

1. Einleitung

1.1 Hantaviren

1.1.1 Einführung

Hantaviren gehören zur Familie der Bunyaviridae und sind infektiöse Ursache des Hämorrhagischen Fiebers mit Renalem Syndrom (HFRS). Neben der klassischen klinischen Erscheinung des HFRS tritt die Infektion als Hanta Pulmonary Syndrome (HPS) und in einer mildereren Verlaufsform als Nephropathia epidemica (NE) weltweit auf. HFRS ist in verschiedenen Ländern zu einem signifikanten Problem der öffentlichen Gesundheit geworden. Von bis zu 150 000 Erkrankungen wird jährlich in China berichtet (Chen et al., 1986). Mehrere tausend Fälle der Nephropathia epidemica ereignen sich jährlich in Skandinavien, dem westlichen Russland und in Zentraleuropa (Brunner – Korvenkontio et al., 1980; Niklasson et al., 1987; Plyusnin et al., 1996). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind dabei über 20 verschiedene Hantavirustypen beschrieben worden, die sich durch ihr natürliches Wirtstier als Überträger der Infektion, in der klinischen Ausprägung und dem Schweregrad der Erkrankung unterscheiden.

Die Viren stellen sich als behüllt dar und ihr Genom ist aus 3 RNA – Segmenten, die in Negativorientierung vorliegen, aufgebaut. Allen Bunyavirustypen ist die Übertragung auf den Mensch durch Arthropodenstiche gemeinsam. Einzige Ausnahme stellt das Hantavirus dar, dessen Übertragung durch Inhalation von Aerosolen von Exkrementen chronisch infizierter Nager, die das natürliche Wirtsresevoir stellen, stattfindet.

1.1.2 Epidemiologie und Übertragung

Die große Gruppe der Hantaviren besteht aus mehr als 20 verschiedenen Subtypen. Nach der Entdeckung des Hantaanvirus 1978 gelang es, verschiedene verwandte Viren als Ursache von Erkrankungen zu beschreiben. Sie unterscheiden sich durch ihr jeweiliges Vorkommen in verschiedenen Mäuse – und Rattenarten als natürlichem Wirtstier, in denen die Viren eine persistierende Infektion mit asymptomatischen Verlauf hervorrufen und durch die Ausprägung der Erkrankung. Nach der

Ausscheidung von infektiösen virushaltigen Exkrementen und anschließender Inhalation durch den Menschen findet das jeweilige Virus Eintritt in den humanen Organismus und verursacht eine Infektion. Die geographische Verteilung von Hantavirusinfektionen, die klinisch als HFRS, HPS und NE in Erscheinung treten, entspricht den natürlichen Lebensräumen des jeweiligen Wirtstieres.

Das Hantaanvirus wird von *Apodemus agrarius*, der gestreiften Feldmaus, übertragen. *Apodemus agrarius* ist in China, Japan und Korea heimisch und besiedelt bevorzugt landwirtschaftliche Flächen. Deshalb stellt die Bevölkerung der ländlichen Umgebung und in der Landwirtschaft Beschäftigte die Hauptrisikogruppe für eine Infektion dar. In China werden jedes Jahr etwa 150 000 neue Erkrankungsfälle von HFRS beschrieben. In Korea und dem östlichen Russland schwankt die Zahl zwischen 300 und 900 Patienten jährlich.

Das Dobravavirus, auch Belgradvirus genannt, wird von der Gelbhalsmaus, *Apodemus flavicollis*, übertragen. Das Virus verursacht zum Teil schwere Verläufe von HFRS auf dem Balkan, im südlichen Europa, Tschechien und Brandenburg, dem natürlichen Lebensraum von *Apodemus flavicollis*. Infektionen, verursacht durch das Dobravavirus werden ebenfalls hauptsächlich in ländlicher Umgebung beschrieben und treten deshalb gehäuft in landwirtschaftlichen Berufsgruppen auf. Untersuchungen zur Verbreitung des Virus ergaben am Beispiel des nördlichen und westlichen Griechenlands messbare Antikörpertiter bei bis zu 14% der Bevölkerung (Antoniadis A. et al., 1987).

Die Puumalaviren sind in Europa, vor allem in Skandinavien und dem osteuropäischen Raum verbreitet und Ursache einer milden Verlaufsform des HFRS, der Nephropathia epidemica (NE). Der natürliche Wirt für das Virus ist die Rötelmaus, *Clethrionomys glareolus*, einer in Europa heimischen Art. Damit ist das Puumalavirus der für unsere geographischen Breiten bedeutende Virussubtyp. Serologische Untersuchungen ergaben dazu, dass etwa 1,7% der Bevölkerung der BRD Antikörper gegen die Viren aufweisen. In bekannten endemischen Gebieten des Virus in Schweden wurde eine Durchseuchung der Bevölkerung von bis zu 20% gezeigt (Hörning J. et al., 1992).

Das Seoulvirus wird von den beiden Rattenspezies *Rattus rattus* und *Rattus norvegicus* übertragen und ist aufgrund deren Vorkommen in Hafenstädten weltweit verbreitet. Der Subtyp Seoul ist außerdem das einzige Virus, das eine Erkrankung in städtischen Gebieten verursacht.

1993 wurde das Sin – Nombre – Virus als Ursache des Hanta Pulmonary Syndrome (HPS) in den USA erkannt. In den folgenden Jahren wurden immer mehr dazu

verwandte Virussubtypen beschrieben, die gemeinsam als Neue Welt Viren bezeichnet wurden. Die Viren sind auf dem ganzen amerikanischen Kontinent verbreitet und werden durch die Subfamilie der Sigmodontinae übertragen. Erstmals wurde dabei für das Andesvirus die Übertragung von Mensch zu Mensch diskutiert. Das HPS stellt sich als schwere Erkrankung des Respirationstraktes dar und weist eine Mortalität von bis zu 60 % auf.

Einen Überblick über die verschiedenen Hantavirussubtypen gibt die Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über die Hantavirus – Serotypen

(modifiziert nach O. Vapalahti, 1996)

Hantavirus Serotyp	Wirtstier	Verbreitung	Klinisches Bild
	Ordnung Rodentia, Familie Muridae Subfamilie Murinae		
Hantaan (HTN)	Apodemus agrarius	China, Japan, Korea, östl Russland	HFRS, KHF
Dobrava (DOB)	Apodemus flavicollis	Balkan (Slowenien), südliches Europa	HFRS
Seoul (SEO)	Rattus norvegicus, Rattus rattus	Asien, weltweit in Häfen	HFRS
Thailand (THAI)	Bandicota indica	Asien (Thailand)	?
	Subfamilie Arvicolinae		
Puumala (PUU)	Clethrionomys glareolus	Europa (Skandinavien), Russland	NE
Topografov (TOP)	Lemmus sibiricus	Sibirien	?
Prospect Hill (PH)	Microtus pennsylvanicus	Nordamerika (USA)	Apathogen?

Tula (TUL)	Microtus arvalis, Microtus rossiaemeridionalis	Europa (Russland, Tschech. Republik, Slovakei)	?
Isla Vista (ILV)	Microtus californicus	Nordamerika (USA)	?
Khabarovsk (KBR)	Microtus fortis	Asien (östl. Russland)	?
	Subfamilie Sigmodontinae		
Sin Nombre (SN)	Peromyscus maniculatus	Nordamerika (USA, Kanada)	HPS
New York (NY)	Peromyscus leucopus	Nordamerika (USA)	HPS
Bayou (BAY)	Oryzomys palustris	Nordamerika (USA)	HPS
El Moro Canyon (ELMC)	Reithrodontomys megalotis	Nordamerika (USA)	?
Rio Segundo (RIOS)	Reithrodontomys mexicanicus	Nordamerika (USA)	?
Mule Shoe	Sigmodon hispidus	Nordamerika (USA)	HPS
Andes (AND)	Oligoryzomys longicaudatus	Argentinien	HPS, zwischenmenschliche Übertragung?
Laguna Negra	Calomys laucha	Paraguay	HPS
Rio Mamore	Oligoryzomys microtus	Bolivien	HPS
Cano Delgadito	Sigmodon alstoni	Venezuela	HPS
Black Creek Canal	Sigmodon hispidus	Florida	HPS
Andere			
Bloodland Lake	Microtus ochrogaster	Nordamerika (USA)	HPS
Juquitiba	?	Brasilien	HPS

Oran	Oligoryzomys longicaudatus	Argentinien	HPS
Lechiguanas	Oligoryzomys flavescens	Argentinien, Uruguay	HPS
Bermejo	Oligoryzomys chacoensis	Argentinien	HPS
Pergamino	Akodon azarae	Argentinien, Uruguay	HPS
Maciel	Bolomys obscurus	Argentinien, Uruguay	HPS
Hu39694	?	Argentinien, Uruguay	
	Ordnung Insectivora		
Thottapalayam (TPL)	Suncus murinus	Asien (Indien)	

1.2 Geschichtlicher Hintergrund

Das Hantaanvirus wurde 1978 erstmals als infektiöses Agens des HFRS von H. Lee und Mitarbeitern beschrieben (Lee H. W., 1978). Sie isolierten das Virus aus Lungengewebe von Apodemus agrarius, einer in Südkorea heimischen Maus. Der Name Hanta leitet sich dabei vom Grenzfluß Hantaan zwischen Nord- und Südkorea ab (Lee et al., 1978), denn erste internationale Aufmerksamkeit erregte das Virus im Koreakrieg 1951 bis 1953. Mehrere tausend südkoreanische und amerikanische Soldaten erkrankten damals an einer schweren Infektionskrankheit, die in Stadien mit Hämorrhagien, akuten Nierenversagen und Schock ablief. Die Gesamtmortalität wurde auf 15- 25 % beziffert. Doch schon vor diesem Ereignis wurden Epidemien mit der charakteristischen Klinik, häufig in Zusammenhang mit militärischen Ereignissen, als sogenannte „Feldnephritis“ beschrieben. So geht die vermutlich älteste Aufzeichnung einer Hantavirusinfektion aus chinesischen Schriften aus dem 1. Jahrhundert nach unserer Zeitrechnung (McKee et al., 1991) hervor. Russische Berichte von 1913 beschrieben die Erkrankung im östlichen

Sibirien (Casals et al., 1970). Alliierte und deutsche Truppen waren während des 1. Weltkrieges in Flandern (Bradford et al., 1916; Arnold et al., 1944), japanische Militärs nach der Invasion in der Mandschurei 1930 (Kitano et al., 1944) von der Kriegsnephritis betroffen. Während des 2. Weltkrieges erkrankten deutsche Soldaten in Lappland und Jugoslawien (Stuhlfauth et al., 1943; Hortling et al., 1944; Gajdusek et al., 1956 und 1983).

Nach der Hantaanvirusisolierung 1978 durch Lee und Mitarbeiter wurden serologische Verfahren entwickelt, die zeigten, dass weltweit verbreitete, verwandte Viren aus der Familie der Bunyaviridae Auslöser des HFRS und ähnlich verlaufende Erkrankungen waren. Die serologische Charakterisierung ermöglichte die erstmalige Einteilung in die verschiedenen Serotypen (van der Groen et al. 1989; Lee, H.W., 1989; Pilaski et al., 1986). Eine weitere Unterscheidung ist durch die Übertragung durch verschiedene Wirtstiere gegeben.

Tabelle 2: Erstmalige Typisierung von Hantaviren (nach Lee et al., 1989)

Serotyp	Nagetiergattung	Prototyp des Virus
I	Apodemus	Hantaan
II	Rattus	Seoul
III	Clethrionomys	Puumala
IV	Microtus	Prospect Hill
V	Mus domesticus	Leakey

1.3 Molekularbiologie und Aufbau des Hantavirus

Wie alle Vertreter aus der Familie der Bunyaviridae sind Hantaviren behüllte Viren, die ein dreigeteiltes RNA – Genom mit negativer Polarität aufweisen. Morphologisch weisen die Viruspartikel eine Pleomorphie auf, erscheinen jedoch zumeist spärlich. Der Durchmesser liegt zwischen 70 und 210nm (Hung et al., 1988; Goldsmith et al., 1995). Der Lipidbilayer ist assoziiert mit den integrierten Glykoproteinen G1 und G2 (Schmaljohn et al., 1983), die als Oberflächenproteine 7nm aus der Membran hervorragen (Goldsmith et al., 1995). Die Hülle umgibt das Genom. Dieses besteht aus

3 RNA - Segmenten, die als S- (small), M- (middle), und L- (large)- Segment bezeichnet werden. Die 3 Segmente liegen komplexiert mit den Nukleokapsidproteinen (N – Proteine) und einer RNA abhängigen viralen RNA –Polymerase (L – Protein) als helikale Nukleokapside vor.

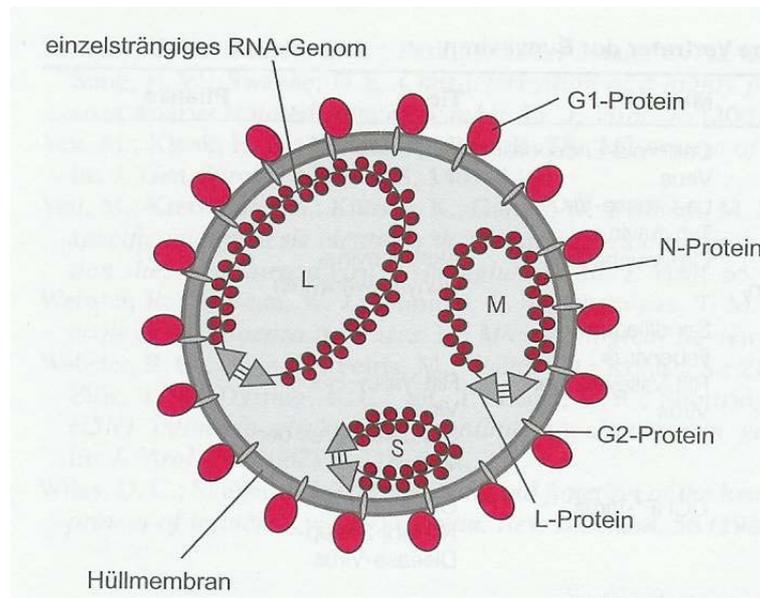


Abb. 1: Aufbau eines Hantaviruspartikel

Die RNA – Segmente aller Bunyaviren besitzen eine 3´- terminal gelegene konservierte Basenabfolge, die sich für die verschiedenen Bunyaviren genuspezifisch unterscheiden (Elliott et al., 1990). Innerhalb eines Virussubtypes (z. B. für Hantaviren) sind diese Sequenzen für alle 3 RNA – Segmente absolut identisch. Alle RNA – Segmente der Hantaviren zeigen die Nukleotidabfolge 3´- AUCAUCAUCUGAGG (vgl. Lee et al., 1989), sowie die komplementäre Sequenz 5´- UAGUAGUAGACUCC. Durch diese Komplementarität wird eine Zusammenlagerung zum Doppelstrang als sogenannte Pfannenstielform erreicht, wodurch sich stabile Sekundärformen ausbilden können. Außerdem haben diese komplementären Sequenzen die Funktion einer cis-aktiven Sequenz zur Initiation der Transkription und der Replikation.

Die verschiedenen RNA - Segmente kodieren für verschiedene Strukturproteine. Dabei benutzen Hantaviren eine relativ einfache, unisense Kodierungsstrategie (Cosgriff et al., 1989). So kodiert das S-Segment (1800nt) mit einem offenen Leserahmen (ORF) das Nukleokapsidprotein (NP) (ca. 50kD). Neben der Virusorganisation als Nukleokapsid

stellt das resultierende N – Protein das antigenetische Hauptziel der humoralen Immunantwort dar. Das M- Segment (3600nt) codiert für zwei Membranproteine, dem Glykoprotein G1 (65-74kD) und dem Glykoprotein G2 (55-60kD) (Schmaljohn et al., 1987). Ein gemeinsames Vorläuferprotein (126kD) (Kolakofsky et al., 1991) wird dabei durch eine zelluläre Protease im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums in ein aminoterminales G1- und in ein carboxyterminales G2-Protein proteolytisch gespalten. Es wird angenommen, dass die Spaltung unmittelbar nach der Aminosäuresequenz WAASA als Signalmotiv stattfindet. Das G1-Protein ist dabei definitionsgemäß größer als das G2-Protein. Zusätzlich dazu entstehen bei Bunya- und Phlebovirus noch ein kleines NSm Protein. Hierbei handelt es sich um ein sogenanntes Non-structural protein (middle segment), dessen Funktion jedoch noch unbekannt ist.

Die cysteinreichen glykolysierten und acylierten G1- und G2-Proteine sind in die Hüllmembran des Virus eingelassen und vermitteln die Adhäsion an zelluläre Rezeptoren. Es wird vermutet, daß bei durch Arthropoden übertragenen Viren das G1 - Protein die Adhäsion an Insektenzellen und das G2 - Protein die Adhäsion an Säugerzellen vermittelt. Die beiden Membranproteine sind demnach von zentraler Bedeutung für den Infektionsvorgang.

Vom ORF des L-Segmentes (6500nt) wird die RNA abhängige RNA-Polymerase (200kD) codiert (Kolakofsky et al., 1991), die bei Transkription und Virusreplikation benötigt wird.

1.4 Proteinbiosynthese und Replikation des Virus

Nach Adhäsion des Virus an Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle gelangt es durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle. Hantaviren benutzen dabei für ihren Eintritt in endotheliale Zellen β 1- und β 3 – Integrine (Gavrilovskaya et al., 2002). In Endosomen wird das Virus dann in das Zellinnere transportiert. Eine Ansäuerung des Vesikelinnern führt zu einer Konformationsänderung der Membranproteine G1 und G2 der Virushülle. Diese Änderung leitet die Fusion von Virushülle und Endosomenmembran ein und die Nukleoproteinkomplexe werden in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen.

1.4.1 Transkription und Translation

Die RNA abhängige RNA-Polymerase ist mit den drei RNA- Nukleokapsidsegmenten assoziiert und interagiert mit diesen. Die Polymerase katalysiert die Transkription von viraler mRNA. Dabei wird nur RNA, die assoziiert mit Nukleokapsidproteinen zum Ribonukleotid vorliegt als Matrize für die Transkription verwendet. Die RNA-Segmente liegen im Virus in Negativorientierung vor (vRNA). Da die Transkription primerabhängig ist, führt die Polymerase ein sogenanntes Cap-Snatching durch. Dabei spaltete die Polymerase mit einer assoziierten Endonuklease von einem 5'-Terminus einer wirtseigenen mRNA 10 bis 20 Basen ab. Das freie 3'-OH dieser kurzen Sequenz wird dann als Primer für die Elongation der Transkription einer komplementären mRNA von der vRNA verwendet. Die virale mRNA besitzt dann am 5'-Terminus 10 bis 20 Nukleotide, die in der vRNA nicht vorkommen.

Die Termination der Transkription wird durch verschiedene Terminationsstellen bedingt. Die resultierende mRNA ist nach Transkription am 3'-Terminus um etwa 100 Nukleotide gegenüber der vRNA verkürzt. Am 5'-Terminus unterscheidet sich die mRNA von der vRNA durch das angehängte cap. Ein polyadenyliertes 3'-Ende fehlt. Noch im Verlauf der Transkription wird die Translation initiiert. Freie Ribosomen binden an das 5'-cap der entstehenden mRNA. Dadurch wird eine Doppelstrangbildung zwischen vRNA und mRNA verhindert. Die Translation und Synthese der Glykoproteine beginnt an Ribosomen des Endoplasmatischen Retikulum (ER). Im Lumen des ER wird das entstehende Vorläuferprotein kotranlational in G1- und G2 – Proteine gespalten und die Oberflächenproteine anschließend im Golgi Apparat glykosiliert. Die Translation des S – und des L – Segmentes beginnt an freien Ribosomen im Zytoplasma der infizierten Zelle. Durch Wechselwirkungen zwischen entstandenen Nukleokapsidproteinen und zytoplasmatischen Domänen der entstehenden G1 – und G2 – Proteine wird ein Signal generiert, welches das Budding der Viruspartikel in den Zisternen des Golgi Apparates initiiert. Eine Bilayerschicht aus dem Golgi Apparat bildet die Hülle des entstehenden Virions. Transportvesikel transportieren die entstandenen reifen Viruspartikel anschließend zur Zellmembran und schleusen sie durch nachfolgende Exozytose aus der Zelle aus (Elliott et al., 1990).

1.4.2. Replikation

Um neben bzw. nach der Proteinbiosynthese die Genomreplikation einzuleiten, findet, wenn ausreichende Mengen an neusynthetisiertem N – Protein vorliegen, ein switch in der mRNA Synthese statt. Wurden für die Proteinbiosynthese verkürzte mRNA Transkripte erzeugt, wird jetzt RNA der vollen Länge als Antigenome komplementiert.

Die Transkription der Antigenome für die Replikation findet primerunabhängig statt.

Dieser switch konnte allerdings noch nicht biochemisch definiert werden. Es handelt sich wohl um eine Modifikation der Aktivität der RNA abhängigen RNA - Polymerase, möglicherweise induziert durch eine Interaktion zwischen der Polymerase und dem neu entstandenen Nukleokapsidprotein.

Die entstandenen Antigenome liegen komplexiert mit dem N-Protein vor und dienen als Matrize für die Replikation. Bei der Replikation wird aus den Antigenomen in einer primerunabhängigen, durch die RNA abhängige RNA - Polymerase katalysierten Reaktion, vRNA erzeugt. Neu entstandene vRNA wird anschließend mit N- und L-Protein zur Nukleokapsidstruktur komplexiert.

