Trop Med Hyg* **58(2)**:144-151.

Simmons M, Nelson WM, Wu SJL & Hayes CG. 1998b. Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice. *Am J Trop Med Hyg* **58(5)**:655-662.

Simmons M, Murphy GS & Hayes CG. 2001. Short report: Antibody responses of mice immunized with a tetravalent dengue recombinant protein subunit vaccine. *Am J Trop Med Hyg* **65(2)**:159-161.

Stiasny K, Allison SL, Mandl CW & Heinz FX. 2001. Role of metastability and acidic pH in membrane fusion by tick-borne encephalitis virus. *J Virol* **75(16)**:7392-7398.

Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC & Tan JH. 1996. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology* **216**:317-325.

Towbin H, Staehelin T & Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **76**:4350-4354.

Trirawatanapong T, Chandran B, Putnak R & Padmanabhan R. 1992. Mapping of a region of dengue virus type-2 glycoprotein required for binding by a neutralizing monoclonal antibody. *Gene* **116**:139-150.

Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Endy TP, Raengsakulrach B, Rothman AL, Ennis FA &

Nisalak A. 2000. Dengue viraemia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* **181(1)**:2-9.

Weller TH & Coons AH. 1954. Fluorescent antibody studies with reagents of Varicella and Herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**:789-794.

WHO. 1997. Dengue haemorrhagic fever. Diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd ed., Geneva.

WHO. 2000. Dengue/dengue hemorrhagic fever: situation in 2000. *Wkly Epidemiol Rec* **75(24)**:193-196. <http://www.who.int/wer>

WHO. 2001. Blueprint for the Next Generation. Dengue Prevention and Control. 35th Session of the Subcommittee of the Executive Committee on Planning and Programming. Washington DC: Pan American Health Organization/World Health Organization.

Winkler G, Heinz FX & Kunz C. 1987. Characterisation of a disulfide bridge-stabilized antigenic domain of tick-borne encephalitis virus structural glycoprotein. *J Gen Virol* **68**:2239-2244.

Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH & Holmes EC. 1996. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:548-553.

7 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1: | Verbreitung der Dengueviren und des Vektors <i>Aedes aegypti</i> im Jahre 2000 | 3 |
| Abbildung 2: | Aufbau eines Flaviviruspartikels | 9 |
| Abbildung 3: | Schematische Darstellung des flaviviralen Genoms | 10 |
| Abbildung 4: | Röntgenstrukturmodell des E-Proteinfragments | 13 |
| Abbildung 5: | Der Expressionsvektor pQE30 | 25 |
| Abbildung 6: | Der Expressionsvektor pET22b | 26 |
| Abbildung 7: | Immunfluoreszenz Dengue 3-infizierter Vero-E6-Zellen | 52 |
| Abbildung 8: | RNA-Aufreinigung aus Vero-E6-Zellen | 53 |
| Abbildung 9: | PCR-Amplifikate und Herstellung der Expressionskonstrukte | 54 |
| Abbildung 10: | RT-PCR des Dengue 3-Amplifikats | 55 |
| Abbildung 11: | Doppelrestriktion des Vektors pQE30 und des Dengue 1-Amplifikats für die Ligation | 57 |
| Abbildung 12: | Sequenz des Klons Dengue 1 | 60 |
| Abbildung 13: | Sequenz des Klons Dengue 2 | 61 |
| Abbildung 14: | Sequenz des Klons Dengue 3 | 62 |
| Abbildung 15: | Sequenzvergleich des Klons Dengue 4 | 63 |
| Abbildung 16: | Sequenzvergleich des Klons West Nil | 64 |
| Abbildung 17: | Sequenzvergleich des Klons Japanische Enzephalitis | 65 |
| Abbildung 18: | Proteinverteilung in Sediment und Überstand | 69 |
| Abbildung 19: | Säulenfraktionen der Metall-Chelat-Chromatographie | 70 |
| Abbildung 20: | Dengue 4- und Dengue 1-Proteine nach der Aufreinigung | 71 |
| Abbildung 21: | Coomassiefärbung zur Quantifizierung der aufgereinigten sechs Proteine | 72 |
| Abbildung 22: | Immunoblot der Antigene mit dem monoklonalen Antikörper 15R4. | 74 |
| Abbildung 23: | Immunoblot der Antigene mit den monoklonalen Antikörpern 3H5-1, 2H3 und 6B6. | 75 |

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 24: | Immunoblot der B-Domänen-Antigene mit Patientenseren | 77 |
| Abbildung 25: | Titerbestimmung eines Dengue 1-positiven Serums im Immunoblot | 78 |
| Tabelle 1: | Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer | 27 |
| Tabelle 2: | Ligationsansätze | 59 |
| Tabelle 3: | Reaktion der späten Serumproben von 44 Patienten mit primärer Dengue- oder West Nil-Infektion im Immunoblot | 81 |
| Tabelle 4: | Reaktion der Seren von acht Patienten mit sekundärer Dengue-Infektion im Immunoblot | 83 |
| Tabelle 5: | Kinetik von IgM, IgG, viraler RNA und Immunoblot-Ergebnissen in konsekutiven Serumproben | 86 |

