

## 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  $\mu$ -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.