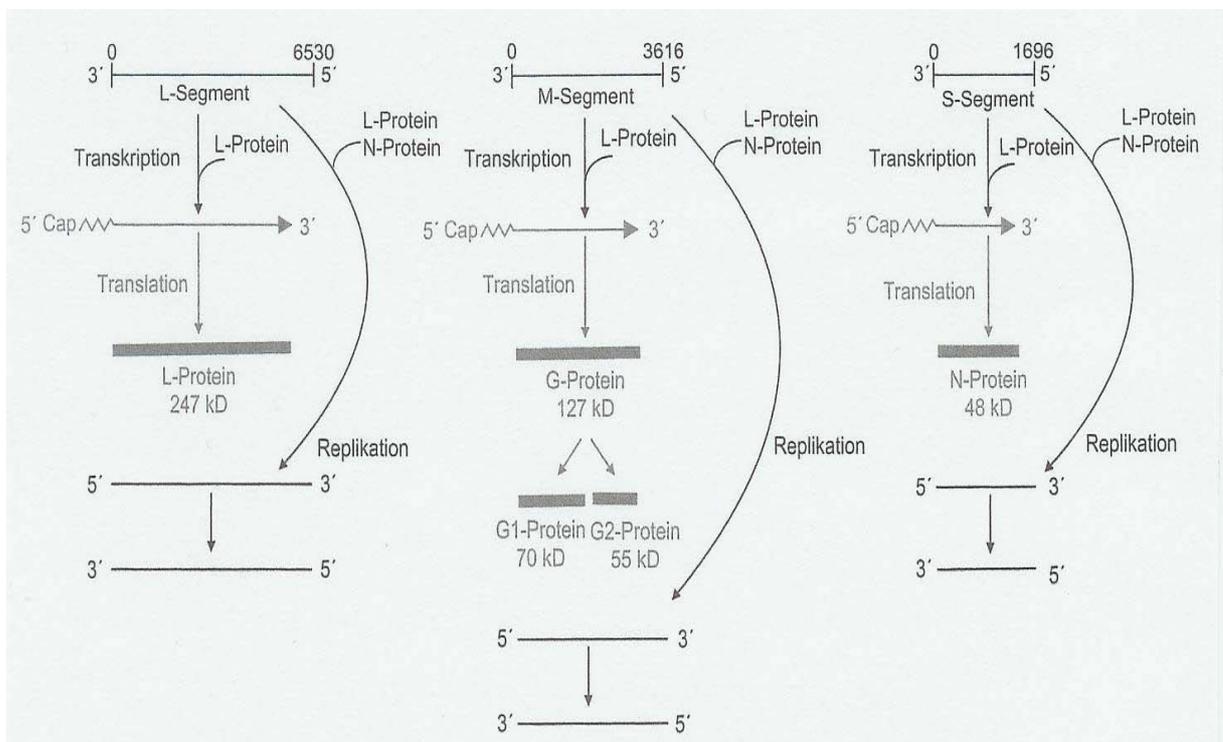


Abb.2: Darstellung der Proteinbiosynthese und der Replikation von Hantaviren

(aus Modrow und Falke, Molekulare Virologie)

Schematische Darstellung der Transkription, Translation und Replikation des Genoms von Hantaviren. Die S-, M- und L- Segmente werden in mRNA mit cap transkribiert. Das L – Protein als Bestandteil der Viruspartikel katalysiert diesen Schritt. Von den gebildeten mRNAs werden die N-, M- und L – Proteine translatiert. Sobald ausreichende Mengen von neusynthetisierten N – Proteinen in der Zelle vorliegen werden ungecappte RNA- Stränge in positiver Orientierung als Antigenome gebildet, die als Matrizen für die Bildung von RNA in Negativorientierung dienen.

1.5 Pathogenese der Hantavirusinfektion

Die klinischen Bilder, mit denen Hantavirusinfektionen in Erscheinung treten, sind das Hämorrhagische Fieber mit Renalem Syndrom (HFRS), das Hanta Pulmonary Syndrome (HPS) und die Nephropathia epidemica (NE). Hantaviren verursachen in Nagetieren als natürlichem Wirt eine persistierende asymptomatische Infektion. Die Viren werden dabei in hoher Konzentration in Urin und Faeces durch die Tiere ausgeschieden, Menschen infizieren sich durch die Inhalation virushaltiger Aerosole und Stäube. Beim HFRS stehen Hämorrhagien und Nierenfunktionsstörung, beim HPS das akute Lungenödem im Vordergrund der Klinik. Die NE verläuft generell milder.

Bei allen Erkrankungen kann eine Permeabilitätsänderung von Gefäßen und eine Thrombozytopenie beobachtet werden. Die zentrale pathophysiologische Änderung ist dabei die Entstehung einer kapillären Dysfunktion, vor allem der kleinen Gefäße und der Kapillaren. Durch eine Änderung der Permeabilität von Gefäßen tritt Plasma aus und es kommt zur Erythrozytendiapedese. Hämorrhagien, Ödeme, Hypotension und Schock können folgen. Diese Pathophysiologie wird zur Erklärung der klinischen Bilder wie der hämorrhagischen Komponente, Lungenödem und Bauchschmerzen aufgrund eines retroperitonealen Ödems herangezogen.

Hantaviren verursachen eine Erkrankung im Menschen, nicht aber im Wirtstier, in dem die Infektion klinisch inapparent abläuft. Sowohl pathogen als auch die nichtpathogen wirkenden Viren weisen den gleichen Gewebetropismus auf und replizieren vor allem in Endothelzellen und Makrophagen (Yanagihara et al., 1990; Pensiero et al. 1992; Hughes et al., 1993). Hantaviren verursachen an den infizierten Endothelzellen nur einen geringen oder gar keinen Schaden, die Zellen werden durch das Virus nicht lysiert (Geimonen et al., 2002). Ein weiterer molekularer Mechanismus scheint auch die Interaktion des PuumalaN – Protein mit dem zellulären Daxx – Protein, einem Apoptoseverstärker, zu sein (Li et al., 2002).

Man weiß zwar, dass Immunzellen zum Ort der Infektion rekrutiert werden, lange war aber unklar, was genau die vaskuläre Permeabilitätsänderung der Gefäße hervorruft (Yanagihara et al., 1990; Nolte et al., 1995). Ein direkter zytopathogener Effekt durch die Viren kann aber ausgeschlossen werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass Hantaviren mit Integrin – Oberflächenrezeptoren von Thrombozyten, Immunzellen und Endothelzellen interagieren (Gavrilovskaya et al., 1998; Mackow et al. 1999). So weiß man heute, dass $\beta 3$ – Integrine neben $\beta 1$ – Integrinen den Viruseintritt in die Zelle vermitteln und eine zentrale Schlüsselfunktion in der Pathogenese einer Hantavirusinfektion spielen. Denn $\beta 3$ - Integrine stellen Oberflächenrezeptoren dar, die Einfluß auf die Regulation der Funktion von Plättchen und der vaskulären Permeabilität besitzen (Gavrilovskaya et al., 1998; Mackow et al., 1999). Sie scheinen Angriffspunkt für das Hantavirus zu sein und durch die Interaktion eine kapilläre Dysfunktion und einen Verlust der regulären Plättchenfunktion zu induzieren. Die endotheliale Zellwanderung (Migration), die neben $\beta 2$ – auch $\beta 3$ – Integrin vermittelt ist, wird wohl ebenfalls durch pathogene Hantaviren blockiert (Gavrilovskaya et al., 2002). Diese Interaktion zwischen Hantaviren und $\beta 3$ - Integrinen wird heute zur Erklärung der viralen Pathogenese herangezogen.

1.6 Klinik der Hantavirusinfektion

Die Pathogenität von Hantaviren ist sehr variabel und reicht von klinisch inapparenten oder milden Verläufen bis hin zu schweren Formen mit hoher Letalität. Nach Inhalation von virushaltigen Exkrementen infizierter Nager kommt es zur Infektion. Die Viren befallen primär die Mukosa des Respirationstraktes, in den ersten 7 Tagen nach Ansteckung kommt es zur Virämie. Nach einer Inkubationszeit von 2 – 3 Wochen tritt die Erkrankung dann klinisch in Erscheinung. Es werden verschiedene Krankheitsbilder in Abhängigkeit des verursachenden Virussubtypes unterschieden.

1.6.1 Hämorrhagisches Fieber mit Renalem Syndrom (HFRS)

Das klassische HFRS wird von den Serotypen Hantaan und Dobrava verursacht und tritt als eine in Stadien verlaufende Erkrankung auf. Nach einem uncharakteristischen

Prodromalstadium kommt es zu einem raschen Fieberanstieg. Diese erste febrile Phase wird von einer grippale Symptomatik, Schmerzen im Abdomen und im Rücken, Myalgien, sowie petechiale Blutungen im Bereich des Gaumens, der Konjunktiven und der Haut begleitet und dauert etwa 3 -8 Tage. Weitere charakteristische Symptome sind eine Rötung des Gesichtes, der vorderen Halspartie und des oberen Thorax. Zervikale, axilläre und inguinale Lymphknoten können schmerzlos vergrößert sein. Ab dem 2. -5. Tag tritt eine zunehmende Proteinurie auf. Die BSG und die Leukozytenzahlen können noch normal oder schon leicht erhöht sein, die Thrombozytenzahlen fallen. Kapillarfragilitätstests (Rumple-Leed-Test) werden häufig schon positiv. Um den 5. Krankheitstag beginnt meist die 2. Phase der Erkrankung, bei der Kreislaufhypotension, Blutdruckabfall und Schocksymptome für die Dauer von etwa 3 Tagen im Vordergrund stehen. Während Fieber und Kopfschmerzen oft nachlassen, bestehen die anderen Symptome der febrilen Phase fort. Der Hämatokrit ist nun erhöht, die Thrombozytenzahlen fallen weiter. Neben einer Leukozytose wird der Anstieg von Harnstoff und Kreatinin, begleitet von einer massiven Proteinurie und Hämaturie als Ausdruck der Nierenbeteiligung beobachtet. In der anschließenden 3. Krankheitsphase steht die Oligurie aufgrund eines akuten Nierenversagens im Vordergrund. Häufig kommt es zu einer Hypervolämie mit arterieller Hypertension. Eine beginnende Urämie äußert sich mit Unruhe, Übelkeit, Erbrechen und Tremor. Die Blutungsneigung verstärkt sich und äußert sich in Petechien, Epistaxis bishin zu schweren gastrointestinalen Blutungen. Etwa die Hälfte der Todesfälle treten in diesem Stadium auf. Es folgt die diuretische Krankheitsphase, die der klinischen Besserung vorangeht und mehrere Wochen andauern kann. Sie ist gekennzeichnet durch eine Polyurie mit 5 Litern Urin und mehr am Tag und einer langsamen Verbesserung der Nierenfunktion. Die anschließende Rekonvaleszenzphase dauert Wochen bis Monate. Der Patient erholt sich und es tritt eine vollständige Heilung mit schrittweiser Verbesserung der Nierenfunktion ein.

Tabelle 3: Vetreter der Hantaviren, die mit HFRS assoziiert sind

(modifiziert nach M. Linderholm et al.)

Hantavirus Serotyp	Wirtstier	Erkrankung	Geographische Verbreitung
Hantaan	Apodemus agrarius	HFRS, Koreanisches Hämorrhagisches	Ostasien

		Fieber (KHF)	
Seoul	Rattus rattus/ norvegicus	HFRS (urbaner Typ)	weltweit
Dobrava	Apodemus flavicollis	HFRS (KHF- ähnlich)	Balkan
Puumala	Clethrionomys glareolus	HFRS (NE)	Europa

1.6.2 Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS)

Das Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) wird vor allem durch den Serotyp Sin Nombre (SNV) übertragen. Das Virus wurde 1993 erstmals im Südwesten der USA beschrieben und dort für den Ausbruch einer fieberhaften Erkrankung mit akuter respiratorischer Insuffizienz verantwortlich gemacht (Duchin et al., 1994). Nach dieser Entdeckung wurden bis heute viele neue Serotypen in Nord- und Südamerika als Ursache von HPS Fällen als sogenannte Neue Welt Hantaviren beschrieben. Zu nennen sind zum Beispiel das Bayon- (BAY), Black Creek Canal- (BCC) und das New York Virus (NY). Eine Übersicht über die Neue Welt Viren gibt Tabelle 1.

Bis 1996 war eine Übertragung von Hantaviren von Mensch zu Mensch nicht beschrieben worden. Im März 1995 kam es allerdings zu einem familiären Ausbruch von HPS in Argentinien, was zur Entdeckung des Andesvirus führte. Dieses Virus ist offensichtlich zur zwischenmenschlichen Übertragung und Ansteckung von HPS fähig. Der Infektion mit dem Serotyp Sin Nombre folgt eine Inkubationszeit von 1 bis 5 Wochen nach der ein 4 phasischer Krankheitsverlauf klinisch in Erscheinung tritt.

In der febrilen Phase kommt es zu einem 3 – 5 Tage dauernden Prodromalstadium. Fieber, Myalgien, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Durchfall, abdominale Schmerzen, sowie unspezifischen grippale Symptome sind uncharakteristische Erscheinungen. Gegen Ende der ersten Phase wird die pulmonale Beteiligung mit beginnendem Lungenödem, unproduktivem Husten und Tachypnoe deutlich. In der zweiten kardiopulmonalen Phase steht dann der rapide Progress der pulmonalen Symptomatik im Vordergrund. Innerhalb weniger Stunden kommt es zu einem ausgeprägten Lungenödem, das von Hypotension, Oligurie und Schock, extremer Tachypnoe, Dyspnoe und Hypoxämie begleitet wird. Röntgenologisch fällt dabei das

Fortschreiten eines interstitiellen Lungenödems zu einem bilateralen alveolären Lungenödem als morphologisches Korrelat der zunehmenden pulmonalen Verschlechterung auf. Ist dieser limitierende Krankheitsabschnitt überwunden und setzt eine spontane Diurese als Ausdruck der erreichten diuretischen Phase ein, so ist mit einer schnellen Rückbildung des Lungenödems, von Fieber und Schocksymptomen zu rechnen. In der anschließenden, bis zu 2 Monate dauernden Rekonvaleszenzphase regeneriert sich die pulmonale Funktion vollständig, der Patient erholt sich. Laborchemisch fallen vor allem in späteren Phasen eine Thrombozytopenie, normale bis erhöhte Leukozytenzahlen mit Linksverschiebung und ein erhöhter Hämatokritwert auf. Eine Mitbeteiligung der Niere kann vorkommen, ist aber nicht wie bei HFRS obligat. Erhöhte Kreatinin und Harnstoffwerte sind demnach häufig nicht auf eine direkte Mitbeteiligung der Niere zurückzuführen, sondern sind vielmehr Ausdruck von Hypovolämie und Schock. Eine passagere Proteinurie und erhöhte Leberenzyme können ebenfalls auftreten.

1.6.3 Nephropathia epidemica (NE)

Die Nephropathia epidemica (NE) wird durch den Serotyp Puumala verursacht und ist in Europa, dem zentralen Russland und in den Skandinavischen Ländern verbreitet. Die NE ist als HFRS mit wesentlich milderem Verlauf einzuordnen. Eine Assoziation zu den HLA Allelen B8, DR3 und DQ2 mit dem Schweregrad des Verlaufs einer Puumalavirusinfektion wurde beschrieben (Mustonen et al., 1996 und 1994).

Die Erkrankung beginnt mit Fieber, Übelkeit, Kopfschmerzen und Schmerzen des Abdomens und des Rückens. Eine charakteristische Rötung von Rachen, Gesicht und Konjunktiven kann beobachtet werden. Hypotensive Beschwerden, Thrombozytopenie, petechiale Blutungen und respiratorische Symptome können auftreten, sind jedoch im Vergleich zum HFRS seltener. In der zweiten Krankheitsphase tritt die Nierenbeteiligung mit Hämaturie, Proteinurie und Oligurie in Erscheinung. Kreatinin und Harnstoff steigen im Serum als Ausdruck einer diskreten Niereninsuffizienz an. Gleichzeitig kommt es aufgrund der verminderten Harnausscheidung zu Hypertension, Bluthochdruck und Elektrolytverschiebungen. Eine begleitende leichte Leukozytose ist häufig zu beobachten. Settergren und Mitarbeiter entwickelten 1988 einen diagnostischen Score, nachdem vier der folgenden sechs Kriterien erfüllt sein müssen,

um die Diagnose NE stellen zu können: akuter Fieberanstieg, Bauch- und/ oder Rückenschmerzen, Thrombozytopenie, Serumkreatininanstieg, Protein- und/ oder Hämaturie und Polyurie. Da bei der NE keine eindeutigen Symptome auftreten und verschiedene Organsysteme betroffen sein können, ist die Diagnose der NE relativ schwierig. Andere Erkrankungen müssen differentialdiagnostisch abgegrenzt werden. Extrarenale Manifestationen der NE sind zum Beispiel Auge (Iritis), ZNS (Meningismus, Guillain – Barre), Lunge (Pneumonie), Herz (Sinusbradykardie, Myokarditis, Perikarditis), Leber (Hepatomegalie, Anstieg der Serumtransaminasen) und der Gelenke (Arthralgien).

1.7 Therapie

Im Vordergrund der Behandlung einer Hantavirusinfektion stehen symptomatische Maßnahmen entsprechend der jeweiligen Krankheitsphase. Diese sind in der hypotensiven bzw. oligurischen Phase vor allem Flüssigkeitssubstitution, Kontrolle und Ausgleich von Elektrolytverschiebungen und Korrektur des Säure-Basen-Haushaltes. Weitere supportive Maßnahmen bestehen in der Gabe von Antipyretika und Analgetika, wobei auf nichtsteroidale antiinflammatorische und andere renal toxisch wirkende Medikamente verzichtet werden sollte. Bei schweren Verläufen von HFRS und nicht beherrschbarem Nierenversagen muß, vor allem in der oligurischen Phase, eine kontinuierliche Hämodialyse in Erwägung gezogen werden. Da die NE generell milder verläuft ist hier auch die Dialyserate niedriger, meist reichen Flüssigkeitssubstitution und Elektrolytausgleich aus. Beim HPS stehen Hypoxiebehandlung und die Überwachung des Kreislaufes im Vordergrund.

Viele Medikamente sind zur Therapie einer Hantavirusinfektion eingesetzt worden, allerdings ist letztlich nur der Einsatz des Virostatikums Ribavirin in Studien als sinnvoll erachtet worden. Es wurde nachgewiesen, dass Ribavirin die Virusreplikation in vitro signifikant (Kirsie et al., 1983) und in vivo die Gesamtmortalität bei frühzeitiger Gabe senkt (Huggins et al., 1991). Außerdem werden hämorrhagische Komplikationen vermindert und die oligurische Phase verkürzt.

1.8 Prognose

Beim Koreanischen Hämorrhagischen Fieber (KHF) ist die Mortalität mit 3 – 10 % angegeben (Lee et al., 1990), wobei die meisten Todesfälle auf Schock und pulmonalen Komplikationen zurückzuführen sind (Lukes et al., 1954). Die NE weist eine wesentlich geringere Mortalität mit unter 0,5% auf (Lee et al., 1990). Das HPS hat trotz intensivmedizinischer Bemühungen eine Todesrate von 50 – 60%, die vor allem durch die extreme respiratorische Insuffizienz bedingt ist.

1.9 Diagnostik

Die Diagnose einer Hantaviruserkrankung stützt sich vor allem auf das klinische Bild der Infektion und die Serodiagnostik. Es wurde gezeigt, dass das hantavirale N – Protein als antigenetisches Hauptziel anzusehen ist und schon in der frühen Phase der Immunantwort hohe Titer von IgM Antikörpern erreicht werden, die gegen das N – Protein gerichtet sind (Lundkvist et al., 1993). Deshalb wird das N – Protein als essentielles Antigen in verschiedenen serologischen Nachweismethoden eingesetzt.

So werden heute rekombinant produzierte Hantanukleokapsidproteine im ELISA – Verfahren eingesetzt, mit dem spezifische IgM- bzw. IgG-Antikörper aus dem Serum von Patienten schon sehr früh in der Erkrankung nachgewiesen werden können. Ein Problem dabei stellt allerdings die Kreuzreaktivität der verschiedenen Serotypen dar, die eine genaue Differenzierung erschwert. Um dem zu begegnen, werden heute Neutralisationstests zur genaueren Festlegung des jeweiligen Serotypes eingesetzt. Auch der Einsatz einer spezifischen PCR wurde probiert, wurde jedoch aufgrund geringer Sensitivität nicht in das diagnostische Programm mit aufgenommen (Hörning et al., 1995).

1.10 Prävention

Die Prävention einer Infektion mit Hantaviren erfolgt am besten durch die Vermeidung einer Exposition vor Nagetierexkrementen.

1.11 Aufgabenstellung/ Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit war es, rekombinante bakterielle Expressionsvektoren für das S – Segment, welches für das Nukleokapsidprotein codiert, der Hantavirusserotypen Puumala und Dobrava zu etablieren.