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------|--|
| μ | Mikro |
| A | Ampere |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Capsid |
| ca. | circa |
| cDNA | revers transkribierte DNA |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| d. h. | das heißt |
| DHF | Dengue-Hämorrhagisches Fieber |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleotid |
| ddNTP | Didesoxyribonukleotid |
| DSS | Dengue-Schocksyndrom |
| DTT | Dithiotreitol |
| E | <i>envelope</i> |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | fötales Kälberserum |
| FSME | Frühsommer-Meningo-Enzephalitis |

| | |
|--------|--|
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| IFA | Immunfluoreszenz |
| IgG | Immunglobulin G |
| IgM | Immunglobulin M |
| IPTG | Isopropionylthiogalactopyranosid |
| JE | Japanische Enzephalitis |
| kb | Kilobasenpaare |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani-Medium |
| M | molar oder Membran oder Marker |
| m | milli |
| mAb | monoklonaler Antikörper |
| MBP | Maltose-Bindungsprotein |
| min. | Minute |
| M-MuLV | <i>Moloney–murine-leukemia-virus</i> |
| MOPS | (N-morpholino)-propansulfonsäure |
| n | nano |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NS | Nichtstrukturprotein |
| NT | Neutralisationstest |
| OD | optische Dichte |
| p | pico |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> |
| prM | pre-Membranprotein |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RT | reverse Transkription oder Raumtemperatur |
| sec. | Sekunde |

| | |
|-------|--------------------------------|
| SDS | <i>sodiumdodecylsulfate</i> |
| TAE | Tris-Amino-EDTA-Puffer |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | <i>tick-borne-encephalitis</i> |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin |
| Tris | Trishydroxymethylaminomethan |
| U | <i>units</i> |
| UV | Ultraviolett |
| ü. N. | über Nacht |
| Vol. | Volumina |
| WN | West Nil |
| YF | <i>yellow fever</i> |
| x g | relative Erdbeschleunigung |
| z.B. | zum Beispiel |

Aminosäuren

| | | | | | |
|----------|------------|--------------|----------|------------|------------|
| A | Ala | Alanin | M | Met | Methionin |
| C | Cys | Cystein | N | Asn | Asparagin |
| D | Asp | Aspartat | P | Pro | Prolin |
| E | Glu | Glutamat | Q | Gln | Glutamin |
| F | Phe | Phenylalanin | R | Arg | Arginin |
| G | Gly | Glycin | S | Ser | Serin |
| H | His | Histidin | T | Thr | Threonin |
| I | Ile | Isoleucin | V | Val | Valin |
| K | Lys | Lysin | W | Trp | Tryptophan |
| L | Leu | Leucin | Y | Tyr | Tyrosin |

8.2 Veröffentlichung

Ludolfs D, Schilling S, Altenschmidt J & Schmitz H. 2001. Serological Differentiation of Dengue Virus 1-4 Infections using Recombinant Antigens. J Clin Microbiol (angenommen am 9. August 2002)

8.3 Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Herbert Schmitz für die Betreuung der Arbeit, die Überlassung des Themas, die Möglichkeit, es selbständig zu bearbeiten und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Ferner möchte ich ihm für seine stete Diskussionsbereitschaft und für seine Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit danken.

Auch Herrn Prof. Dr. Lothar Renwrantz danke ich für seine Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Michael Schreiber und Frau Dr. Beate Kümmerer danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft und wertvolle Unterstützung bei den Korrekturen und Abbildungen dieser Arbeit.

Meinen derzeitigen und ehemaligen Arbeitskollegen der Abteilung Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts danke ich für das herzliche Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich mich bei Jan Altenschmidt für die Unterstützung bei der Klonierung und beim Test der ersten Patientenserien im Immunoblot bedanken. Herrn Stefan Schilling danke ich für die freundliche Überlassung der Seren aus Vietnam und die Durchführung der 5'-Nuclease-PCR. Gabriele Rietdorf danke ich für die Ermittlung der Immunfluoreszenzdaten.

Meinen Eltern und Schwiegereltern sowie Leo und Oma Else möchte ich danken, dass sie an mich glaubten und mich finanziell und ideell unterstützten. Helga danke ich insbesondere für Darius' Betreuung, ohne die diese Arbeit wesentlich länger gedauert hätte oder vielleicht nicht zum Abschluss gekommen wäre.

Ganz besonders danke ich meinem Mann Sebastian für das Ertragen meiner Launen, für Trost, Kaffee, heiße Bäder und das Hüten unseres Sohnes Darius während kritischer Phasen dieser Arbeit.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

| | |
|--------------|--------------------------------|
| Name | Diana Ludolfs, geborene Specht |
| Geburtsdatum | 19.02.1971 |
| Geburtsort | Uelzen |

Schulische und universitäre Laufbahn

| | |
|-------------|--|
| 1977-1990 | Grundschule und Gymnasium in Uelzen |
| 5/90 | Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife (Note 1,6) |
| 9/90-9/92 | Grundstudium der Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg |
| 10/92-12/94 | Hauptstudium der Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg |
| 10/94 | Diplomprüfungen im Hauptfach Biochemie/ Molekularbiologie, im Schwerpunktfach Signalübertragung sowie im Nebenfach Pharmakologie/Toxikologie |
| 1/95-6/95 | Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg in der Abteilung Virologie zum Thema: „Identifizierung von Peptid- Liganden des rekombinanten gp120 von HIV-1 mittels Screening einer random peptide-library“ Betreuer: Prof. Dr. B. Fleischer |

| | |
|-------------|--|
| 7/95 | Abschluss als Diplom-Biochemikerin (Gesamtnote: sehr gut) |
| seit 1/96 | Promotion am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg in der Abteilung Virologie unter Anleitung von Prof. Dr. H. Schmitz zum Thema: „Charakterisierung typenspezifischer B-Zell-Epitope der Flaviviren“ |
| 10/97-12/98 | Mutterschutz und Erziehungsurlaub |
| 1/99-10/02 | Fortsetzung der Doktorarbeit |

Uelzen, den 8.8.02