

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Bakterielle Expression von Hantavirusgenen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius – Maximilians – Universität Würzburg

vorgelegt von
Melanie Hauck
aus Hirschberg

Würzburg, August 2006

Referent: Prof. Dr. med. Axel Rethwilm

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Müller

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.08.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern und für Sven.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Hantaviren	1
1.1.1 Einführung	1
1.1.2 Epidemiologie und Übertragung	1
1.2 Geschichtlicher Hintergrund	5
1.3 Molekularbiologie und Aufbau des Hantavirus	6
1.4 Proteinbiosynthese und Replikation des Virus	8
1.4.1 Transkription und Translation	9
1.4.2 Replikation	10
1.5 Pathogenese der Hantavirusinfektion	11
1.6 Klinik der Hantavirusinfektion	12
1.6.1 Hämorrhagisches Fieber mit Renalem Syndrom (HFRS)	12
1.6.2 Hanta Pulmonary Syndrome (HPS)	14
1.6.3 Nephropathia epidemica (NE)	15
1.7 Therapie	16
1.8 Prognose	17
1.9 Diagnose	17
1.10 Prävention	17
1.11 Aufgabenstellung/ Ziel der vorliegenden Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Geräte und Materialien	19
2.1.2 Chemikalien	20
2.1.3 Enzyme	22
2.1.4 Kits	22
2.1.5 Nukleinsäuren	23

2.1.6	Oligonukleotide	23
2.1.7	Plasmide	24
2.1.8	Antibiotika	25
2.1.9	Kompetente Zellen	25
2.1.10	Transformation in kompetente Bakterien	26
2.1.11	Seren	26
2.1.12	Lösungen, Medien und Puffer	27
2.1.12.1	Bakterienkultur	27
2.1.12.2	Indirekte Immunfluoreszenz	27
2.1.12.3	Zellkultur	27
2.1.12.4	Plasmidpräparation	28
2.1.12.5	Proteinexpression und –aufreinigung	28
2.1.12.6	Agarosegel-Elektrophorese	30
2.1.12.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.1.12.8	Western Blot	31
2.2	Methoden	34
2.2.1	Anzucht und Kultur von Viren	34
2.2.2	RNA Präparation	35
2.2.3	Reverse Transcriptase – Polymerase Ketten - Reaktion (RT-PCR)	35
2.2.4	Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
2.2.5	Klonierung in den pCR2.1TOPO-Vektor der Fa. Invitrogen	38
2.2.6	Klenow Enzym	38
2.2.7	T4-DNA-Polymerase	39
2.2.8	Dephosphorilierung von 5'- Enden mit dem Enzym CIAP	39
2.2.9	Ethanolpräzipitation	40
2.2.10	Phenol/ Chloroform Extraktion	40
2.2.11	Ligation von DNA Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase	40
2.2.12	Herstellung kompetenter Bakterien	41
2.2.13	Transformation in kompetente Bakterien	42
2.2.14	Minipräparation	42

2.2.14.1 TENS-Methode	42
2.2.14.2 Säulenmethode (Quiagen)	43
2.2.15 Maxipräparation	44
2.2.16 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	44
2.2.17 Sequenzierungen	45
2.2.18 Agarosegel - Elektrophorese	46
2.2.19 Reinigung von DNA mit Nucleospin	47
2.3 Expression und Aufreinigung von Protein	47
2.3.1 Der pRSETB – Expressionsvektor	47
2.3.2 Proteinexpression und Immobilisierende Metallaffinitäts- chromatographie	48
2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	51
2.3.4 Proteindialyse	51
2.4 Nachweis von Protein	52
2.4.1 SDS – PAGE	52
2.4.2 Western Blot	53
2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz	55
2.5 Antikörpertestung: Recomb Line Bunyavirus – Test (Fa. Mikrogen)	56
3. Ergebnisse	58
3.1 Isolierung und Klonierung von Virus – RNA	58
3.2 Herstellung bakterieller Expressionsvektoren für das hantavirale S –Segment	61
3.3 Proteinexpression	66
3.4 Proteinaufreinigung mit der immobilisierenden	

Metallaffinitätschromatographie	67
3.5 Antikörpertestung	76
4. Diskussion	84
4.1 Biologische Bedeutung des N – Proteins	84
4.2 Einsatz und Bedeutung für die Diagnostik	84
4.3 Hat die Zunahme des Molekulargewichtes der exprimierten Proteine eine Änderung der Antigenität zur Folge?	86
4.4 Kreuzreaktivität der Hantaviruserotypen	87
4.5 Aminosäurenaustausche innerhalb der exprimierten N – Proteine	90
4.6 Vakzination	92
4.7 Zukunftsaussichten	96
5. Zusammenfassung	97
6. Literaturverzeichnis	98
7. Anhang	112
7.1 Tabellenverzeichnis	112
7.2 Abbildungsverzeichnis	112
7.3 Abkürzungen	114
7.4 Sequenzierungsergebnisse	116