Dazu wurde virale RNA nach Virusanzucht extrahiert, mittels der Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, durch PCR vervielfältigt und in den pCR2.1TOPO - Vektor der Fa. Invitrogen kloniert. Nach Sequenzierung wurde die cDNA des S - Segment anschließend in den pRSETB Vektor der Fa. Invitrogen als bakteriellen Expressionsvektor umklont und die bakterielle Proteinsynthese des Nukleokapsidproteins von Puumala und Dobrava induziert. Das aufgereinigte isolierte Protein wurde anschließend zur Antikörperproduktion in Kaninchen an die Fa. Eurogentec/ Belgien verschickt. Die bakteriell exprimierten viralen Antigene und die Serotyp – spezifischen Antikörper sollen als differentialdiagnostische Tools für weitergehende Studien verwendet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Materialien

Autoklav	Münchner Medizin Mechanik & Melag
Bakterienschüttler	News Brunswick Scientific
Blottingfilterpapier	Whatman
Blotkammer	Uniwerkstatt
Computer	Apple Macintosh
Einwegspritzen	Braun
Eismaschine	Scotsman
Elektrophoresespannungsgerät	Amersham Pharmacia Biotech
Elektrophoresekammern	Amersham Pharmacia Biotech
Filme	Agfa, Ilford
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Fotokamera	Zeiss, Contax
Gefrierschrank	Liebherr (-4°C), Colora (-80°C)
Glasmaterial	Schott, Sarstest
Handschuhe	Kimberley-Clark
Heizblock	Eppendorf, Thermostat comfort
Inkubatoren (37°C)	Heraeus
Laborwaage	Sartorius
Magnetrührer	Flatspin
Mikroskop	Zeiss
Mikrowelle	AEG
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Superior
Nitrocellulosemembran	Hybond, Amersham Pharmacia Biotech
PCR-Gerät	Applied Biosystems. Perkin Elmer
pH – Meter	WTW, inoLab
Photometer	Amersham Pharmacia Biotech
Pipetten	Gilson

Pipettenspitzen	Maxym, Eppendorf
Pipettierhilfe	Integra Biosciences
Plastikgefäße	Nunc, Greiner, Eppendorf, Falcon
Quarzküvetten	Helma
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Röntgenfilme	Agfa, Cirux
Rotationsmischer	GLW
Sequenziergerät	310 Genetic Analyzer, Abi Prism
Sterilarbeitsbank	Antair, BSK
Sterilfilter	Schleicher&Schuell
Transilluminator	BioRad
UV – Handlampe	IALL
UV – Leuchttisch	Syngene
Vakuumtrockner	Christ
Vortexer	IKA, MS2 Minishaker
Wasserbad	GFL, Haake
Wippe	Assistent
Zellkulturflaschen	Nunc, Greiner
Zellkulturbrutschrank	Heraeus
Zentrifugen	Heraeus, primo Beckham Coulter

2.1.2 Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	BioLabs
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-toluidine salt (BCIP)	Gerbu
Coomassie-Brillantblau G	Sigma

Desoxynukleotid-Mix (dNTBs)	Promega
Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Dithiotreitol	Sigma
100 bp-DNA-Ladder	MBI Fermentas
1 kb-DNA-Ladder	MBI Fermentas
Dulbeccos Modified Eagle Medium(D-MEM)	Invitrogen Corp. (Gibco)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Roth
Essigsäure	Merck
Fötale Kälberserum (FCS)	Life technologies (Gibco)
Glucose	Merck
Glutaraldehyd	Merck
Glycerol	ICN Biomedicals Inc.
Hepes	Roth
Isopropanol	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
LB-Agar	Becton, Dickinson and Company
LB Broth Base	Invitrogen
Magermilchpulver	Kaufland
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck
Methanol	Merck
Beta-Mercaptoethanol	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumazid (N_3Na)	Merck
Natriumbutyrat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natrium-Salt-Bromphenol-Blue (BPB)	Sigma

Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Gerbu
Penicillin	Invitrogen Corp. (Gibco)
Phosphate buffered Saline (PBS)	Invitrogen Corp. (Gibco)
Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas
Streptomycin	Invitrogen Corp. (Gibco)
Template Suppression Reagent (TSR)	Applied Biosystems (Abi Prism)
Terrific Broth	Life Technologies
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin(TEMED)	Roth
Tris-Base	Sigma
Tris-HCl	Roth
Triton X-100	Merck
Trockenmilch	Lasana
Trypsin	Invitrogen Corp. (Gibco)
Tween 20	Serva
X-Gal	Roth

2.1.3 Enzyme

CIAP (calf intestinale alkaline phosphatase)	MBI
Klenow Enzym, LC (2u/μl)	MBI
T4-DNA-Polymerase (1000u)	MBI
Restriktionsenzyme	MBI
RNAseA	
Taq-Polymerase / Herculase	Promega
Lysozym	Fluka Biochemika

2.1.4 Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Quiagen
Auto Seq G-50	Amersham

Nucleo Spin Extract	Macherey-Nagel
ECL+plus	Amersham
PCR Kit	Promega
Alkalische Phosphatase Reaktion	Gerbu
Recom Line Bunyavirus IgG/IgM	Mikrogen
BCA Protein Assay Reagent Kit	PIERCE
TOPOcloning: pCR2.1Topo Vektor	Invitrogen
His – Bind – Resin	Novagen
DNA Sequenzierungsakit	Abi Prism

2.1.5 Nucleinsäuren

λ– DNA	MBI
1kb Marker	MBI

2.1.6 Oligonukleotide

alle Oligonukleotide wurden von der Fa. MWG Biotech hergestellt

Oligonukleotide für die RT- Reaktion :

PuuN:

PUU1 (1098): 5'- TAT GAG TGA CTT GAC AGA TAT CCA AGA GG – 3'

PUU2 (1099): 5'- TTA TAT CTT TAG TGG TTC CTG GTT CG – 3'

DobN:

DOB1 (1104): 5'- TAT GGC AAC ATT AGA GGA ACT C – 3'

DOB2 (1105): 5'- TTA AAG CTT AAG CGG CTC CTG – 3'

Oligonukleotide für die PCR :

PuuN:

PUU1 (1098): 5'- TAT GAG TGA CTT GAC AGA TAT CCA AGA GG – 3'

PUU2 (1099): 5'- TTA TAT CTT TAG TGG TTC CTG GTT CG – 3'

Bezeichnung verwendeter Plasmide:

pCR2.1TOPOPuumalaN	TOPOPuuN
pCR2.1TOPODobravaN	TOPODobN
pRSETBPuumalaN	pRSETBPuuN
pRSETBDobravaN	pRSETBDobN

2.1.8 Antibiotika

Ampicillin:	Stocklösung: 100 mg/ml in H ₂ O Gebrauchsverdünnung: 100µg/ml (1:1000)
Chloramphenicol:	Stocklösung: 34mg/ml in Ethanol Gebrauchsverdünnung: 25µg/ml
Penicillin:	Gebrauchslösung: 30mg/ml
Streptomycin:	Gebrauchslösung: 50mg/ml

2.1.9 Kompetente Bakterien

E.coli JM109

BL21DE3

TOP 10

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden folgende Puffer verwendet:

TJB1: 1.48g Kaliumacetat (30mM)
0.05g RbCl (100mM)
0.74g CaCl₂×2H₂O (10mM)
5.0g MnCl₂ ×4H₂O (50mM)
in 300ml Wasser lösen
ad 75ml Glycerin 99%
pH 5.8 mit Essigsäure einstellen
ad 500ml A. bidest

0.2µm sterilfiltrieren

TJB2: 0.21g MOPS (10mM)
1.1g CaCl₂×2H₂O (75mM)
0.12g RbCl (10mM)
in 50ml Wasser lösen
ad 15ml Glycerin
pH 6.5 mit HCl einstellen
ad 100ml A. bidest
0.2µm sterilfiltrieren

2.1.10 Transformation in kompetente Bakterien

SOC – Medium:

2% Trypsin
0.5% Hefeextrakt
10mM NaCl
2.5mM KCl
10mM MgCl₂
10mM MgSO₄
20mM Glukose

2.1.11 Seren

folgende Seren wurden verwendet:

als primärer Antikörper (AK): His-Tag-AK (Maus)

Patientenserum nach Puumala-Infektion (Anti-PuuN,
IgG)

als sekundärer Antikörper:

Anti-mouse-AK, IgG, POD	Calbochem
Anti-mouse-AK, IgG, AP	Sigma
Anti-human-AK, IgG, POD	Mikrogen
Anti-human-AK, IgG, FITC	Diagnostika
Anti-rabbit-AK, AP	Sigma

2.1.12 Lösungen, Medien und Puffer

2.1.12.1 Bakterienkultur

LB Medium, LB Broth Base Invitrogen

LB – Platten Difco LB Agar Miller, BD

5 × LB-Medium: 100g LB Broth – Base
ad 1l A. bidest

Sterilisierung durch Autoklavieren

Ampicillin: Stocklösung: 100mg/ml

Gebrauchslösung: 100µg/ml (1:1000)

1 × LB-Medium mit Ampicillin:

20ml 5 × LB-Medium

100µl Ampicillin-Stocklösung

ad 1l A. bidest

2.1.12.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Objektträger mit Zellkulturaufsatz (Chamberslides), Deckgläser

Methanol, -20°C

0.1% BSA/ PBS

Eindeckelmedium: 1M Tris, pH 8, 1:10 in Glycerin

2.1.12.3 Zellkultur

Vero – E6 – Zellen: Nierenzellen von der Grünen Meerkatze

ATCC Nummer CCL -26

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) – 10% FCS:

500ml	DMEM mit Glutamax
50ml	FCS (fetal calf serum)
1.2ml	Antibiotikamix

Antibiotikamix

30mg/ml	Penicillin
50mg/ml	Streptomycin

Trypsin

2.1.12.4 Plasmidpräparation

TENS

5ml	100mM Tris, pH 8
500µl	100mM EDTA, pH 8
1ml	5N NaOH
2.5ml	SDS, 10%
ad 36.5ml Wasser	

TE

10mM Tris, pH 7.5
1mM EDTA

70% Ethanol

70ml Ethanol abs.
ad 100ml A.bidest

2.1.12.5 Proteinexpression und –aufreinigung

IPTG peQLab

Stocklösung: 100mM

Gebrauchsverdünnung: 1:100, 1mM

8 × Binde-Puffer-Stocklösung

40mM Imidazol
4M NaCl
160mM Tris-HCl, pH 7.9
einstellen auf pH 7.9

1 × Binde-Puffer/ 6M Urea

50ml 8×Binde-Puffer-Stocklösung
148g Urea
ad 400ml A. bidest

8 × Wasch-Puffer-Stocklösung

480mM Imidazol
4M NaCl
160mM Tris-HCl, pH 7.9
einstellen auf pH 7.9

1 × Wasch-Puffer/ 6M Urea

50ml 8×Waschpuffer-Stocklösung
148g Urea
ad 400ml A. bidest

PBS/ 1% Triton X

0.1 M Nickelsulfat

4 × Eluierungspuffer-Stocklösung

4M Imidazol
2M NaCl
80mM Tris-HCl, pH 7.0
einstellen auf pH 7.9

1 × Eluierungspuffer

3ml 8× Eluierungspuffer-Stocklösung

ad 12ml A.bidest

Lysozym (Endkonzentration 100µg/ml)

DNase (10 Units/ml)

Dialyseschläuche, DIALYSIS TUBING Sigma

Dialyse – Puffer: TNE

10mM Tris-HCl, pH8

100mM NaCl

1mM EDTA, pH 8

2.1.12.6 Agarosegel Elektrophorese

50 × TAE –Puffer

242g Tris

57.1ml Essigsäure

18.6g EDTA

ad 1l A.bidest

Ethidiumbromid-Stocklösung

1% (10mg/ml) Stammlösung

6 × Bromphenolblau (BPB)-Ladepuffer

40g Sucrose

0.125g BPB

1ml SDS, 10%

ad 100ml A.bidest

2.1.12.7 SDS – PAGE

Acrylamid – Lösung

Acrylamidstammlösung, 38%

Bisacrylamid, 2%

Rotiphorese Gel 40, Fa. Roth

Trenngel – Puffer

1.5M Tris – HCl, pH 8.8

Sammelgel – Puffer

1.0M Tris – HCl, pH 6.8

TEMED

TEMED, 99%

SDS – Lösung

SDS, 10%

Ammoniumperoxodisulfat – Lösung

Ammoniumperoxodissulfat (APS), 10%

2 × Proteinproben Puffer (PPP)

0.125M Tris

4% SDS

20% Glycerol

10% beta-Mercaptoethanol

0.1% Bromphenolblau

2.1.12.8 Western Blot

Blotpuffer

5.81g Tris

2.93g Glycerin
0.37g SDS
200ml Methanol
ad 1l A. bidest

PBS (Phosphate Buffered Saline)

8.0g NaCl
0.2g KCl
0.167g CaCl₂ × 6H₂O
0.1g MgCl₂ × 6H₂O
1.15g Na₂HPO₄ × 2H₂O
0.2g KH₂PO₄
ad 1l A. bidest

Blocklösung (PBS/ 4% Milchpulver)

4g Magermilchpulver
100ml PBS

Antikörperverdünnungslösung (PBS/ 5 %BSA)

5g BSA
100ml PBS

Waschlösung (PBS-Tween 20/ 0.5%)

5ml Tween 20
ad 1l PBS

Coomassieblau – Färbelösung

6mg Bromnaphthol in 2ml Methanol lösen
25ml PBS
10µl H₂O₂

Entfärbelösung

10% Essigsäure
25% Methanol

65% H₂O

Nitrocellulosemembran, Hybond ECLAmersham pharmacia biotech

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht und Kultur von Viren

Die Virusanzucht der beiden hantaviralen Stämme Puumala und Dobrava fand im S3-Labor statt. Dazu wurden Vero-E6-Zellen in Kultur genommen und mit virushaltigem Zellüberstand, der aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg stammt, infiziert. Die Vero-E6-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Grundfläche ausgesetzt und in Kulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ – Gehalt und 95% Luftfeuchtigkeit als Standardbedingungen im Zellkulturschrank angezchtet. Als Kulturmedium wurde DMEM, versetzt mit 10% FCS, Penicillin und Streptomycin, verwendet, alle Arbeiten der Zellkultur fanden unter der Sterilbank statt. Nach wenigen Tagen waren die am Flaschenboden adhärenen Zellen zu einem dichten Rasen gewachsen und wurden je nach Dichte gesplittet. Kulturmedium wurde abgezogen, die konfluenten Zellen mit 2ml PBS gespült und mit 3ml Trypsin für 5 bis 10 Minuten bei 37°C vom Boden gelöst und separiert. 8ml Kulturmedium wurden zugegeben und noch zusammenhängende Zellen durch mehrfaches Mischen mit der Pipette getrennt. Davon wurden dann 9ml abgezogen und die verbliebene Zellösung mit frischem Kulturmedium auf 10ml aufgefüllt, so dass die Zellzahl auf 1: 10 reduziert war. Die Zellen wurden für 3 bis 5 Tage im Zellkulturbrutschrank weiterkultiviert. Am Vortag der Infektion wurden 1 000 000 Vero-E6-Zellen in Kulturflaschen mit einer Grundfläche von 25cm² ausgesät. Diese wurden mit 2ml aufgetautem infektiösen virushaltigen Überstand versetzt. Die Infektion erfolgte mit Kulturüberstand von Puumala (Sotkamo) und Dobrava (Saarema). Eine Negativkontrolle wurde ebenfalls angesetzt. Die Kultur der Viren erfolgte im Zellkulturbrutschrank unter beschriebenen Bedingungen. Sobald die Zellen konfluent waren, wurden sie mit 2ml PBS gespült, mit 0.5ml Trypsin vom Kulturflaschenboden abgelöst und 9.5ml frisches Medium zugegeben, um die Zellen dann in eine größere Kulturflasche mit einer Grundfläche von 75cm² umzusetzen. Die Zellen wurden weiterkultiviert und alle 3 bis 5 Tage gesplittet.

Um den Infektionsstatus der Zellen beurteilen zu können, wurde die Indirekte Immunfluoreszenz (siehe 2.2.4.3) durchgeführt. Zellen, die dabei stark positive Signale aufwiesen, wurden zur Präparation von hantaviraler mRNA verwendet.

2.2.2 RNA Präparation

Beim Splitten der infizierten Zellen wurde ein Teil der Zelllösung (1/3 bis 1/10) weiterkultiviert, die restlichen Zellen wurden der RNA Präparation mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit zugeführt. Zur Asservierung von Zellmaterial wurden deshalb die beim Splitten reduzierten Zellen nicht mit Medium, sondern mit PBS auf 10ml aufgefüllt. 1ml der Zell-PBS-Lösung verblieb in der Flasche und wurde mit 9ml Medium zur Weiterkultivierung aufgefüllt. Die restlichen 9ml wurden in ein 15ml Falcon-Bluecap Gefäß gefüllt und zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und das Zellpellet in 1.8ml RLT-Puffer mit Beta-Mercaptoethanol homogenisiert. Die Proben wurden weiterverarbeitet oder bei -80°C eingefroren.

Die RNA-Präparation wurde mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit (Spin Protocol) durchgeführt. Dazu wurde zum Zellysats gleiches Volumen an 70% Ethanol gegeben und gemischt. Die Probe wurde auf eine RNeasy Mini Spin Säule aufgetragen und für 15 Sekunden bei 10 000rpm zentrifugiert. 700µl des Puffers RW1 und wiederholt 500µl des Puffers RPE wurden auf die Säule aufgetragen und abzentrifugiert. 30µl RNase freies Wassers wurde auf die Säule gegeben, um durch anschließende Zentrifugation die hantvirale RNA aus der Säule zu eluieren. Die Konzentration der eluierten Nukleinsäure wurde photometrisch bestimmt.

2.2.3 Reverse Transkriptase-Polymerase Ketten-Reaktion (RT-PCR)

1. RT

Die Reverse Transcriptase (RT) ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase und stellt einen charakteristischen Bestandteil von Retroviren dar. Das Enzym schreibt die RNA dieser Viren in komplementäre DNA-Moleküle (cDNA) um, die dann als Provirus in das Wirtszellgenom integriert wird. Das Dogma der Molekularbiologie, die Annahme des obligatorischen unidirektionalen Flusses in der Synthese von RNA zur DNA, wurde durch die Entdeckung der RT widerlegt.

Die RNA der hantviralen S-Segmente von Puumala und Dobrava, welche für das jeweilige Nukleokapsid-Protein (N-Protein) codieren, wurde mit Hilfe der RT-Reaktion in die stabilere cDNA umgeschrieben. Die cDNA war außerdem Voraussetzung für

weitere molekularbiologische Modifikationen. Spezifische Primer waren notwendig, um die Reaktion zu initiieren.

2. PCR (Mullis et al., 1986):

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde für die selektive Amplifikation einer bestimmten DNA Sequenz eingesetzt. Die Spezifität der Reaktion für einen bestimmten DNA Abschnitt wurde durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotidprimer erreicht. Dabei wurde die Zielsequenz durch das spezifische Primerpaar erkannt und flankiert. Ein Primer lagert sich auf dem (+)-, der andere auf der (-)- Strang der Ziel-DNA an. Das Prinzip der PCR ist im Folgenden dargestellt: 1. Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 94°C, 2. Annealing (Anlagerung) der Primer bei 50 bis 55°C an die Komplementärsequenz der DNA, und 3. Elongation bei 72°C, wobei das hitzestabile Enzym Taq Polymerase, ausgehend von beiden Primern, die zugefügten dNTP's zu einem komplementären DNA Strang zusammenfügt. Durch Wiederholung der Zyklen wird die selektive Amplifikation einer DNA Sequenz erreicht.

3. RT-PCR

RT und PCR wurden als RT-PCR in einem fortlaufenden Arbeitsprozeß nach folgendem Protokoll zusammengefasst. Verwendet wurde die Superscript II (Polymerase) von Promega.

1.RT: 1µl Primer (entspricht 20 µg/µl)
 3-5µl RNA
 1µl RNase Inhibitor
 add H₂O auf 12µl
 70°C für 10 min, danach auf Eis
 4µl 5 × First Strand Buffer
 2µl 0.1M DTT
 1µl 10 mM dNTP Mix
 42°C für 2 min
 1µl SUPERSCRIPT II (= 200 units)
 42°C für 50 min
 Reaktionsinaktivierung: 70°C für 15 min, 30°C für 30 min
 Zusatz von RNaseA (1%): 94°C für 10 min,

2.PCR: Ansatz: 10µl cDNA
 3µl Primer 1
 3µl Primer 2
 2µl dNTB Mix
 3µl Taq Extender Buffer
 0.4µl Taq Extender
 0.7µl Taq Polymerase
 7.9µl H₂O
 Totalvolumen: 30µl

Beginn der PCR: Erhitzen des Thermocyclers auf 94°C

Folgende Zyklen werden 35 bis 40mal wiederholt:

94°C, 30 sec

50-55°C, 1 min

72°C, 2 min

Ende der PCR

72°C, 6min

4°C, ∞

Ein kleiner Teil der PCR-Lösung wird auf ein Agarosegel aufgetragen, um die PCR Produkte darzustellen und zu bestätigen.

2.2.4 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit einer Nukleinsäurenverdünnung von 1:100 wurde eine spektrophotometrische Extinktionsmessung bei $\lambda = 260$ nm durchgeführt. Das Prinzip der Messung ist, dass ein Lichtstrahl durch eine nukleinsäurehaltige Lösung fällt und dadurch von einem Photometer eine konzentrationsabhängige Extinktion bei bekannter Wellenlänge ermittelt wird. Für die Messung wurden Quarzküvetten benutzt. Vor Beginn der Probenmessung wurde das Gerät mit der Extinktion von Wasser als Nullwert kalibriert. Die Reinheit bzw. der Grad der Verschmutzung der Probe konnte durch den Quotienten der Optischen Dichte (OD) bei $\lambda = 260$ und der OD bei $\lambda = 280$ angegeben werden. War

der Quotient größer 1,8, so galt die Probe als rein. Mit folgender Formel konnte die Nukleinsäurenkonzentration berechnet werden:

$$\text{OD-Wert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionsfaktor (Multiplikationskoeffizient)} \\ = x \mu\text{g/ ml}$$

Extinktionsfaktoren: für dsDNA: $50 \mu\text{g/x ml}$,
für ssDNA: $40 \mu\text{g/x ml}$,
für RNA: $35 \mu\text{g/x ml}$

2.2.5 Klonierung in den pCR2.1TOPO – Vektor der Fa. Invitrogen

Der pCR2.1 – TOPO - Vektor wurde für die direkte Insertion der cDNA des hantaviralen S-Segmentes von Puumala und Dobrava nach RT und Amplifikation mit der PCR gewählt. Nach Ligation wurde der rekombinante Vektor in TOP10 kompetente Zellen transformiert. Dieser Zwischenklonierungsschritt sollte die Charakterisierung der amplifizierten DNA durch Sequenzierung erlauben, bevor in den bakteriellen Expressionsvektor kloniert wurde.

2.2.6 Klenow Enzym

Die E.coli DNA-Polymerase I als ein Enzym der Replikation und der Reparatur kann durch Spaltung in zwei Fragmente zerlegt werden. Das daraus resultierende größere Fragment hat eine 5'- 3' Polymeraseaktivität und wurde als Klenow Enzym für folgende Aufgaben eingesetzt. Hatte ein Restriktionsenzym nach DNA-Verdau ein Ende mit 5' - Überhang hinterlassen, dann wurde mit Klenow – Enzym das 3'- Ende mit zugesetzten dNTB's und im Puffer enthaltenden Magnesium als Koenzym zu einem dem 5'- Überhang komplementären DNA Strang aufgefüllt, so dass ein stumpfes Ende resultierte.

Ansatz für $30 \mu\text{l}$: $19 \mu\text{l}$ DNA

$0.5 \mu\text{l}$ 2mM dNTB

$1.5 \mu\text{l}$ Klenow Polymerase

$3 \mu\text{l}$ Puffer

$6 \mu\text{l}$ H_2O

37°C, 10 min

70°C, 10 min

2.2.7 T4-DNA-Polymerase

T4 bezeichnet einen Bakteriophagen von E. coli. Die daraus isolierte T4-DNA-Polymerase wurde verwendet, um 5'-Überhänge von Doppelstrang-DNA komplementär aufzufüllen bzw. um mit einer 3'-5'- Exonukleaseaktivität 3'-Überhänge von DNA abzdauen. Dadurch konnten durch Restriktionsenzyme entstandene DNA-Überhänge geglättet und für folgende Klonierungen kompatibel gemacht werden.

Ansatz für 30µl: 19µl µDNA

2µl 2mM dNTBs

2µl T4-DNA-Polymerase

3µl Puffer

4µl H₂O

11°C, 20 min

70°C, 20 min

2.2.8 Dephosphorilierung von 5' - Enden mit dem Enzym CIAP

Um ein DNA Fragment in einen linearisierten Vektor zu integrieren braucht die T4-Ligase als ausführendes Enzym der Ligationsreaktion ein freies 5'- Phosphatende.

Um zu verhindern, dass der linearisierte Vektor mit seinem eigenen freien 5'- Phosphat-Rest und einer eigenen freien 3'- OH-Gruppe eine Phosphodiesterbindung ausbildet und rezirkularisiert, wurde das 5'- Phosphat-Ende des Vektors mit der CIAP (calf intestinal alkaline phosphatase, MBI) abgespalten.

Ansatz: 25µl Vektor

5µl 10 × Reaktionspuffer

2µl CIAP

add H₂O auf 50µl

2 h, 37°C

2.2.9 Ethanol - Präzipitation

DNA wurde mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten, die ein jeweiliges Spaltungsoptimum in verschiedenen Puffern aufwiesen. Nach erfolgter erster Spaltung mußte der Spaltungsansatz deshalb vom Salz des vorangegangenen Puffers befreit werden. So konnte der folgende zweite Verdau mit einem Restriktionsenzym im dafür geeigneten Puffersystem stattfinden. Die Entfernung von Pufferresten wurde durch die Ethanol-Fällung erreicht.

Ansatz: 1/10 Vol NaAc, pH 5.2, 3M

200-300 % Vol EtOH 100%

15 min bei 14000 rpm

Pelletaufnahme in 500µl EtOH, 70%

10 min bei 14000 rpm

Pellet für 10 min bei 37°C trocknen

Pelletaufnahme in H₂O

2.2.10 Phenol / Chloroform Extraktion

Um DNA nach erfolgtem Restriktionsenzymverdau von Verunreinigungen mit Proteinen zu befreien und die Enzyme der vorausgegangenen Spaltungen zu inaktivieren, wurde die Phenol/ Chloroform Extraktion durchgeführt. Auf eine wässrige DNA Lösung wurde dazu das gleiche Volumen ROTI-Phenol-Chloroform-Lösung gegeben, durchmischt, 30 Sekunden bei 14000rpm zentrifugiert, und die wässrige obere Phase vorsichtig abgenommen. Das Procedere wurde dann noch einmal wiederholt.

2.2.11 Ligation von DNA Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase wird als Produkt des T4-Bakteriophagen aus E.coli isoliert.

Das Enzym katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einem 5'-Phosphat und einer freien 3'-OH-Gruppe eines Nukleinsäuremoleküls in einer ATP-abhängigen Reaktion. Ein DNA Fragment wurde in einen dephosphorilierten linearisierten Vektor integriert, indem zwischen dem 5'-Phosphat und dem 3'-OH-

Ende des Vektors bzw. des Inserts eine Phosphodiesterbindung ausgebildet wurde. Die Verknüpfung wurde durch die T4- Ligase katalysiert.

Ansatz: 100ng Vektor DNA

6 – 10 facher Überschuß an Insert-DNA

2µl Ligase Puffer

1µl T4-DNA-Ligase

add H₂O to 20µl

Die Ligation fand im Wasserbad bei 14°C über Nacht statt.

2.2.12 Herstellung kompetenter Bakterien

Unter Kompetenz von Bakterien versteht man die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellwand (Murein) und der Zellmembran für Fremd-DNA. Dies wird erreicht durch die Aufnahme der Zellen in Ca₂Cl₂, einem wesentlichen Bestandteil der Puffer TJB1 und TJB2. Die Zusammensetzung der benötigten Puffer TJB1 und TJB2 sind im Materialteil beschrieben. Man begann am Vorabend mit dem Ansetzen einer 5ml - Übernachtskultur. Daraus wurde am nächsten Morgen 1ml entnommen und damit 100ml LB-Medium angeimpft. Das Medium wurde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis dessen Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 595nm, 0.2 bis 0.3 betrug. Dann wurden die Bakterien für 5 Minuten auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C für 10 Minuten bei 2500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 40ml TJB1 Puffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 4°C und 3500 rpm zentrifugiert. Dann erfolgte die Resuspension des Pellets in 4ml TJB2 Puffer, anschließend wurde die Lösung für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Dem Eis wurde 100% EtOH zugegeben, um eine Schockgefrierung der hergestellten Bakterienlösung zu erreichen. Es folgte die Aliquotierung der nun kompetenten Zellen in 1.5ml Eppendorfröhrchen á 200µl und anschließende Lagerung bei -80°C.

Die kompetenten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Reinheit und ihrer Funktion getestet. Dazu transformierte man 0, 10 und 100ng eines Plasmides (pRSET) in die hergestellten Bakterien und beurteilte die Kompetenz der Bakterien anhand des quantitativen Wachstums auf den LB/Ampicillin - Platten.

2.2.13 Transformation in kompetente Zellen

Der Zustand der Kompetenz von Bakterien war Voraussetzung für die Transformation. Transformation bedeutet das Einbringen von fremder DNA in ein Bakterium (Sambrook et al., 1989). Für die Transformation wurden die bei -80°C gelagerten Kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und 10 bis $20\mu\text{l}$ eines Ligationsansatz bzw. 100ng DNA vorsichtig in $100\mu\text{l}$ kompetente Zellen gemischt. Der Ansatz verblieb 30 Minuten auf Eis. Die Aufnahme der DNA in das Bakterium wurde durch Hitzeschock induziert. Dafür wurde die Suspension für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert, danach für 2 Minuten auf Eis gekühlt. $250\mu\text{l}$ eines vorgewärmten SOC – Medium wurden hinzupipettiert und der Ansatz für 1 Stunde bei 200rpm und 37°C auf dem Bakterienschüttler gemischt. Danach erfolgte das fraktionierte Ausstreichen des Transformationsansatzes von $50\mu\text{l}$ und $250\mu\text{l}$ auf vorgewärmte LB-Platten mit Ampicillin. Die Platten wurden für 8 bis 12 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien standen jetzt für präparative und analytische Zwecke zur Verfügung.

2.2.14 Minipräparation

Die Minipräparation wurde zur Isolierung von Plasmid – DNA aus einer E.coli Bakterienkultur angewendet. Das Prinzip der Alkalischen Lyse stellt dabei die Grundlage der Minipräparation dar (Birnboim und Doly, 1979): Zellen wurden aufgeschlossen, chromosomale DNA, Proteine und Zelltrümmer anschließend durch den Zusatz des Detergents SDS präzipitiert. Durch Zentrifugation konnte denaturiertes Zellmaterial im Sediment vom Plasmid im Überstand abgetrennt werden.

2.2.14.1 TENS-Methode

Am Vorabend setzte man eine Übernachtskultur von 2ml an. Dafür gab man entweder einige μl einer Bakteriensuspension oder eine steril gepickte Kolonie von einer LB-Agarplatte mit Ampicillin in 2ml LB-Lösung, die ebenfalls Ampicillin enthielt. Die Lösung wurde bei 37°C auf dem Bakterienschüttler über Nacht inkubiert. Ein Sediment

wurde abzentrifugiert, etwa 50-100µl des Überstandes nach Abschütten belassen und auf dem Vortexer wieder miteinander homogenisiert. Durch Zugabe von 300µl TENS wurde die alkalische Lyse der Bakterien induziert: die Zellmembran wurde zerstört und Protein, chromosomale DNA und Plasmid freigesetzt. Durch Zugabe von 150µl 3M Natrium Acetat Lösung mit einem pH von 5.2 präzipitierten Zelltrümmer, linearisierte Doppelstrang – DNA und Proteine. Die zirkularisierte Plasmid-DNA blieb in Lösung erhalten und konnte durch nachfolgende Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000rpm von den restlichen Zellbestandteilen im Überstand abgetrennt werden. Die Plasmid-DNA wurde durch Zusatz von 100% EtOH aus dem Überstand gefällt, für 5 Minuten bei 14 000rpm zentrifugiert und das resultierende Sediment mit 500µl 70 % EtOH gewaschen. Das Sediment als Plasmid enthaltendem Anteil wurde anschließend in der Speed Vac für 15 Minuten getrocknet und in 50µl H₂O oder TE aufgenommen.

2.2.14.2 Säulenmethode (Qiagen)

Mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit war es möglich, einen höheren Reinheitsgrad der Plasmid-DNA zu erreichen. Neben analytischen Zwecken wurde die Plasmid-DNA auch für präparative Arbeiten, wie Umklonierungen eingesetzt. Eine Übernachtskultur bis zu 5ml LB-Medium mit Ampicillin wurde mit steril gepickten Kolonien oder einer bereits bestehenden Bakteriensuspension versetzt und bei 37°C auf dem Bakterienschüttler inkubiert. Das abzentrifugierte Sediment wurde in 250µl P1 Puffer resuspendiert. Durch die Zugabe von 250µl P2 Puffer wurde die alkalische Lyse induziert, der Ansatz wurde für 5 Minuten gemischt. Durch das Zusetzen von 350µl N3 Puffer präzipitierten die Zelltrümmer, chromosomale DNA und die Proteine und wurden durch anschließende Zentrifugation für 10 Minuten sedimentiert. Die im Überstand enthaltende Plasmid-DNA wurde auf eine QIAprep spin Säule gegeben, die für 1 Minute zentrifugiert wurde. Die DNA war jetzt in der Säulenmatrix gebunden. Anschließend wurde die Säule mit 500µl PB Puffer und mit 750µl PE Puffer gewaschen. Dazu trug man den jeweiligen Puffer auf die Säule auf und zentrifugierte diese kurz ab. Um Pufferreste vollständig aus der Säule zu entfernen, wurde die Säule danach noch einmal für 1 Minute „leer“ zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues 1.5ml Gefäß umgesetzt und die Plasmid-DNA mit 50µl H₂O bzw. EB Puffer eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt.

2.2.15 Maxipräparation

Die Plasmid-DNA Präparation mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit ermöglichte hohe Konzentrationen und einen hohen Reinheitsgrad an Plasmid - DNA zu gewinnen.

Am Vorabend versetzte man bis zu 500ml 1×LB/ Ampicillin-Lösung mit 100µl einer Übernachtskultur aus einer Minipräparation oder aus einer frisch gepickten Kolonie. Der Ansatz wurde bei 37°C und 180rpm auf dem Bakterienschüttler über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in 500ml Zentrifugationsbechern für 15 Minuten bei 4°C und 5000rpm abzentrifugiert, in 10ml P1 Puffer/RNaseA resuspendiert und 10ml P2 Puffer zur Induktion der alkalischen Lyse zugefügt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten gemischt, dann wurde die Lysereaktion durch Zugabe von 10ml P3-Neutralisationspuffer und Kühlung des Ansatzes für 20 Minuten auf Eis gestoppt. Zelltrümmer, chromosomale Doppelstrang-DNA und Proteine wurden bei 13 000rpm, 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert sowie vom plasmidhaltigen Überstand getrennt. Dieser wurde auf QIAGEN-tip Säulen aufgetragen, welche zuvor mit 10ml QB-Puffer äquilibriert wurden. Das Plasmid wurde so an die Säulenmatrix gebunden. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades wurde die Säule in 2 Schritten mit je 30ml QC-Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Eluation mit 15ml QF-Puffer, die Eluatpräzipitation mit 10,5 ml Isopropanol und eine anschließende Zentrifugation bei 4000rpm und 4°C für 30 Minuten zur Sedimentierung der gefällten Plasmid-DNA. Das Sediment wurde mit 5ml 70% EtOH gewaschen, abzentrifugiert bei 4000rpm, 4°C für 10 Minuten und anschließend im Exiccator im Vakuum getrocknet. Abschließend wurde das Sediment in 1ml PE Puffer aufgenommen, eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt und auf eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt.

2.2.16 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Spaltung von DNA an definierten Stellen wurden Restriktionsenzyme eingesetzt. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die in der Regel pallindromische Sequenzen erkennen und diese spezifisch spalten. Die Enzyme sind bakteriellen Ursprungs. Je nachdem, wie häufig die vom Enzym erkannte Sequenz im Gesamtgenom auftrat, gab es Genomfragmente unterschiedlicher Länge. Wurden die Fragmente auf ein Agarosegel aufgetragen und in einer Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt, ergab

sich ein für dieses Genom typisches Bandenmuster. Diese sequenzabhängige Spaltung von DNA bildete die Grundlage zur Klonierung viraler Gene.

Spaltungsansatz: 10µl DNA
 2µl 10 × Reaktionspuffer
 Enzym (0.5-1µl)
 add H₂O auf 20µl

U ist dabei eine Enzymeinheit, definiert als die Menge an Enzym, die 1µg λ-DNA in 1 Stunde spaltet. Der Ansatz wurde mindestens für 2 Stunden oder auch über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.17 Sequenzierungen

Grundlage der Sequenzierung von DNA stellt die Kettenabbruchreaktion nach Sanger dar (Sanger et al., 1977). Die Methode erlaubt eine präzise Bestimmung der Basenabfolge von DNA. Die Sequenzierungen wurden mit dem Ready Reaction Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems durchgeführt. Der Kit enthält die AmpliTaq FS Polymerase. Die zu sequenzierende DNA stammte aus einer Minipräparation mit der Säulenmethode, aus einer Maxipräparation oder war ein PCR-Produkt.

1. Reaktionsansatz: 2µl Premix (Big Dye)
 200-500ng DNA
 10pmol Primer
 auf 10µl mit H₂O

2. Amplifizierung der zu sequenzierenden DNA

Cycling: 96°C für 10 Sekunden
45-60°C für 5 Sekunden (Temperatur in Abhängigkeit der Schmelztemperatur des Hybrids)
60°C für 4 Minuten
Zyklenwiederholung 25mal

3. Aufreinigung der DNA mit den Autoseq G-50 Säulen

Die Säulen wurden kurz mit dem Deckel nach unten gevortext, um die Matrix zu homogenisieren, dann für 2 Minuten bei 5000rpm zentrifugiert und die wässrige Phase entfernt. Die Säule wurde dann zweimal mit H₂O gewaschen. Die Waschschritte waren

wichtig, da die vorgequollene Säulenmatrix mit einem Kation versetzt war, welches bakteriellen Wachstum verhindern sollte. Allerdings störte diese ionische Substanz den Transfer der DNA in die Sequenzkapillare. Die Sequenzierungsproben wurden anschließend auf die schräge Matrix der vorbereiteten Säulen aufgetragen und für 2 Minuten bei 5000rpm zentrifugiert. Dann wurde die Probe für circa 1 Stunde in der Speed Vac getrocknet und pelletiert.

4. Pelletaufnahme in 15µl TSR Puffer

5. Denaturierung für 2 Minuten bei 90°C und Überführung in spezielle Sequenzierungstubes; Lagerung bei 4 °C.

2.2.18 Agarosegelelektrophorese

Mit der Agarosegelelektrophorese konnten DNA-Fragmente nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Durch das Anlegen einer Spannung wurde ein elektrisches Feld erzeugt, wodurch DNA aufgrund von Länge und Ladung unterschiedlich schnell wanderte. So war es möglich DNA für präparative Arbeiten von Nebenfragmenten zu befreien oder typische Bandenmuster zur DNA - Analyse nachzuweisen.

0.8-2.0g Agarose wurde dazu in 100ml TAE-Puffer in der Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. 3µl Ethidiumbromid (10mg/ml) wurde zugegeben und das flüssige Gel nach Abkühlen in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Das fertige Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer gesetzt. Die aufzutrennenden DNA Proben wurden mit 1×BPB Puffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Dann wurde ein Potential zwischen 60 bis 120mV gewählt und das elektrische Feld erzeugt. Die Konzentration der Agarose bestimmte den Trennbereich. Kleinere Moleküle liesen sich bei einer höheren Konzentration an Agarose besser voneinander trennen. Ethidiumbromid interkalierte in der DNA und nach Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ oder 365) konnte diese sichtbar gemacht werden Dies konnte entweder zum Bandennachweis mit einem Transilluminator oder für präparative Arbeiten mit einer UV-Handlampe geschehen.

2.2.19 Reinigung von DNA mit Nucleospin

Um DNA aufzureinigen und von Nebenbanden zu befreien wurde der NucleoSpin Extract Kit von Macherey-Nagel verwendet. Dafür wurde die jeweilige DNA durch ein Agarosegel von DNA-Fragmenten getrennt, mit der Handlampe zur Fluoreszenz angeregt, die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Auswiegen der DNA wurde pro 100mg 300µl NT1 Puffer zugegeben und bei 50 °C für 5 bis 10 Minuten gelöst. Der Ansatz wurde dann auf eine NucleoSpin Extract Säule aufgetragen und für 1 Minute bei 10 000rpm zentrifugiert. Die zu isolierende DNA wurde dadurch an die Säulenmatrix gebunden. Dann folgte das Waschen der Säule mit 500µl NT2 Puffer, mit 600µl NT3 Puffer und mit 200µl NT3 Puffer. Zwischen den Pufferauftragungen auf die Säule wurde der jeweils vorangegangene Puffer durch Zentrifugation für 1 Minute bei 14 000rpm entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 25µl Elutionspuffer aus der Säule eluiert. Die DNA war jetzt gereinigt und konnte für folgende Klonierungsarbeiten eingesetzt werden.

2.3 Expression und Aufreinigung von Protein

2.3.1 Der pRSET-Expressionsvektor

Für die Proteinexpression des N-Proteins der beiden Serotypen Puumala und Dobrava wurde der pRSETB-Vektor der Fa. Invitrogen als Expressionsvektor gewählt. Dafür wurde die cDNA des S-Segmentes der beiden Stämme Puumala und Dobrava aus dem pCR2.1TOPO-Vektor in den Expressionsvektor umkloniert. Sequenzierungsergebnisse der DNA ergaben, dass der pRSETB-Vektor gewählt werden musste, damit das klonierte Insert sich im Leseraster zum ATG als Startcodon des Vektors befand. Als Ergebnis wurden die beiden rekombinanten Plasmide pRSETBPuumalaN (pRSETBPuuN) und pRSETBDobravaN (pRSETBDobN) erhalten, die den Ausgangspunkt der bakteriellen Expression der hantaviralen N-Proteine darstellten.

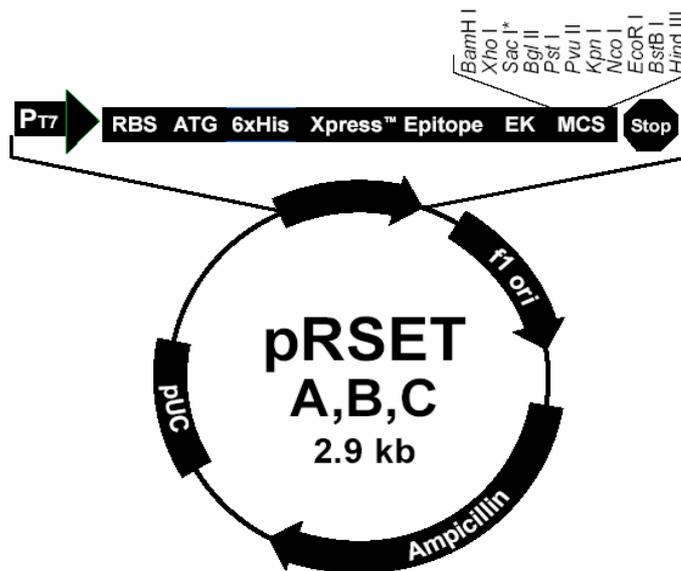


Abb. 3: pRSETB-Vektor der Fa. Invitrogen

Das Fusionspeptid besteht von N- nach C-terminal aus dem T7-Promotor (PT7), der Ribosomen Binding Site (RBS), dem ATG Startcodon, 6 aufeinanderfolgenden Histidinen, der Enterokinasespaltstelle (EK), der Multi Cloning Site (MCS) und dem Stopcodon. Die 6 Histidine haben die Funktion einer Metallbindenden Domäne im translatierten N-terminal His-getaggten Protein und ermöglichen dadurch die Aufreinigung durch Proteinimmobilisierung mit der Metallaffinitätschromatographie. Die Enterokinase kann zur Spaltung und damit zur Trennung von Protein und Fusionspeptid verwendet werden. Die MCS ermöglicht die in-frame-Klonierung des Inserts mit dem ATG des Fusionspeptides. Die Vektoren pRSETA,B und C weisen eine Leserasterverschiebung der MCS relativ zum ATG auf. Der Vektor trägt weiter ein Ampicillin-Resistenz-Gen und einen bakteriellen Replikationsursprung.

2.3.2 Proteinexpression und die immobilisierende Metallaffinitätschromatographie

Als kompetente Zellen für die bakterielle Proteinexpression wurden die One Shot BL21Star (DE3) Zellen der Fa. Invitrogen verwendet. Es handelt sich dabei um ein Expressionsystem, welches vom T7 – Phagen - Promotor kontrolliert wird. Die Funktion des T7-Promotors ist allerdings nur gegeben, wenn die T7-RNA-Polymerase anwesend ist. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase wird nur dann transkribiert, wenn der Promoter durch Lactose oder ein Lactose – Derivat induziert wird. Deshalb wurde IPTG (Isopropyl-1-thio-beta-D-Galactosid) als Laktoseanalogon zur Bakterienkultur zugegeben, was die Bakterienzelle zur Produktion der T7-RNA-Polymerase anregte. Die nun synthetisierte T7-RNA-Polymerase bindet an den T7-Promotor und induziert

dadurch die Transkription des nachfolgenden Abschnittes, im vorliegenden Fall des Gens, das für das hantavirale N-Protein codiert.

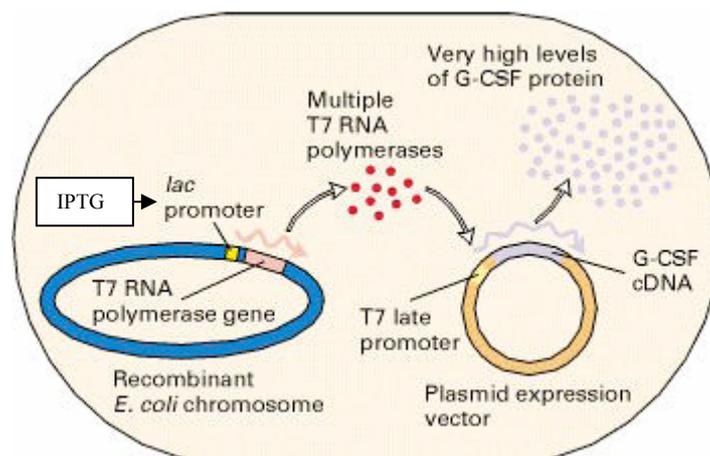


Abb. 4: Darstellung der Induktion der Proteinexpression durch IPTG

One Shot BL21 Star (DE3) Kompetente Zellen, Fa. Invitrogen

(aus Biochemistry 660, September 04/2003)

Die rekombinanten Expressionplasmide pRSETBPuuN und pRSETBDobN wurden in kompetente BL21DE3 Zellen transformiert und frisch gepickte Kolonien in 100ml LB/Ampicillin - Nährmedium gebracht. Die Bakterien wurden bei 37°C auf dem Bakterienrüttler zum Wachstum angeregt und bei einer Optischen Dichte von 0.6 mit IPTG (10µg/ml) als Induktor der Proteinexpression versetzt. Die Lösung wurde dann für 12 bis 16 Stunden bei 35°C auf dem Schüttler zur Proteinexpression angeregt. Die Bakterienlösung wurde durch Zentrifugation pelletiert und das enthaltene Protein in einer Lösung aus 2ml PBS/ 1% Triton X-100 resuspendiert. Um das bakteriell Murein zu zerstören, wurde Lysozym zugegeben (Endkonzentration 100µg/ ml, 15 Minuten bei 37°C). Die störende bakterielle DNA wurde mit 10µl DNase (10 Units/ml) für 15 Minuten bei RT abgedaut. Um einen vollständigen Abbau zu gewährleisten, wurde anschließend noch eine Ultraschallbehandlung der Fraktion durchgeführt. Das Bakterienlysat wurde nun für mindestens 1 Stunde bei 4400rpm zentrifugiert und dadurch in eine lösliche (Überstand) und eine unlösliche Fraktion (Pellet) getrennt. Rekombinante Proteine, die in *E.coli* Bakterienzellen exprimiert werden, kommen sowohl in löslicher Form als auch häufiger in unlöslicher Form als sogenannte Einschlusskörperchen vor. Die lösliche Proteinform ist aber Voraussetzung für die Proteinaufreinigung mit der Metallaffinitätschromatographie, weshalb das exprimierte

Protein durch Zugabe von 6M Urea in einen denaturierten löslichen Zustand überführt worden ist. Um festzustellen, in welcher Fraktion das gesuchte Protein enthalten war, wurden beide auf ein SDS-PAGE aufgetragen, mit Coomassie-blau gefärbt und beurteilt. Das Protein befand sich immer in der unlöslichen Fraktion. Das Pellet wurde in 1 × Binde-Puffer/ 6M Urea resuspendiert und dadurch in eine lösliche Form überführt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 4400rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand stellte den proteinenthaltenden Anteil dar und wurde durch die folgende immobilisierende Metallaffinitätschromatographie von unspezifischen Protein und Verunreinigungen befreit.

Das Prinzip der Proteinaufreinigung mit der immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie beruht auf der Bindung des N-terminalen 6fach His-getaggten rekombinanten hantaviralen N-Proteins an ein Nickel-Ion und dessen Immobilisierung durch die NTA-Gruppen der Metallkomplexharzmatrix. Dabei bindet der Imidazol-Ring als struktureller Bestandteil von Histidin an das Nickel. Zwar binden auch unspezifische endogene bakterielle Proteine, die Histidin-Reste enthalten, die Interaktion ist aber sehr viel schwächer und kann durch Imidazol in niedrigen Konzentrationen durch kompetitive Verdrängung unterbrochen werden.



Abb.5: Funktionsprinzip der Proteinreinigung mit der immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie

Das 6fach His-getaggte hantavirale N-Protein wird durch den Imidazol-Ring im Histidin an das Nickel-Ion gebunden, welches an NTA-Gruppen des Metallkomplexharzes bindet.

Im ersten Schritt wurden 2ml His Bind Resin in eine Säule gefüllt. Das Resin formte sich unter Wasserentzug zu einer Matrix. Dieses Austauscherharz wurde mehrfach mit Wasser gewaschen und anschließend mit 4ml einer 0.1M NiSO₄-Lösung beladen. Überschüssiges, nicht an der Matrix gebundenes Nickel wurde durch mehrfaches Waschen der Säule mit Bindepuffer/ 6M Urea entfernt, dann wurde die vorbereitete Proteinfraction aufgetragen. Mit mehreren ml Waschpuffer/ 6M Urea (Waschpuffer

enthält Imidazol) wurden endogene unspezifische Histidin-Reste enthaltende Proteine aus der Säule gewaschen. Mit 5ml Eluierungspuffer (enthält Imidazol in einer Konzentration zwischen 100 und 250mM) wurde durch einen kompetitiven Verdrängungseffekt das spezifische His-getaggt Protein aus der Matrix eluiert.

2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur quantitativen Bestimmung des Proteins wurde der kommerzielle BCA Protein Assay Reagent Kit der Fa. PIERCE verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Methode von Pierce beruht auf der Reduktion eines zweiwertigen Kupferions zu einem einwertigen durch Protein in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion). Ein einwertiges Kupferion geht mit 2 BCA-Molekülen (bicinchoninic acid) einen Chelatkomplex ein, der kolorimetrisch durch Spektrophotometrie detektiert werden kann. Die Absorption erfolgt bei einer Wellenlänge von 562nm und ist linear zu Proteinkonzentration im Bereich von 2.0 bis 20µg/ml. Um eine Kalibrierungskurve zu erhalten wurden BSA Standards in verschiedenen Konzentrationen (H₂O als Nullwert bis zu 2.0µg BSA/ml) angesetzt. Die erhaltenen Absorptionswerte konnten dann mit den bekannten Konzentrationen in einem Diagramm zueinander in Verhältnis gesetzt werden.

Das Working Reagenz (WR) wurde aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50 : 1 angesetzt und je 0.1ml der BSA Verdünnungen sowie der zu messenden Proteinproben mit 2ml der WR versetzt, 30 Minuten bei 37°C inkubiert, danach bis zur Messung auf Eis gekühlt. Dann wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 562nm spektrophotometrisch bestimmt. Aus der Kalibrierungskurve konnte dann die Konzentration der Proteinprobe abgelesen werden.

2.3.4 Proteindialyse

Die aufgereinigten hantaviralen N-Proteine der beiden Serotypen Puumala und Dobrava sollten der Antikörperproduktion im Kaninchen zugeführt werden. Dazu war es nötig, das in der Proteinlösung noch enthaltende Urea, das Bestandteil der verschiedenen Puffer der immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie war, durch eine Dialyse

zu entfernen. Damit war die Voraussetzung für physiologische osmotische Bedingungen als Vorbereitung der Injektion von Virusprotein in das Kaninchen gegeben. Für die Dialyse wurden ca. 10cm eines Dialyseschlauches für 30 Minuten bei 70 bis 80°C in 500ml Dialysepuffer erwärmt. Die Enden des Schlauches wurden nach Einfüllen der Proteinfraction mit Plastikclips verschlossen und für 24 Stunden bei 4°C in einem 100fachen Volumen an Dialysepuffer belassen.

2.4 Nachweis von Protein

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-PAGE kann die Größe eines Proteins oder dessen Zusammensetzung aus möglichen Untereinheiten ermittelt werden. Grundlage der Methode ist die negative Ladung, die das Protein aufgrund des Zusatzes des stark negativen Detergents SDS trägt. So kann durch Anlegen eines elektrischen Feldes eine homogene Wanderung der Proteine zur positiven Elektrode erreicht werden (Schägger und von Jagow, 1987). Es wurde zuerst eine stark vernetzte Matrix aus Polyacrylamid hergestellt, die Maschengröße des Gitters konnte variabel, je nach Größe des Proteins, mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen eingestellt werden. Nach Anlegen einer konstanten Spannung, blieben Proteine mit hohem Molekulargewicht weiter oben in der Matrix hängen als Proteine, die eine geringere Größe aufwiesen.

Zusammensetzung des verwendeten 10 % Trenngels, 10ml:

4.8ml H₂O

2.5ml Acrylamid (38%Acrylamid, 2% Bisacryl))

2.5ml Trenngel-Puffer (1.5M Tris-HCl, pH 8.8)

0.1ml SDS (10%)

0.1ml APS (Ammoniumperoxodisulfat, 10%)

4µl TEMED

Der Ansatz wurde gemischt und in die vorbereiteten Elektrophoresekammern Mighty small der Fa. Hoefer pipettiert. Das Trenngel wurde mit Wasser überschichtet, um eine blasenfreie Polymerisation des Gels zu erreichen. Nach Aushärtung der Matrix wurde das Wasser entfernt und das Kamm- oder Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel aufgetragen.

Zusammensetzung des Sammelgels, 5%, 5ml:

3.4ml H₂O

0.83ml Acrylamid/ Bisacrylamid

0.63ml Trenngelpuffer

0.05ml SDS

0.05ml APS

5µl TEMED

In das aufgetragene Sammelgel wurde luftblasenfrei der gewählte Probenkamm gesetzt. Nach Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Apparatur in die Gelelektrophoresevorrichtung der Fa. Hoefer umgesetzt, mit Probenpuffer aufgefüllt und die Probenaschen damit gespült. Zur Probenvorbereitung wurde 10µl einer Proteinlösung mit 5µl Probenpuffer (beta-Mercaptoethanol, Bromphenolblau, SDS) gemischt, für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend bis zur Verwendung auf Eis gekühlt. Das SDS lagerte sich als stark negatives Detergents an hydrophobe Bereiche der Proteine an und überdeckte deren Eigenladung. Durch zusätzliche Zugabe von Mercaptoethanol wurden alle S-S-Bindungen der Proteine gelöst und damit die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgehoben. Die Proteine lagen in entfalteter Primärstruktur vor, Unterschiede im Wanderverhalten in der Elektrophorese, abhängig von der jeweiligen Tertiärstruktur, waren damit beseitigt. Die vorbereiteten Proteinproben wurden in die Kammgeltaschen pipettiert, und die Vorrichtung an ein Netzgerät angeschlossen. Die Wanderung der Proben im Kammgel erfolgte bei 70V, die im Trenngel bei 100V für etwa 1 Stunde. Das erzeugte elektrische Feld verursachte die Wanderung der Proteine zum Pluspol, je nach Molekulargewicht der Proteine blieben sie in den Maschen des Polyacrylamidnetze hängen und konnten so räumlich versetzt getrennt werden. Zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen wurde nach Abschluß der Gelelektrophorese der Proteinfarbstoff Coomassie Brilliant Blue verwendet. Das Acrylamidgel wurde für 30 Minuten in diesem Farbstoff gefärbt, danach überschüssiger Farbstoff mit 10% Essigsäure entfernt.

2.4.2 Western Blot

Nach Beenden des SDS-PAGE konnten die im Gel vorhandenen aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden. Durch das stark negativ geladene

Detergents SDS konnte das Funktionsprinzip der Gelelektrophorese angewendet werden: das Anlegen eines elektrischen Feldes und die dadurch erzeugte Proteinwanderung zur Anode. Die Proteine wanderten nun vom Gel zur Nitrocellulose, an der sie anhafteten (Towbin et al., 1979).

Aufbau der Apparatur von unten nach oben:

- Graphitplatte (Anode)
- Filterpapier, 3 Lagen
- Membran
- SDS-Gel
- Filterpapier, 2 Lagen
- Graphitplatte (Kathode)

Die Filterpapiere und die Nitrocellulose wurden vor Gebrauch für 10 Minuten in Blotpuffer inkubiert. Die gewählte Stromstärke ergab sich aus der Größe des Gels. Es wurden 1.0mA pro cm^2 eingestellt. Der Lauf dauerte zwischen 90 und 120 Minuten, danach hafteten die Proteine der Membran an. Auf den Western Blot folgte zur spezifischen Proteinanalyse die Immunreaktion. Die an der Nitrocellulosemembran haftenden Proteine stellten sich dabei als Antigene dar, die mit einem spezifischen 1. Antikörper und einem zweiten Enzym-gebundenen Sekundärantikörper im Sinne einer Immunreaktion markiert werden konnten. Zur Absättigung unspezifischer Bindungstellen wurde die Membran vor der Immunreaktion für 1 Stunde in einer Blockierungslösung aus PBS/4% Milchpulver gegeben. Danach wurde sie 3 mal kurz mit PBS/Tween-20 (0.5%) gespült, die 1. AK- Verdünnung in der Blockierungslösung eingestellt und über Nacht bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ auf dem Kipper inkubiert. Die Membran wurde zweimal für 10 Minuten mit PBS/Tween-20 gewaschen bevor der 2. AK in die Blocklösung gegeben wurde. Die Inkubation betrug diesmal 1 Stunde. Danach wurde wiederholt für insgesamt 30 Minuten mit PBS/Tween-20 gewaschen. Die Markierung der Proteine durch die Immunreaktion konnte prinzipiell in 2 verschiedenen Reaktionen sichtbar gemacht werden. War der 2. AK mit dem Enzym Peroxidase (POD) gekoppelt, wurde die ECL-Reaktion oder die DAB-Färbung (Diaminobenzidin) gewählt, lag ein Alkalischer-Phosphatase-gekoppelter 2. AK vor, wurde die Alkalische Phosphatase-Reaktion durchgeführt.

Die ECL-Reaktion beruht auf einer chemischen Reaktion, bei der Licht erzeugt wird.

Verwendet wurde das Reagenz der Fa. Amersham, dem sogenannten ECL – Reagenz. Es besteht aus zwei verschiedenen Lösungen, die erst in einem bestimmten Verhältnis

gemischt die Reaktion auslöst. Voraussetzung der Reaktion ist der Peroxidase gekoppelte 2. Antikörper, denn das ECL – Reagenz wird durch das Enzym stofflich umgesetzt. Dabei findet Lichtemission statt, die mit Hilfe von Röntgenfilmen festgehalten wird. Die Schwärzung des Filmes entspricht der Proteinbande. Die Spezifität ist durch die gewählten Antikörper in der vorangegangenen Immunreaktion gegeben. Der Kit der Fa. Amersham besteht aus Lösung A und Lösung B, die in einem Verhältnis 1:40 gemischt und auf die Membran aufgetragen worden sind. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden in der Dunkelkammer Röntgenfilme für verschiedene Zeiten aufgelegt und entwickelt.

Für die DAB-Färbung musste eine DAB-Färbelösung hergestellt werden. Diese enthielt 30µl einer 3% NiSO₄-Lösung, 4.3µl H₂O₂, 35% und 0.03g Diaminobenzidin. Mit 50mM Tris Puffer pH7.5 wurde die Lösung auf 5ml eingestellt. Die Alkalische Phosphatase -Reaktion setzt einen Alkalischen Phosphatase - gekoppelten 2. Antikörper voraus, und führt in der Reaktion zur Umsetzung einer Farbe. So lassen sich auf der Nitrocellulosemembran farbige Proteinbanden darstellen. In 5ml Phosphatase-Puffer wurde 33µl der Lösung N und 16.5µl der Lösung BCIP gemischt. Die Membran muß für die Inkubation abgedeckt werden, da die Reaktion lichtempfindlich ist.

2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Indirekte Immunfluoreszenz wurde angewendet, um Proteine in fixierten Zellen optisch darzustellen. Das Protein als Antigen wurde dazu mit einem 1. Antikörper markiert. Ein Fluoreszenz - markierter 2. Antikörper band spezifisch an den primären Antikörper. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde der Farbstoff zur Emission einer Fluoreszenz angeregt. Puumalavirus- und Dobravavirus-infizierte Vero-E6-Zellen und nicht infizierte Vero-E6-Zellen als Negativkontrolle wurden auf einem Objektträger mit Zellkulturaufsatz (Chamberslides) für 3 Tage im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit gekühltem Methanol bei -20°C für 30 Minuten fixiert. Die Objektträger wurden mit PBS gespült und die Probe zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 0.1%BSA/PBS für 1 Stunde bei 37°C geblockt. Als erster Antikörper wurde Serum von Patienten nach Hantavirusinfektion des Stammes Puumala 1:500 in 0.1%BSA/ PBS verdünnt und für 1 Stunde aufgetragen.

Der Objektträger wurde danach kurz gespült und für 3 mal 10 Minuten in einer Hellendahl-Küvette mit einem Rührfisch mit 0.1%BSA/ PBS gewaschen. Der FITC markierte 2. Anti-human-Antikörper wurde 1:500 in 0.1%BSA/ PBS verdünnt und die Objektträger damit für 1 Stunde inkubiert. Der Waschschrift wurde dann wiederholt, die Objektträger getrocknet und nach Auftragen des Eindeckelmediums das Deckglas luftblasenfrei aufgebracht. Durch UV-Licht wurde FITC zur Emission einer grünen Fluoreszenz angeregt.

2.5 Antikörpertestung: RecomLine Bunyavirus – Test (Fa. MIKROGEN)

Der recomLine Bunyavirus IgG/ IgM ist ein qualitativer in-vitro-Test zum Nachweis und zur Identifizierung von IgG- bzw. IgM-Antikörpern gegen Hantaviren mit den Serotypen Puumala, Hantaan, Dobrava, Seoul und das Sandfliegenfieber Virus Serotyp Toskana in humanen Serum oder Plasma. Der Test verwendet als Antigene die fünf rekombinant produzierten Nukleokapsidproteine (N-Protein) der Viren. Diese sind auf Nitrocellulose-Membran-Teststreifen aufgetragen. Zum Nachweis der hantaviralen Antikörper der beiden Stämme wurden die Teststreifen mit einer 1:10, 1:100 und einer 1:1000 in Waschpuffer verdünnten Kaninchenserumprobe für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörper lagerten sich den Antigenen an. Durch die verschiedenen Verdünnungen wurde die Sensitivität und Grenze der Nachweismöglichkeit der Antikörper getestet. Nicht-gebundene Antikörper wurden anschließend mit Waschpuffer abgespült. Als zweiter Antikörper wurde ein Peroxidase – gekoppelter anti – rabbit – IgG - Antikörper in einer Verdünnung 1:1000 in Waschpuffer für 45 Minuten auf die Teststreifen gegeben. Nach der Inkubation wurde der Waschschrift wiederholt und pro Teststreifen 1.5 ml einer Substratlösung zugegeben. Das Enzym Peroxidase setzte die Substratlösung stofflich in eine Farbreaktion um und wies so die spezifisch gebundene Antikörper nach: war eine Reaktivität gegen eines der Proteine vorhanden, so erschien diese als dunkle Bande auf dem Teststreifen. Der Färbeprozess war beendet, sobald die Cut off Bande zu sehen war. Die Intensität der Cut off Bande wurde zur Beurteilung der Reaktivität der hantaviralen Antikörper herangezogen. So mußte die Färbung der nachzuweisenden AK stärker als die der Cut off Bande sein, oder bei gleicher Intensität mindestens eine weitere Bande

der verschiedenen bunyaviralen Serotypen farblich reagieren, um als positiv gewertet zu werden.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung und Klonierung von Virus - RNA

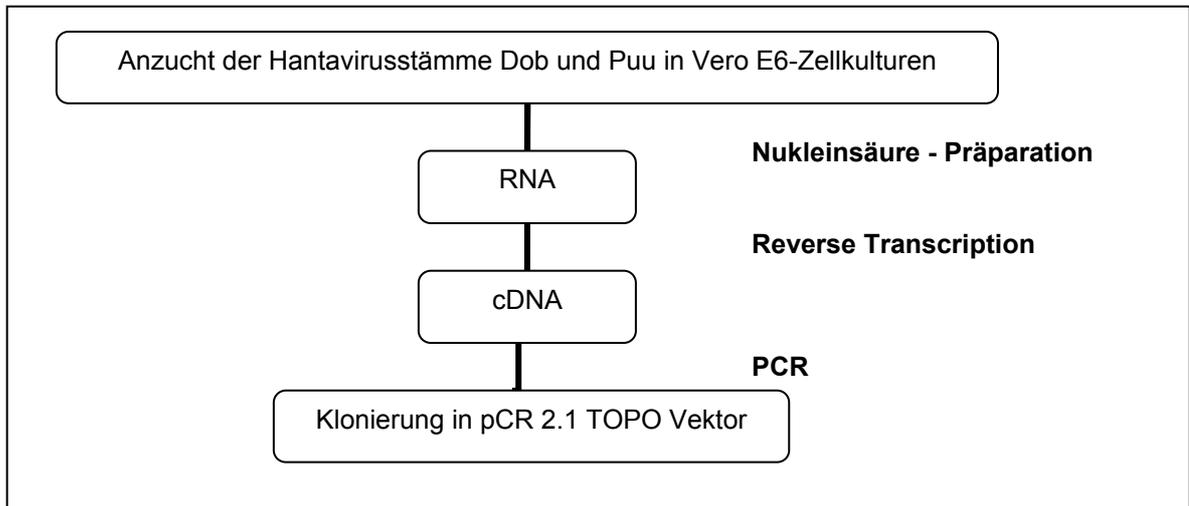


Abb. 6: Klonierung des hantaviralen S-Segmentes in den pCR 2.1 TOPO Vektor

Die Virusanzucht der hantaviralen Stämme Puumala (Sotkamo) und Dobrava (Saarema) fand wie im Methodenteil beschrieben im S3- Labor statt. Das Hantavirus besitzt ein dreifach-segmentiertes Negativ-Strang - RNA Genom, bestehend aus S-Segment, M-Segment und L-Segment. Ein wichtiges Teilziel war es, bakterielle Expressionsvektoren für die Nukleokapsidstruktur, die vom S – Segment codiert wird, von Puumala und Dobrava zu etablieren. Dazu wurden Vero E6 Zellen in Kultur genommen und mit virushaltigem Zellkulturüberstand infiziert. Mit der Indirekten Immunfluoreszenz konnte der Infektionsstatus der Zellen beurteilt werden und Kulturen mit stark positivem Signal als Ausdruck der Viruslast der Vero E6 Zellen der viralen RNA Präparation zugeführt werden. Die ausgewählte virushaltige Zellkultur wurde mit GITC versetzt und nach dadurch erreichter Zellyse in nicht infektiöser Form in das S2 Labor gebracht. Im S2/L2-Labor wurde die virale RNA mit dem QIAGEN RNeasy Mini Kit aufgereinigt und isoliert und anschließend deren Konzentration photometrisch bei einer OD von 260 bestimmt. Dem Schutz der Virus-RNA vor Abbau durch RNAsen als stabile überall vorkommenden Enzymen, galt in dieser Phase höchste Priorität. Die RNA wurde deshalb zügig weiterverarbeitet. Mit der SUPERSRIPT II als Reverse Transcriptase wurde die RNA des S-Segmentes in die wesentlich stabilere cDNA

umgeschrieben und mit der Hilfe der PCR amplifiziert. Verwendete Primer für die durchgeführte RT – PCR der Nukleokapsidsequenz waren PUU1 (1098) und PUU2 (1099) für den Stamm Puumala, sowie die Primer mit der Bezeichnung DOB1 (1104) und DOB2 (1105) für den Stamm Dobrava.

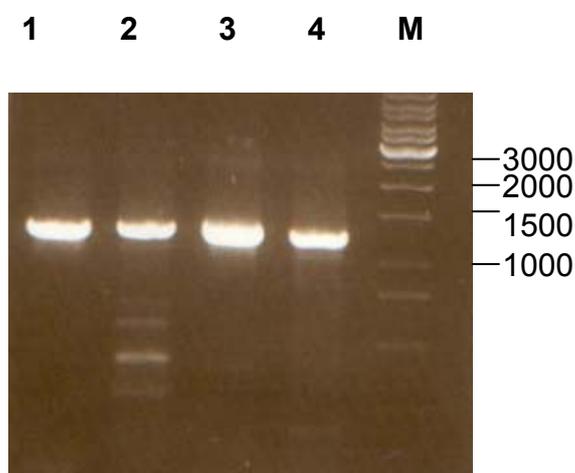


Abb. 7: PCR – Kontrolle: cDNA der hantaviralen S – Segmente von Puumala und Dobrava

Spur 1 und 2: PuumalaN (1305 bp)

Spur 3 und 4: DobravaN (1299 bp)

M: Marker

Die PCR-Produkte der beiden hantaviralen Stämme wurden auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1.5ml Tube verbracht. Die cDNA wurde so von unspezifischen Nebenbanden der PCR befreit und konnte anschließend mit der Nucleospin Methode aus dem Gel eluiert und isoliert werden. Die cDNA wurde bei -80°C gelagert. Um die cDNA zu sichern und unbegrenzt verwenden zu können, wurde diese in den pCR2.1TOPO Vektor von Invitrogen kloniert. Die Klonierung fand als Übernachtreaktion statt, der Ansatz wurde in TOP10 kompetente Zellen transformiert und auf LB/Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen. Die gewachsenen Kolonien wurden gepickt, in LB/Ampicillin-Lösung zum Wachstum angeregt und durch Minipräparation zur Plasmidaufreinigung nach der TENS-Methode verarbeitet. Das dadurch isolierte Plasmid pCR2.1TOPOPuumalaN bzw. pCR2.1TOPODobravaN konnte dann durch Restriktionsenzymverdau mit charakteristischem Bandenmuster nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8).

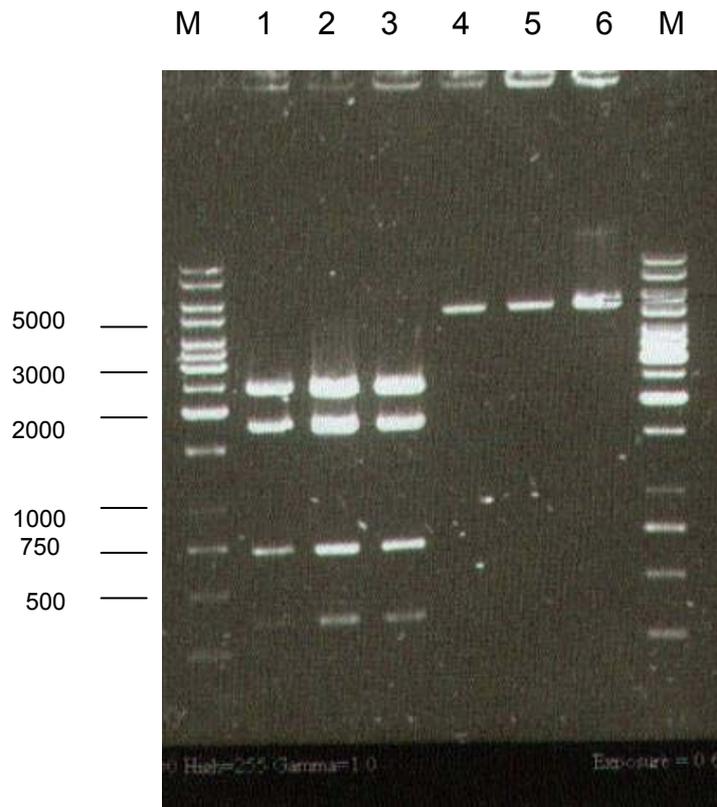


Abb. 8: pCR2.1TOPOPuumalaN und pCR2.1TOPODobravaN nach Restriktionsenzymverdau

M: Marker, Angabe in Basenpaaren (bp)

Spur 1-3: pCR2.1TOPOPuumalaN nach PvuII – Restriktionsenzymverdau

Spaltung ergibt folgende Bandenhöhen: 2.43, 1.77, 0.69, 0.34kb

Spur 4-6: pCR2.1TOPODobravaN nach NcoI – Restriktionsenzymverdau

Spaltung ergibt folgende Bandenhöhe: 5.24kb (linearisierte Form)

Um eine höhere Reinheit an Plasmid zu erreichen, wurde nochmals eine Minipräparation mit der Säulenmethode von Qiagen durchgeführt. Die Plasmidkonzentration wurde photometrisch bestimmt und nachfolgend für Sequenzierungsreaktionen eingesetzt. Für die Sequenzierung des S-Segmentes von Puumala wurden folgende Primer verwendet: 741 (bindet auf dem TOPO Vektor in sense Richtung) und 742 (bindet auf dem TOPO-Vektor in antisenes Richtung), sowie die Primer Mel 1-4. Für die analoge Sequenzierung des Stammes Dobrava wurden ebenfalls die Primer 741 und 742, sowie die Primer Mel 5-8 verwendet.

3.2 Herstellung bakterieller Expressionsvektoren für das hantavirale S - Segment

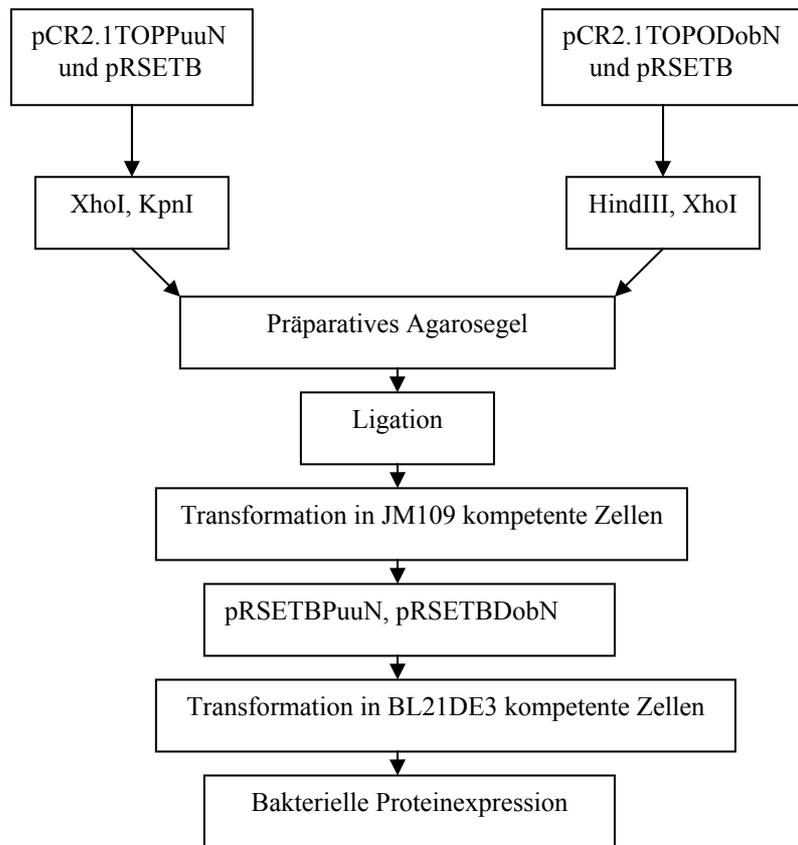


Abb. 9: Übersicht über die Herstellung der bakteriellen Expressionsvektoren pRSETBPuuN und pRSETBDobN

Als Vektor für die Herstellung der bakteriellen Expressionsplasmide für die hantaviralen N-Proteine von Puumala und Dobrava wurde pRSETB der Fa. Invitrogen verwendet. Wie nachfolgend beschrieben, enthält dieser ein Fusionspeptid, das neben einer Multi Cloning Site (MCS) zur Klonierung des S-Segmentes als Insert auch eine Einheit aus 6 Histidinen aufweist, die für die spätere Aufreinigung des nachfolgend exprimierten N-Proteins von Bedeutung ist.



Abb. 10: Funktionseinheit des pRSETB – Vektors

Dargestellt sind in schematischer Abfolge die Funktionseinheiten des pRSETB- Vektors. Die Bedeutungen der Abkürzungen sind nachfolgend aufgeführt.

PT7: T7 Promotor, RBS: Ribosome-Binding-Site, ATG-Startcodon, 6×His-tag: Einheit aus 6 Histidinen, EK: Enterokinase zur Spaltung bekannter Sequenzen zur Trennung von Protein und Fusionspeptid, MCS: Multiple-Cloning-Site und Term: Terminator.

Für die Umklonierung des PuumalaS- bzw. DobravaS-Segmentes aus dem pCR2.1TOPOVektor in den pRSETB Vektor wurde als Ausgangsmenge 10µg des vorliegenden pCR2.1TOPOPuuN- bzw. pCR2.1TOPODobN –Plasmides eingesetzt. Die gleiche Menge wurde vom ausgewählten Expressionsvektor pRSETB von Invitrogen verwendet. Folgende Klonierungsstrategie wurde umgesetzt: Das pCR2.1TOPOPuumalaN- bzw. DobravaN- Plasmid wurde durch Schneiden mit KpnI linearisiert und das entstandene 3`-5´-sticky end mit der T4-Polymerase gebluntet. Die anschließende Phenol/Choroform-Extraktion und folgende Ethanol-Fällung befreiten den Ansatz von restlicher Enzymaktivität und dem vorangegangenen Spaltungspuffer. Ein zweiter Enzymverdau mit XhoI trennte die cDNA des PuumalaS- und DobravaS-Segmentes aus dem linearisierten pCR2.1TOPO Vektor und erzeugte ein sticky end. Die beiden Spaltprodukte, bestehend aus dem pCR2.1TOPO Vektor und der hantaviralen cDNA des S-Segmente wurden auf einem präparativen Agarosegel voneinander getrennt. Der Expressionsvektor pRSETB wurde durch einen Restriktionsenzym-Verdau mit HindIII linearisiert und das 5´- Ende mit dem Klenow Enzym geglättet. Es folgte eine Phenol/Chloroform Extraktion und eine Ethanol Fällung. Daran schloß sich ein zweiter Verdau mit XhoI an, aus dem ein sticky-end resultierte. Der Vektor wurde wie auch das vorbereitete Insert auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und eluiert. Die Ligation von PuumalaN- bzw. DobravaN-Insert in den bakteriellen Expressionsvektor pRSETB fand über Nacht im Wasserbad bei 14°C als sticky-blunt-end Ligation mit Hilfe der Ligase statt.

Folgende Plasmidkarten wurden für die Expressionsvektoren pRSETBPuuN und pRSETBDobN konstruiert:

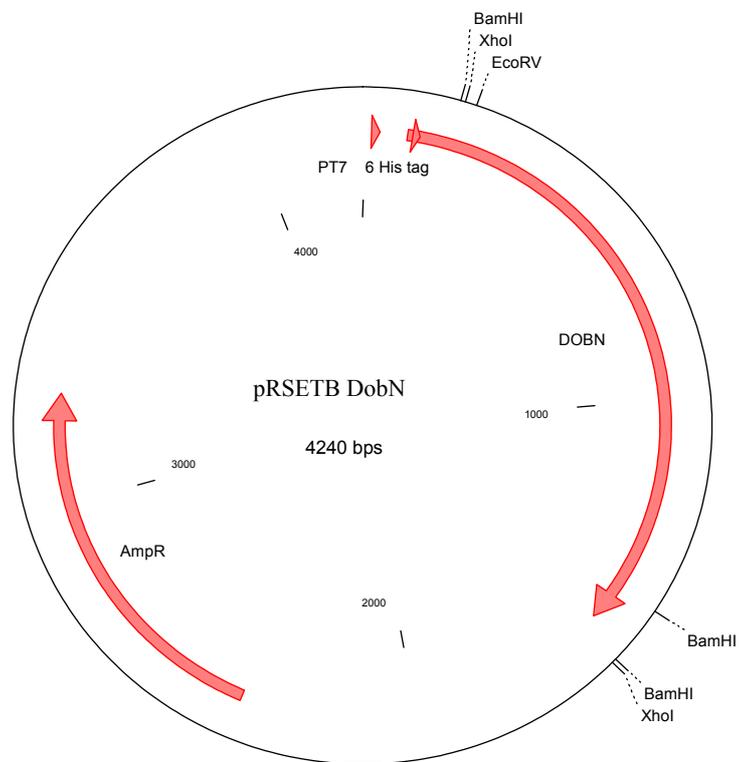
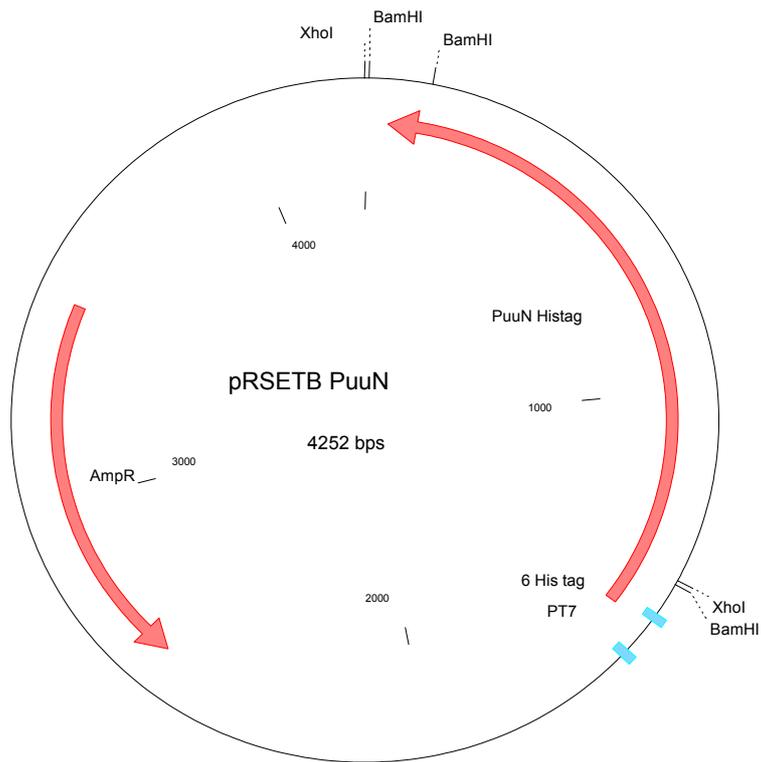


Abb. 11: Plasmidkarten der Expressionsvektoren pRSETBPuuN und pRSETBDobN

Der Ansatz wurde dann in JM 109 kompetente Zellen transformiert. Die gepickten Kolonien wurden in LB/Ampicillin-Medium bei 37°C zum Wachstum angeregt, das entstandene Plasmid pRSETBPuuN und pRSETBDobN durch eine Minipräparation mit der TENS-Methode isoliert, aufgereinigt und dessen Richtigkeit durch Restriktionsenzymverdau bewiesen.

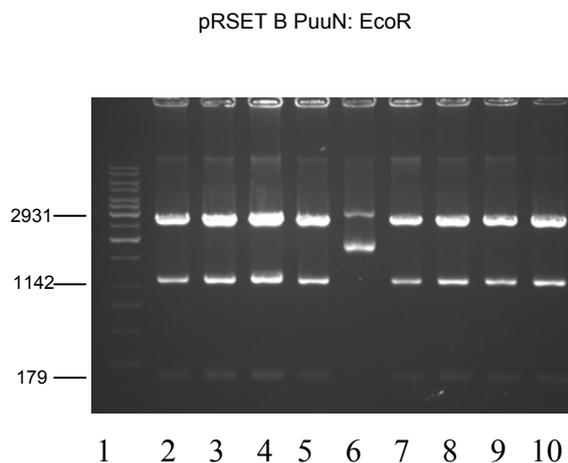


Abb. 12: Probespaltung von Plasmiden mit EcoRI zur Identifikation von positiven Expressionsklonen pRSETBPuuN

Spur 1: Marker

Spur 2-5, 7-10: positive Expressionsplasmide pRSETBPuuN, Spaltung mit EcoRI ergibt das angezeigte Bandenmuster 2931bp, 1142 bp und 179 bp;

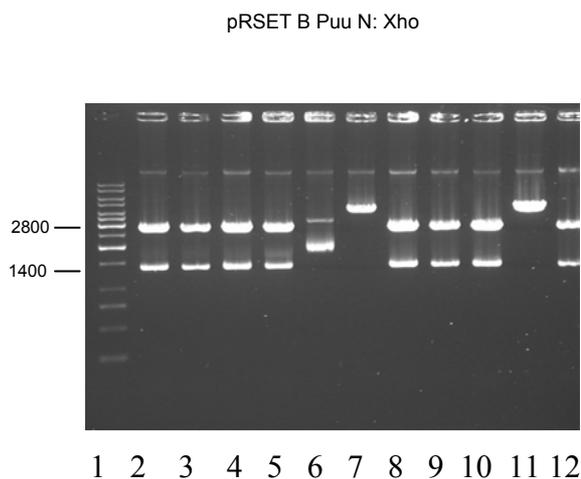


Abb. 13: 2. Probespaltung von Plasmiden mit XhoI zur Identifikation von positiven Expressionsklonen pRSETBPuuN

Spur 1: Marker

Spur 2-5, 8-10, 12: positive Expressionsplasmide pRSETBPuuN, Spaltung mit XhoI ergibt das Bandenmuster 2800bp und 1400bp

Die Spuren 1 bis 10 entsprechen den Plasmiden den Spuren 1 bis 10 in Abb.12.

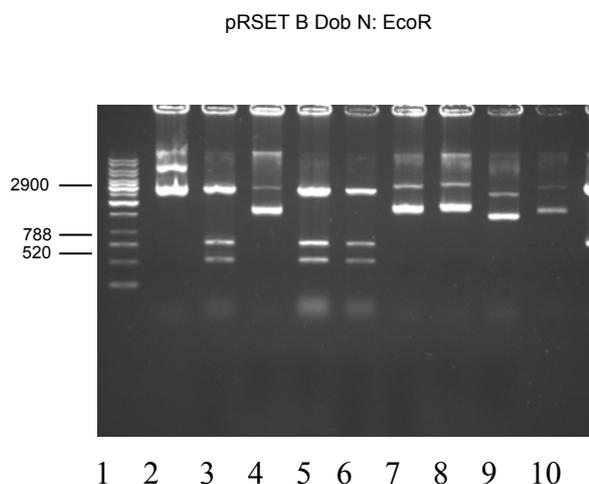


Abb. 14: Probespaltung von Plasmiden mit EcoRI zur Identifikation positiver Expressionsvektoren pRSETBDobN

Spur 1: Marker

Spur 3, 5, 6: positive Expressionsvektoren pRSETBDobN, Restriktionsenzymverdauung ergibt das für das Expressionsplasmid typische Bandenmuster 2900bp, 788bp und 520 bp.

Um die in frame – Klonierung der Übergänge von pRSETB – Vektor und PuuN bzw. DobN zu überprüfen, wurden die entstandenen Expressionsplasmide sequenziert.

Für die Sequenzierung von pRSETBPuuN wurden die Primer RSET1, RSET2, sowie Mel1 bis Mel 4 und für pRSETBDobN die Primer RSET1, RSET2, 1143 bis 1146 verwendet. Die Ergebnisse sind im Folgenden dargestellt.

TATACATATG¹CGGGGTTCTCATCATCATCATCAT²GGTATGGCTAGCAT
 GACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGA
 TCCGAGctcgaGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTcgccctTtATG³a
 gtgacttgaca.....
 tcgaaccaggaaccactaaagataTAA⁴AaggcgAATTCAGCACAC

Abb. 15: Sequenzierung der Übergänge des pRSETBPuumalaN – Expressionsvektors

Mit Grossbuchstaben ist der pRSETB – Vektor, mit Kleinbuchstaben das PuumalaN – Insert dargestellt. Die Bedeutung der Nummerierungen werden im Folgenden erklärt.

1: ATG – Startcodon des pRSETB – Vektors, 2: 6 × His-tag, 3: ATG - Startcodon des PuuN – Gens, in frame zu ATG des pRSETB – Vektors und 4: TAA – Stopcodon des PuuN – Inserts.

TATACATATG¹CGGGGTTCTCATCATCATCATCAT²GGTATGGCTAGCAT
GACTGGTGGACAGCAAATGGGTTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGA
TCCGAGctcgagCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTcgccctTtATG³gc
aacactagagga.....
.....gatccgaaattcgaagtctagcacaggcattgatcgatcaaaaggtaaagaaatatctaatacaggagccgct
caagcttTAA⁴AagggcgAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACTAGTG

Abb. 16: Sequenzierung der Übergänge des pRSETBDobravaN - Expressionsvektors

Mit Grossbuchstaben ist der pRSETB – Vektor, mit Kleinbuchstaben das DobravaN – Insert dargestellt. Die Bedeutung der Nummerierungen werden im Folgenden erklärt. 1: ATG – Starcodon des pRSETB – Vektors, 2: 6 × His-tag des pRSETB – Vektors, 3: ATG – Starcodon des DobravaN – Inserts und 4: TAA – Stopcodon des DobravaN – Gens.

Die Ergebnisse der Sequenzierungen zeigten, dass der Leserahmen von Vektor und Insert übereinstimmten. Das ATG des pRSETB Vektors steht demnach in der richtigen Beziehung zum ATG des PuumalaN – bzw. DobravaN - Gens. Es hat also durch die Klonierung keine Leserasterverschiebung stattgefunden. Deshalb kann man davon ausgehen, dass das nachfolgend exprimierte Produkt das hantavirales N – Protein darstellt. Anhand der Sequenzierung ist auch zu erkennen, dass die N – Proteine eine Verlängerung um etwa 50 Aminosäuren am N-terminalen Ende durch die Integration in den Vektor erfahren.

3.3 Proteinexpression

Der bakterielle Expressionsvektor pRSETBPuuN und pRSETBDobN wurde zur Vorbereitung der Proteinexpression in BL21DE3 kompetente Zellen transformiert.

Frisch gepickte Kolonien wurden in LB/Ampicillin versetztes Medium gegeben und bis zu einer Optischen Dichte (OD) von 0.6 wachsen gelassen. Die OD wurde photometrisch bestimmt. Dann erfolgte die Zugabe von IPTG als Induktor der Proteinexpression. Die Expression des N-Proteins, als Produkt des S-Segmentes von Puumala und Dobrava erfolgte bei einer Optimaltemperatur von 35°C für 12 bis 16

Stunden. Die Suspension wurde dann abzentrifugiert und das entstandene Sediment in PBS/Triton-X 100 aufgenommen und resuspendiert (für 100ml Bakteriensuspension wurde das Bakteriensediment in 2ml Lösung aufgenommen). Durch die Zugabe von Lysozym wurde das bakterielle Murein der BL21DE3 Zellen zerstört und ein Zellaufschluß erreicht. Anschließende DNase- und Ultraschallbehandlung diente dem Abbau störender bakterieller DNA für die folgende optimale Aufreinigung des exprimierten Proteins. Anschließend wurde für mindestens 1 Stunde bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert, um eine lösliche (den Überstand) von einer unlöslichen (dem Sediment) Fraktion zu trennen. Das Sediment als unlöslicher Anteil wurde in Bindepuffer/ 6M Urea resuspendiert, das enthaltene Protein wurde dadurch in eine soluble Form überführt. Sowohl das N-Protein von Puumala als auch das von Dobrava befanden sich in der unlöslichen Fraktion, was durch ein SDS-PAGE nachgewiesen wurde. Hier war erkennbar, dass auf der gesuchten Markerhöhe eine Bande als Nachweis der Proteinexpression zu erkennen war. Die im Bindepuffer/ 6 M Urea resuspendierte unlösliche Fraktion wurde für eine weitere Stunde bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert, das Sediment verworfen und der proteinenthaltende Überstand weiterverarbeitet.

3.4 Proteinaufreinigung mit der immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie

Die Vorbereitung der Säulen erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Proteinfraction wurde auf die Säulen aufgetragen. Durch Wechselwirkungen zwischen den Histidinen des His-tags des Proteins und dem im Metallkomplexharz gebundenen Nickel wurde das Protein an die Säule gebunden und immobilisiert. Unspezifisch gebundenes Protein wurde aus der Säule gewaschen. Die Eluierung der hantaviralen N-Proteine aus der Säulenmatrix erfolgte durch kompetitive Verdrängung der Bindung zwischen Protein und Nickel durch die Erhöhung der Imidazolkonzentration im verwendeten Elutionspuffer. Die Konzentration an Protein im Eluat wurde mit dem Kit von PIERCE bestimmt und das Eluat anschließend dialysiert. Durch die Dialyse wurde die Urea entfernt und damit die physiologische Voraussetzung für die folgende Injektion und Immunisierung der Kaninchen geschaffen. Die exprimierten

aufgereinigten Nukleokapsid-Proteine wurden in folgenden Experimenten nachgewiesen und bestätigt:

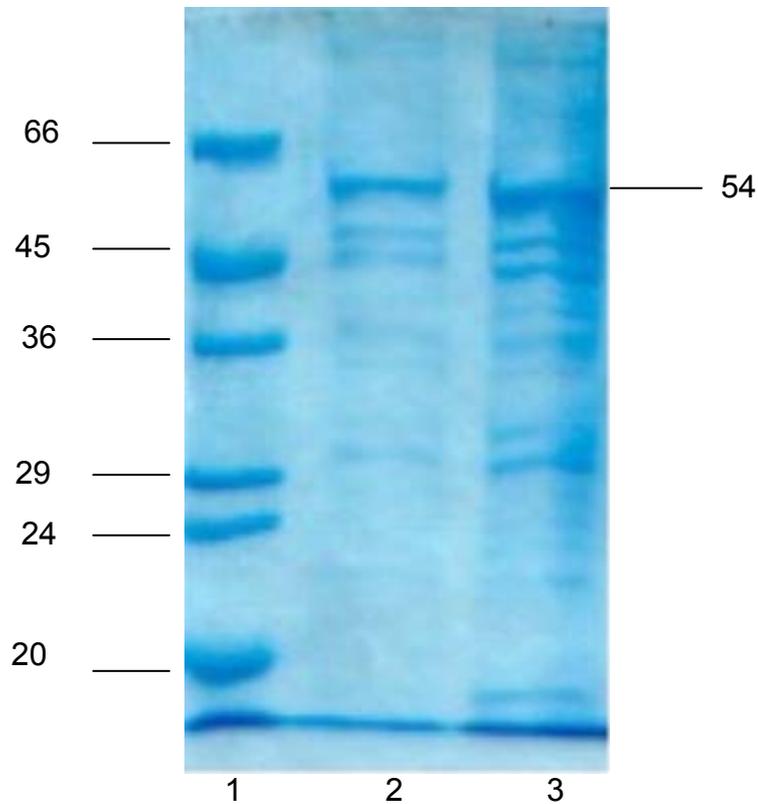


Abb. 17: Darstellung des exprimierten PuumalaN – Proteins nach Aufreinigung mit der immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie

Gezeigt wird ein SDS-PAGE mit den exprimierten PuumalaN – Proteinen und anschließender Coomassie Blau Färbung. Die Angaben der Bandenhöhe in kD.

Spur 1: Rainbow Marker

Spur 2: PuumalaN – Protein, Klon 1

Spur 3: PuumalaN – Protein, Klon 2

Im SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Blau Färbung ist in Abbildung 17 auf Höhe von 54 kD eine Bande zu erkennen. Mit dem Wissen, daß das PuumalaN – Protein ein solches Molekulargewicht aufweist, ist die Bande in Spur 2 und 3 als PuumalaN – Protein zu deuten. Als schwächere Banden mit geringerem Molekulargewicht sind wahrscheinlich Abbauprodukte oder noch mitgereinigte unspezifische bakterielle Proteine zu erkennen.

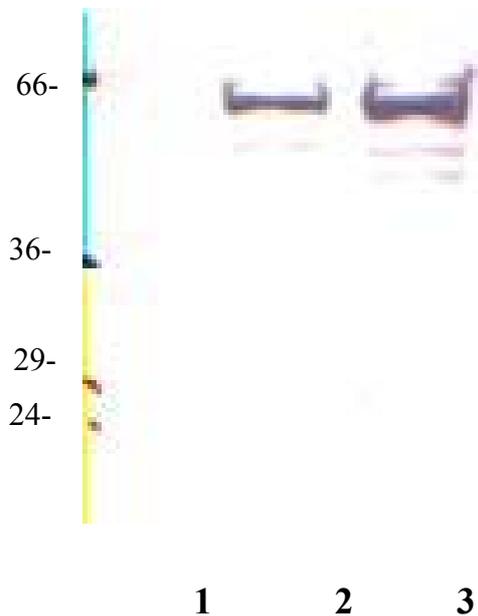


Abb. 18: Western Blot zum Nachweis der exprimierten PuumalaN – Proteine

Spur 1: Rainbow Marker, Angaben in kD

Spur 2: PuumalaN – Protein

Spur 3: PuumalaN - Protein

Auf ein SDS-PAGE wurden die PuumalaN Proteine aufgetragen und aufgetrennt. Dann wurde im Immunoblot die N – Proteine mit folgenden Antikörpern markiert: als 1 . Antikörper wurde Patientenserum nach Puumalavirus - Infektion verwendet, als 2. Antikörper wurde ein Anti-Human-Antikörper, IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt verwendet.

Die Darstellung der isolierten PuumalaN – Proteine im Western Blot ist hinsichtlich der Spezifität der Coomassie Blau Färbung überlegen. Die Spezifität ergibt sich dabei aus der Wahl der verwendeten Antikörper. So wurde Serum von Patienten nach Hantavirusinfektion verwendet. Die darin enthaltenen Antikörper erkennen das N – Protein und koppeln daran, was mit einem 2. Antikörper in einer Alkalischen Phosphatase Reaktion sichtbar gemacht werden konnte. Das isolierte Protein ist demnach als hantavirales PuumalaN-Protein zu charakterisieren.

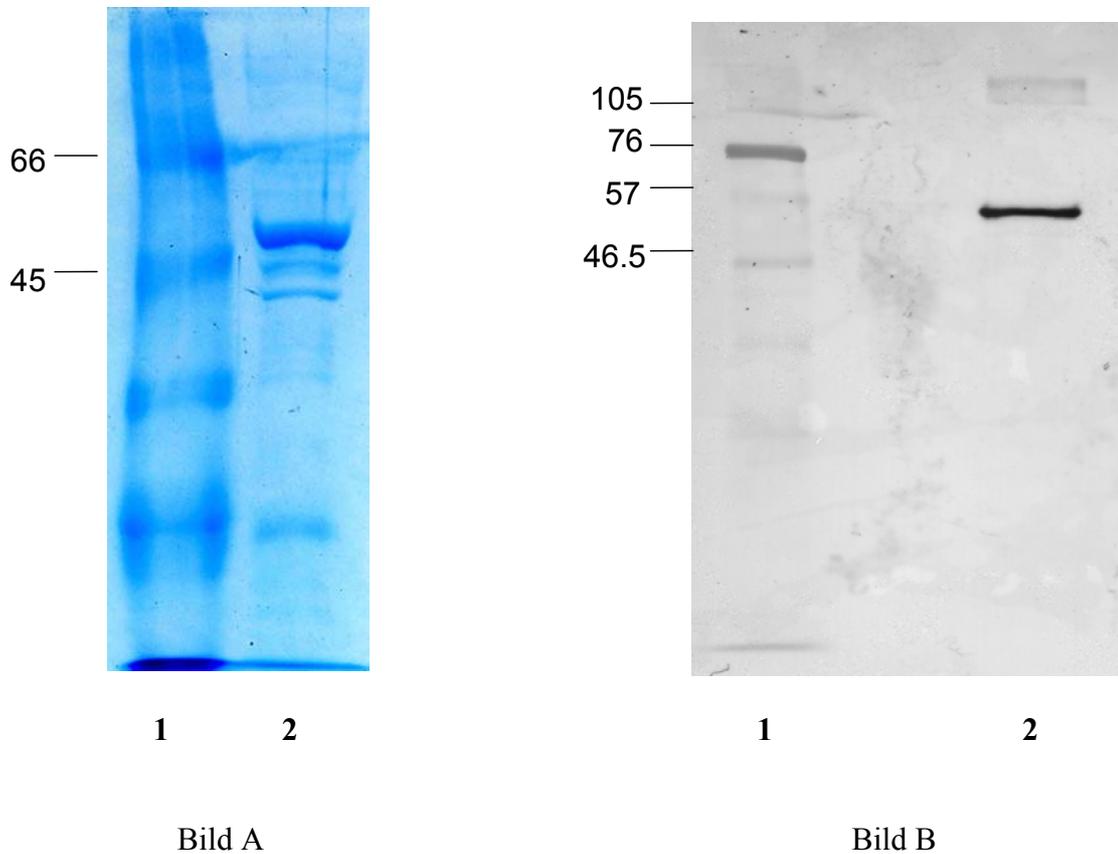


Abb. 19:

Bild A: SDS-PAGE mit anschließender Coomassie blau Färbung des exprimierten DobravaN – Proteins nach Aufreinigung mit der immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie

Spur 1: Rainbow Marker, Angabe der Bandenhöhe in kD

Spur 2: DobravaN – Protein mit einem Molekulargewicht von 54kD

Bild B: Western Blot zum Nachweis des exprimierten aufgereinigten DobravaN-Proteins und Färbung mit Diaminobenzidin (DAB)

Spur 1: Biotin Marker

Spur 2: DobravaN-Protein mit einem Molekulargewicht von 54kD

Im SDS-PAGE erfolgte die Auftrennung des N-Proteins. Die Markierung des Proteins wurde im Western Blot mit folgenden Antikörpern durchgeführt: als 1. Antikörper wurde ein Anti-His-Tag-Antikörper (Maus) verwendet, als 2. Antikörper wurde ein Anti-Maus-Antikörper, IgG, POD gekoppelt, aufgetragen. Die Darstellung des exprimierten aufgereinigten DobravaN-Proteins ist analog zu Abbildung 17 in Coomassie Blau Färbung in Bild A. Es stellt sich hierbei auf der Höhe eines Molekulargewichtes von 54 kD eine Bande dar, die durch die Bestätigung im Western Blot in Bild B als isoliertes DobravaN – Protein anzusehen ist. Die Spezifität des Nachweises ist allerdings der des PuumalaN- Proteins in Abb.18 im

Western Blot unterlegen, da kein Patientenserum nach Dobravavirus - Infektion vorlag. Deshalb musste als erster Antikörper ein Anti-His-Tag Antikörper verwendet werden, der an die N-terminal gelegenen Histidine des Proteins band. Diese Region ist allerdings als Abschnitt des pRSETB Vektors anzusehen, der erst durch die Klonierung auf das N-codierende Segment übergegangen ist.

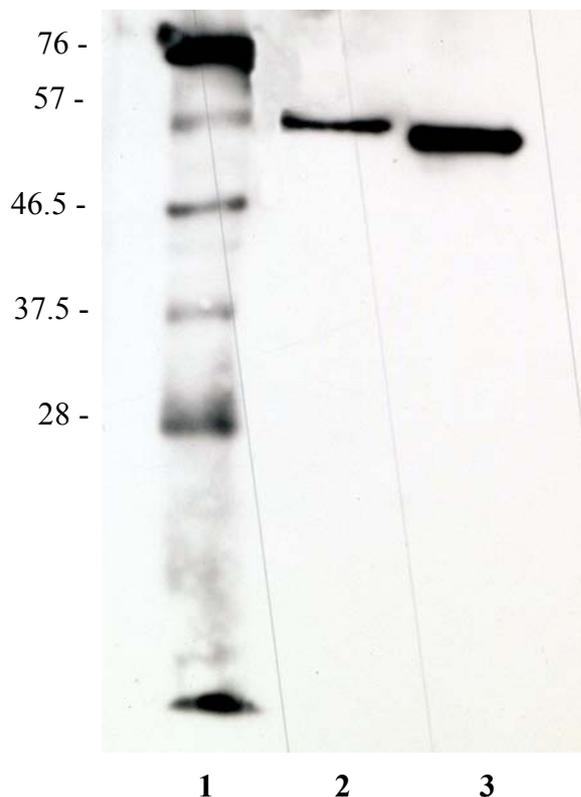


Abb. 20: Western Blot mit den exprimierten hantaviralen N – Proteinen Puumala und Dobrava und Färbung durch eine ECL – Reaktion

Spur 1: Biotin – Marker, Angaben in kD

Spur 2: PuumalaN – Protein, Molekulargewicht von 54,8kD

Spur 3: DobravaN – Protein, Molekulargewicht von 54kD

Dargestellt ist ein SDS – PAGE der beiden hantaviralen N – Proteine Puumala und Dobrava und anschließender Markierung der Proteine im Immunoblot. Als 1. Antikörper wurde ein Anti-His-Tag-Antikörper (Maus), als 2. Antikörper ein Anti –Maus –Antikörper, IgG, POD gekoppelt, verwendet. Deutlich wird das etwas geringere Molekulargewicht des DobravaN Proteins im Vergleich zum PuumalaN Protein. Der Nachweis des Molekulargewichtes in Verbindung mit der spezifischen Antikörperreaktion ist als Beweis der Charakterisierung der beiden Proteine als hantavirale N –Proteine anzusehen.

Die Sequenzierungsergebnisse von pRSETBPuuN und pRSETBDobN werden in der folgenden Darstellung als Aminosäuresequenz der Nukleokapsidproteine gezeigt und mit den Sequenzen von DobravaN (Saarema) bzw. PuumalaN (Sotkamo) der EMBL – Datenbank verglichen.

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

Hanta, PuuN/Sotkamo

MSDLTDIQEDITRHEQQQLIVARQKLKDAERAVEVDPDDVNKNTLQARQQTVSALEDKLAD 60

PuuN, Klon3

MSDLTDIQEDITRHEQQQLIVARQKLKEAERAVEVDPDDVNKNTLQARQQTVSALEDKLAD 60

PuuN, Klon1

MSDLTDIQEDITRHEQQQLIVARQKLKEAERAVEVDPDDVNKNTLQARQQTVSALEDKLAD 60

Hanta, PuuN/Sotkamo

YKRRMADAVSRKKMDTKPTDPTGIEPDDHLKERSRLRYGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWY 120

PuuN, Klon3

YKRRMADAVSRKKMDTKPTDPTGIEPDDHLKERSRLRYGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWY 120

PuuN, Klon1

YKRRMADAVSRKKMDTKPTDPTGIEPDDHLKERSRLRYGNVLDVNAIDIEEPSGQTADWY 120

Hanta, PuuN/Sotkamo

TIGVYVIGFTLPIILKALYMLSTRGRQTVKENKGTRIRFKDDTSFEDINGIRRPKHLYVS 180

PuuN, Klon3

TIGVYVIGFTLPIILKALYMLPTRGRQTVKENKGTRIRFKDDTSFEDINGIRRPKHLYVS 180

PuuN, Klon1

TIGVYVIGFTLPIILKALYMLSTRGRQTVKENKGTRIRFKDDTSFEDINGIRRPKHLYVS 180

Hanta, PuuN/Sotkamo

MPTAQSTMKAEEELTPGRFRITIVCGLFPTQIQVRNIMSPVMGVIGFSFFVKDWSERIREFM 240

PuuN, Klon3

MPTAQSTMKAEEELTPGRFRITIVCGLFPTQIQVRNIMSPVMGVIGFSFFVKDWSERIREFM 240

PuuN, Klon1

MPTAQSTMKAEEELTPGRFRITIVCGLFPTQIQVRNIMSPVMGVIGFSFFVKDWSERIREFM 240

Hanta, PuuN/Sotkamo

EKECPFIFKPEVKPGTPAQEIEMLKRNKIYFMQRQDVLDKNHVADIDKLIDYAASGDPTSP 300

PuuN, Klon3

EKECPFIFKPEVKPGTPAQEIEMLKRNKIYFMQRQDVLDKNHVADIDKLIDYAASGDPTSP 300

PuuN, Klon1

EKECPFIFKPEVKPGTPAQEIEMLKRNKIYFMQRQNVLDKNHVADIDKLIDYAASGDPTSP 300

Hanta, PuuN/Sotkamo

DNIDSPNAPWVFACAPDRCPPTCIYVAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEKELK 360

PuuN, Klon3
 DNIDSPNAPWVFACAPDRCPPTCIYVAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEKELK 360
 PuuN, Klon1
 DNIDSPNAPWVFACAPDRCPPTCIYVAGMAELGAFFSILQDMRNTIMASKTVGTAEKELK 360

Hanta, PuuN/Sotkamo
 KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRI ILLFMLEWGKEMVDHFHLGDDMDPELRGLAQUALIDQ 420
 PuuN, Klon3
 KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRI ILLFMLEWGKEMVDHFHLGDDMDPELRGLAQUALIDQ 420
 PuuN, Klon1
 KKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRI ILLFMLEWGKEMVDHFHLGDDMDPELRGLAQUALIDQ 420

Hanta, PuuN/Sotkamo KVKEISNQEPLKI 433
 PuuN, Klon3 KVKEISNQEPLKI 433
 PuuN, Klon1 KVKEISNQEPLKI 433

Abb. 21: Clustal Alignment für das Puumala Nukleokapsid Protein

Abweichungen in der Aminosäuresequenz sind unterstrichen dargestellt.

Hanta PuuN/Sotkamo: EMBL-Sequenz

PuuN, Klon 1 und 3: exprimierte PuuN-Proteine

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

Dobrava/Saarema/160V/N
 MATLEELQKEINSHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPDDLNRALSDRESI 50
 Klon3.2
 MATLEELQKEINSHEGQLVIARQKVKDAEKQYEKDPDDLNRALSDRESI 50
 Dobrava/Saarema/160V/N
 AQSIQGKIDELRRQLADRVAAGKNIGKERDPTGLDPGDHLKEKSMLSYGN 100
 Klon3.2
 AQSIQGKIDELRRQLADRVAAGKNIGKERDPTGLDPGDHLKEKSMLSYGN 100

Dobrava/Saarema/160V/N
 VIDLNHL DIDEPTGQTADWLS IVIYLTSFVVPILLKALYMLTTRGRQTTK 150
 Klon3.2
 VIDLNHL DIDEPTGQTADWLS TVIYLTSFVVPILLKALYMLTTRGRQTTK 150

Dobrava/Saarema/160V/N
 DNKGM RIRFKDSSFEVDVNGIRKPKHLFLSMPNAQSSMKADEITPGRFRT 200
 Klon3.2
 DNKGM RIRFKDSSFEVDVNGIRKPKHLFLSMPNAQSSMKADEITPGRFRT 200

Dobrava/Saarema/160V/N
 AVCGLYPAQVKARNLISPVM SVIGFLTLAKNWTERVEEWLDLPCKLLSEP 250
 Klon3.2
 AVCGLYPAQVKARNLISPVM SVIGFLTLAKNWTERVEEWLDLPCKLLSEP 250

Dobrava/Saarema/160V/N
 SPTSLTKGPSTNRDYL SQRQ GALAKMETKEAQVVRKH AIDAGCNIIDHID 300
 Klon3.2
 SPTSLTKGPSTNRDYL SQRQ GALAKMETKEAQAVRKH AIDAGCNIIDHID 300

Dobrava/Saarema/160V/N
 SPSSIWVFAGAPDRCPPTCLFIAGMAELGAFFAVLQDMRNTIMASKTIGT 350
 Klon3.2
 SPSSIWVFAGAPDRCPPTCLFIAGMAELGAFFAVLQDMRNTIMASKTIGT 350

Dobrava/Saarema/160V/N
 SEEKLRKKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVL FMI EWGKEAVDSFHLGD 400
 Klon3.2
 SEEKLRKKSSFYQSYLRRTQSMGIQLDQRIIVL FMI EWGKEAVDSFHLGD 400

Dobrava/Saarema/160V/N DMDPEIRSLAQALIDQKVKEISNQEPLKL 429
 Klon3.2 DMDPEIRSLAQALIDQKVKEISNQEPLKL 429

Abb. 22: Clustal Alignment für das Dobrava Nukleokapsid Protein

Abweichungen in der Aminosäuresequenz sind unterstrichen dargestellt.

Dobrava/ Saarema/ 160V/ N: EMBL-Sequenz

Klon 3.2: exprimiertes DobN-Protein

Der Vergleich zeigte, dass sich die Proteine in einzelnen Aminosäuren unterschieden.
 Zum Verständnis der Abkürzungen folgt eine kurze tabellarische Übersicht:

Tabelle 4:

Buchstabencode für die Nomenklatur der Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cyst	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q

Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Um den Austausch der Aminosäuren in Bezug auf eine mögliche Änderung des Proteincharakters deuten zu können, muß das chemische Verhalten der Aminosäuren in Abhängigkeit ihrer Seitenkette berücksichtigt werden. So lassen sich die Aminosäuren nach der Polarität bzw. Acidität ihrer Seitenketten einteilen in:

1. Neutrale Aminosäuren: Asn, Cys, Gln, Thr, Ser, Tyr, His, Trp, Gly, Ala
2. Unpolare Reste: Trp, Phe, Pro, Met, Gly, Ala, Val, Leu, Ile
3. Saure Reste: Asp, Glu, Tyr
4. Basische hydrophile Reste: Lys, Arg, His

Das PuumalaN Protein unterscheidet sich von der Aminosäuresequenz der EMBL Datenbank in folgenden Positionen:

1. Klon 1 und 3 an der 27. Aminosäurenstelle durch einen Austausch von Asparaginsäure (D) gegen Glutaminsäure (E)
2. Klon 3 an Position 142: hier ist Serin (S) gegen ein Prolin (P) ausgetauscht
3. Klon 1 an Position 275: Austausch von Asparaginsäure (D) gegen Asparagin (N)

Das Dobrava N Protein weicht von der EMBL Sequenz in folgenden Sequenzen ab:

1. an der 122. Aminosäurenstelle enthält der DobravaN 3.2 Klon ein Threonin (T) statt einem Isoleucin (I)
2. an Position 283 ist ein Valin (V) gegen ein Alanin (A) ausgetauscht
3. an Position 356 ein Arginin (R) gegen Glycin (G)

4. und an der 359. Aminosäurenstelle besteht ein Austausch eines Phenylalanins (F) gegen ein Serin.

Die N-Proteine von Puumalavirus und Dobravavirus wurden nach ihrer Testung in den vorangegangenen Darstellungen an die Fa. Eurogentec/Belgien versendet, welche die Immunisierung von Kaninchen mit hantaviralem N-Protein der beiden Stämme Puumala und Dobrava mit dem Ziel der Antikörperproduktion durchführten.

3.5 Antikörpertestung

Die Fa. Eurogentec schickte in definierten Zeitintervallen Serum der immunisierten Kaninchen zur Testung der polyklonalen Antikörper anti-PuumalaN-AK (IgG) und anti-DobravaN-AK (IgG). Das Serum wurde in 500µl Proben aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Charakterisierung und die Bestimmung der Sensitivität der hantaviralen N-Protein Antikörper wurde in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. So wurde mit dem recomBunyavirus Kit der Fa. Mikrogen die Spezifität der erhaltenen Antikörper bewiesen, aber auch Kreuzreaktivität zu verwandten Bunyaviridae aufgezeigt. In einem Western Blot wurden die Antikörper in verschiedenen Verdünnungen bis zu 1:4000 eingesetzt und damit deren Sensitivität für spätere Anwendungen bestimmt.

Der recom Line Bunyavirus IgG/ IgM – Test der Fa. Mikrogen ist ein Streifen – Immunoessay – Test mit rekombinant produzierten Antigenen zur Bestimmung von IgG – und IgM – Antikörpern gegen Hantavirus der Serotypen Hantaan, Puumala, Seoul und Dobrava, sowie das Sandfliegenfiebertvirus des Serotyps Toscana in humanen Serum oder Plasma. Er wird verwendet als qualitativer in-vitro-Test zum Nachweis und zur Identifizierung von Antikörpern gegen die genannten Antigene, wobei als Antigene die fünf rekombinant produzierten Nukleokapsidproteine (N – Proteine) der Viren verwendet werden. Die N – Proteine sind immundominant und werden deshalb im den vorliegenden Test verwendet. Das Testprinzip des Kits wurde bereits im Methodenteil erläutert. Die Streifen sind wie folgt beschriftet: die Reaktionskontrolle unter der Streifennummer, die bei jedem Serum eine Reaktion zeigen muß. IgG und IgM, die zur Kontrolle der jeweilig nachgewiesenen Antikörperklasse dienen. Pu + Ha als Abkürzung für den Serotyp Puumala und Hantaan, sowie der Nachweis für PuN (Puumala) und HaN (Hantaan) getrennt voneinander. Es folgen die Antigene für DobN

als DobravaN, für SeoN als SeoulN und SFTOS als Antigen des Sandfliegenvirus Typ Toscana.

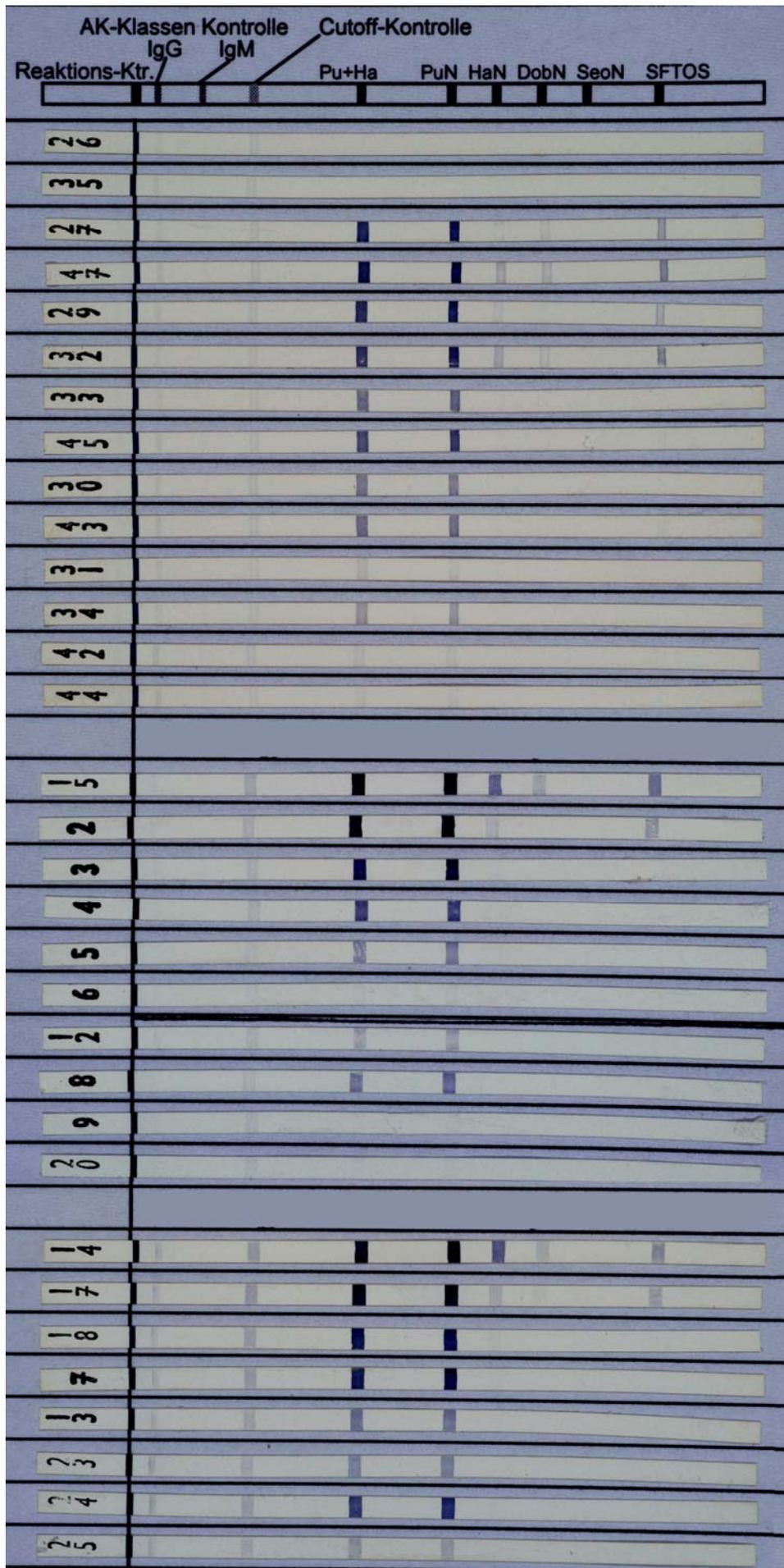


Abb.23: Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen hantavirales N – Protein mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen, Antikörper gegen PuumalaN-Protein

Erhaltene Serumprobe **nach prim. Immunisierung**

26 - Präimmunsersum PuuN 1
35 - Präimmunsersum PuuN 3
27 - PuuN 1, bleed 1, 1:10
47 - PuuN 1, bleed 2, 1:10
29 - PuuN 3, bleed 1, 1:10
32 - PuuN 3, bleed 2, 1:10
33 - PuuN 1, bleed 1, 1:100
45 - PuuN 1, bleed 2, 1:100
30 - PuuN 3, bleed 1, 1:100
43 - PuuN 3, bleed 2, 1:100
31 - PuuN 1, bleed 1, 1:1000
34 - PuuN 1, bleed 2, 1:1000
42 - PuuN 3, bleed 1, 1:1000
44 - PuuN 3, bleed 2, 1:1000

Serum **nach erster Booster-Reaktion**

15 - PuuN 1, 1:10
02 - PuuN 3, 1:10
03 - PuuN 1, 1:100
04 - PuuN 3, 1:100
05 - PuuN 1, 1:1000
06 - PuuN 3, 1:1000

Zum Vergleich der Reaktion wurden Proben der prim. Immunisierung mitgetestet:

12 - PuuN 1, bleed 1, 1:1000
08 - PuuN 1, bleed 2, 1:1000
09 - PuuN 3, bleed 1, 1:1000
20 - PuuN 3, bleed 2, 1:1000

Serum **nach zweiter Booster-Reaktion**

14 - PuuN 1, 1:10
17 - PuuN 3, 1:10
18 - PuuN 1, 1:100
07 - PuuN 3, 1:100
13 - PuuN 1, 1:1000
23 - PuuN 3, 1:1000

Zum Vergleich der Reaktion wurden Proben nach erster Booster-Reaktion mitgetestet:

24 - PuuN 1, 1:1000

Die Teststreifen mit der Nummer 26 und 35 wurden zur Kontrolle mit Präimmuns serum, also Serum des Kaninchens vor primärer Injektion des hantaviralen N-Proteins, inkubiert. Dann folgen Teststreifen, die mit Serum nach primärer Immunisierung getestet worden sind. Erhaltenes Serum wurde wie angegeben in einer Konzentration von 1:10, 1:100 und 1:1000 eingesetzt. Serum nach der 1.- bzw. der 2. Booster – Reaktion wurde in den gleichen Konzentrationsschritten verwendet, immer im Vergleich mit Serum nach der primären bzw. nach 1. Boostern, um einen möglichen stärkeren Reaktionsausfall erkennen zu können. Bei den aufgetragenen Proben kann von oben nach unten eine Zunahme der Intensität im Sinne der Boosterreaktion beobachtet werden (vergleiche dazu Teststreifen 31, 34 mit 5 und 13 für PuumalaN1, 1:1000 sowie 42, 44 mit 6 und 23 für PuumalaN3, 1:1000, jeweils nach primärer Immunisierung, nach erster und zweiter Booster-Reaktion). Im direkten Vergleich der Proben durch Auftragen der Proben von 1. und 2. Booster-Reaktion nebeneinander kommt dies leider nicht so deutlich zum Ausdruck (vergleiche Teststreifen 5 mit 12, 8 und 13 mit 24 sowie 6 mit 9, 20 und 23 mit 25). Die Teststreifen zeigen die deutlichste Reaktion bei der Markierung für Ha + Pu und Pu. Damit ist die Spezifität der erzeugten Antikörper gegen das PuumalaN – Protein als Antigen bewiesen. Deutlich wird auch, dass der Nachweis die IgG Antikörperklasse betrifft. Die leichte Färbung der Reaktionskontrolle entspricht der qualitativen Kontrolle. In den jeweils stärksten eingesetzten Konzentrationen zeigen die Teststreifen Kreuzreaktivitäten zwischen den einzelnen Serotypen.

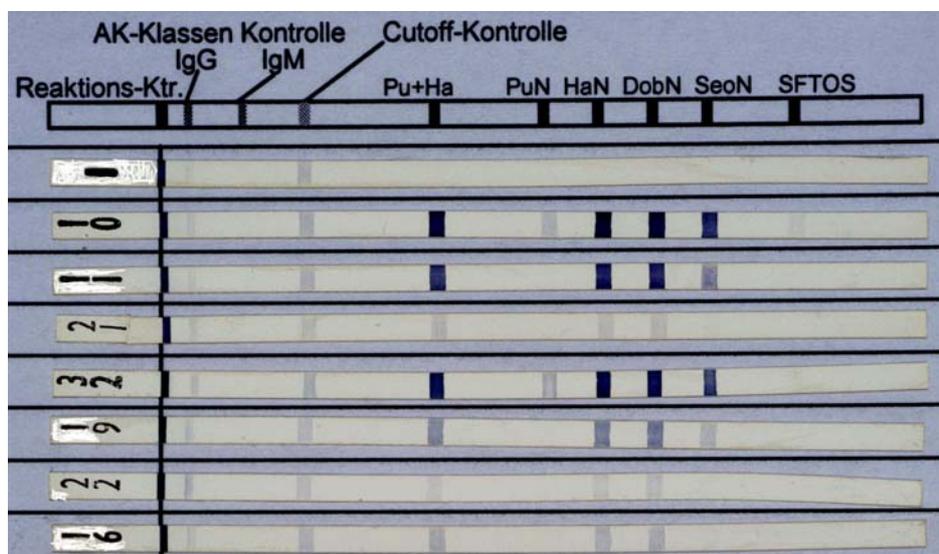


Abb.24: Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen hantavirales N – Protein mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen

Antikörper gegen DobravaN-Protein

Erhaltene Serumprobe nach primärer Immunisierung

01 – Präimmunserum DobN

10 – DobN 1:10

11 - DobN 1:100

21 - DobN 1:1000

Serum nach erster Booster-Reaktion

32 - DobN 1:100

19 - DobN 1:1000

22 - DobN 1:4000

Zum Vergleich der Reaktion wurden Proben der prim. Immunisierung mitgetestet:

16 - DobN 1:1000

Teststreifen 01 ist die Negativkontrolle nach Inkubation mit Präimmunserum. Dann folgen die Streifen 10, 11 und 21, die die Reaktion des erhaltenen Serums nach primärer Immunisierung des Kaninchens mit DobravaN – Protein zeigen. Das Serum wurde dabei in den Konzentrationen 1: 10, 1: 100 und 1:1000 eingesetzt. Analog dazu folgen die Streifen mit der Nummer 32, 19 und 22, die die Reaktivität des Serums nach der 1. Booster – Reaktion zeigen. Zum Vergleich wurde eine Serumprobe vor Boosterreaktion in einer Konzentration von 1: 1000 aufgetragen. Dabei zeigt sich deutlich die Zunahme der Bandenintensität (vergleiche Teststreifen 19 und 16). Dabei ist die Reaktionskontrolle positiv und es handelt sich bei den nachgewiesenen Antikörpern um IgG. Ein sehr starker Reaktionsausfall ist bei der Markierung Pu+Ha, Ha, DobN und SeoN zu sehen. Aufgrund dieser Kreuzreaktivität des hoch reaktiven Serums ist deshalb eine genaue Differenzierung der Spezifität der Antikörper schwierig.

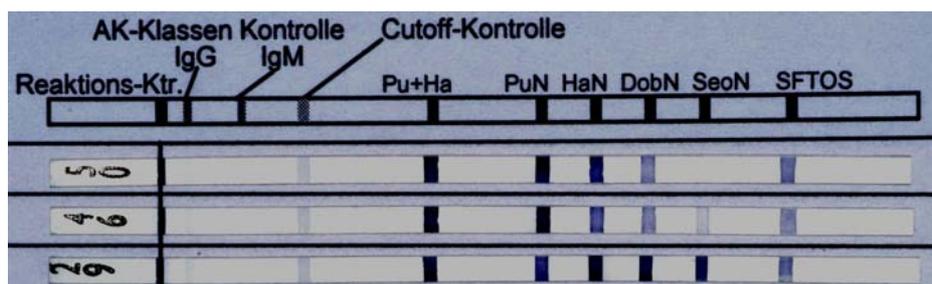


Abb.25: Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen hantavirales N – Protein mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen

Testung der Antikörper gegen Puumala- und DobravaN-Protein der Final Bleeds nach wiederholter Booster-Reaktion.

50 – PuuN 1, final bleed, 1:100

46 - PuuN 3, final bleed, 1:100

29 - DobN, final bleed, 1:100

Nach Abschluß der Immunisierung wurden die nun potentesten Seren noch einmal in einer Konzentration von 1: 100 getestet. Die intensive Färbung der verschiedenen Banden zeigt die hohe Reaktivität der Seren an. Deutlich dargestellt ist die Kreuzreaktivität von PuumalaN bzw. DobravaN mit den anderen Serotypen.

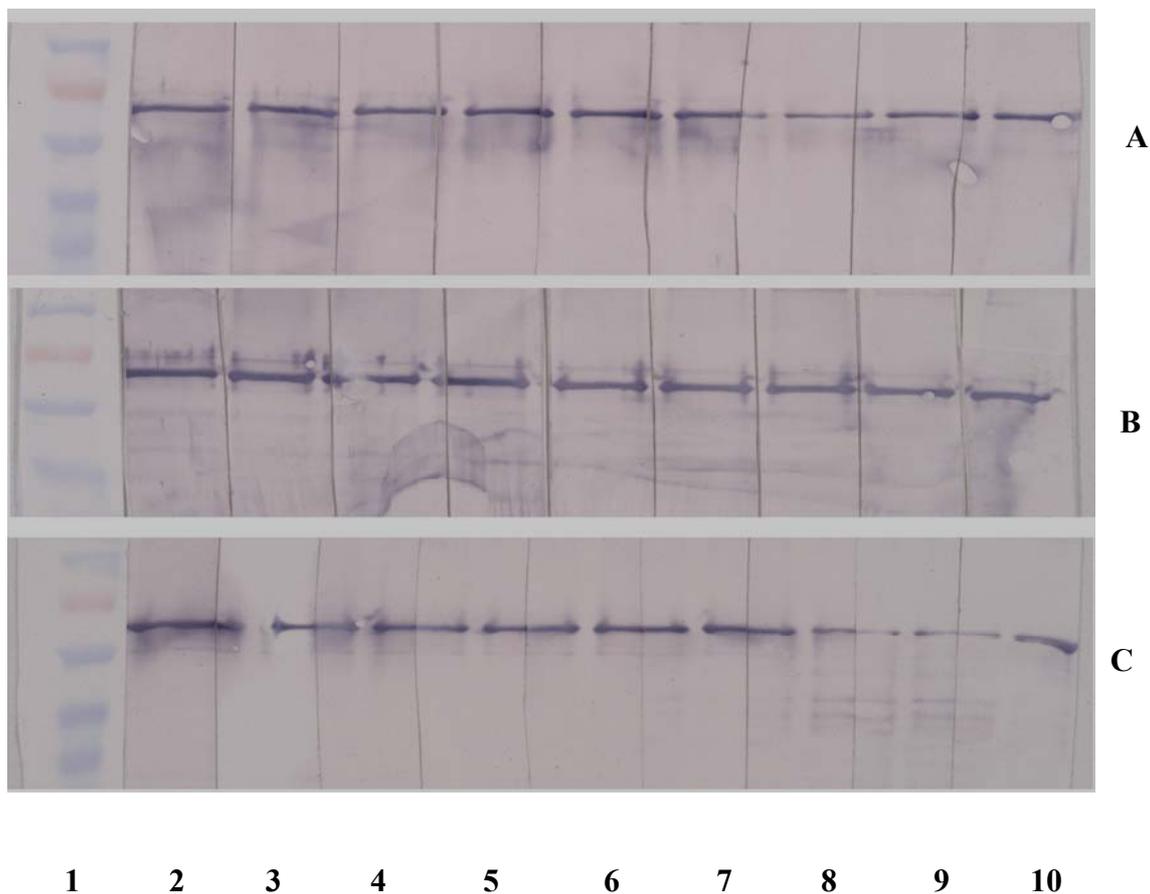


Abb. 26: Sensitivitätsnachweis der Antikörper gegen PuumalaN – und DobravaN – Protein der Final Bleeds im Western Blot mit den bakteriell exprimierten PuumalaN- bzw. DobravaN - Proteinen

Erstantikörper: Anti-N-Protein-AK, IgG, Kaninchen (Serum von der Fa. Eurogentec)

Zweitantikörper: Anti-rabbit-AK, IgG, AP

Bild A: Anti-PuumalaN1-Antikörper auf PuumalaN – beschichteter Membran

Bild B: Anti-PuumalaN3-Antikörper auf PuumalaN – beschichteter Membran

Bild C: Anti-DobravaN-Antikörper auf DobravaN – beschichteter Membran

Folgende Verdünnungen der Antikörper wurden ausgetestet:

01 - Rainbow Marker

02 - 1:100

03 - 1:500

04 - 1:1000

05 - 1:1500

06 - 1:2000

07 - 1:2500

08 - 1:3000

09 - 1:3500

10 - 1:4000

Im dargestellten Western Blot wurde nach einem SDS-PAGE ein Transfer des aufgetragenen PuumalaN – bzw. DobravaN – Proteins auf die Nitrocellulosemembran vorgenommen. Als Erstantikörper wurde erhaltenes Serum der Fa. Eurogentec nach abgeschlossener Immunisierungsreaktion verwendet, d. h. spezifische Antikörper gegen das jeweilige Protein. Als Zweitantikörper wurde ein an alkalischer Phosphatase gekoppeltes Anti – Rabbit – IgG –Serum eingesetzt, das kommerziell erworben worden war. Die PuumalaN- bzw DobravaN- Antikörper enthaltenden Seren wurden in einer Konzentration von 1:100 bis 1: 4000 eingesetzt, um die Grenze der Sensitivität des Nachweises festzulegen. Dabei sieht man, dass noch eine Verdünnung von 1: 4000 zu einem akzeptablem Reaktionsergebnis führt.

4. Diskussion

4.1. Biologische Bedeutung des N – Proteins

Die Bedeutung der exprimierten hantaviralen N – Proteine liegt in deren zentralen Rolle bei der Vermittlung der Immunreaktion nach einer Infektion. Die humorale Immunantwort richtet sich hauptsächlich gegen das N – Protein als Nukleokapsidantigen (Elgh et al., 1995; Lundkvist et al., 1993a). Eine effektive Immunantwort setzt dabei sehr früh mit dem Beginn der klinischen Symptome durch nachweisbare spezifische IgM-Antikörper ein. IgG-Antikörper erscheinen in der Regel erst 14 Tage später (Lundkvist et al., 1993b). Diese ersten Antikörper sind dabei gegen das N – Protein als Antigen gerichtet. Antikörper gegen die beiden Membranproteine G1 und G2 treten erst etwa 6 Wochen nach Erkrankungsbeginn auf und bilden sich auch nur schwach aus (Lundkvist et al., 1993b). Es ist allerdings zu beachten, dass bei einer Puumalavirusinfektion auch späte IgM Antworten möglich sind, d. h. dass trotz vorhandener Infektion negative Resultate beim versuchten Nachweis früher IgM-Antikörper möglich sein können. Trotzdem wird ein fehlender Nachweis von spezifischen IgM nach dem 6. Krankheitstag als Ausschluß einer Infektion gewertet (Kallio – Kokko et al., 1998). Auch wurden IgE Antworten beschrieben, die allerdings aufgrund der fehlenden Korrelation mit der klinischen Symptomatik vernachlässigt werden können (Alexeyev et al., 1994). Somit stellt sich das Nukleokapsidprotein als antigenetisches Hauptziel der frühen humanen Antikörperantwort dar. Deshalb ist das N-Protein als essentielles und wirksames Antigen für die Diagnostik einer Hantavirusinfektion von wesentlicher Bedeutung (Sjölander et al., 1997).

4.2 Einsatz und Bedeutung für die Diagnostik

Die Detektion von N – Antigen - spezifischem IgM bzw. IgG in Assays wurde bereits häufig beschrieben (Ivanow et al., 1996; Niklasson et al., 1988). Aufgrund der Biogefährlichkeit der Viren, dem schwierigen Umgang und dem für Arbeiten geforderten L3 - Sicherheitslabors stellt sich die Anzucht von nativem Antigen aber als extrem aufwendig dar. Außerdem zeigen Hantaviren, vor allem das Puumalavirus ein

sehr langsames Wachstum und eine nur geringe Produktion von Antigen in Zellkultur (Sjölander et al., 1997). Hier zeigt sich die Bedeutung der exprimierten rekombinanten N – Proteine. Denn seit Zöller et al. die Expression von rekombinanten PuumalaN – Protein in *E. coli* 1991 beschrieben haben, wurden zahlreiche Assays, die auf rekombinant erzeugtem Antigen basieren, veröffentlicht (Elgh et al., 1997; Kallio-Kokko et al., 1993; Zöller et al. 1990). Studien haben dabei belegt, dass die Spezifität und Sensitivität von Tests, unabhängig davon, ob sie auf nativen oder rekombinant erzeugten N – Proteinen basieren, vergleichbar sind (Sjölander et al., 1997; Kallio-Kokko et al., 2000).

In der akuten Phase einer Erkrankung sollte die klinische Diagnose immer durch Serologie oder PCR bestätigt werden. Deshalb werden rekombinant exprimierten N – Proteine in verschiedenen diagnostischen Verfahren zum Nachweis von spezifischen Antikörpern eingesetzt. Sie finden ihre Anwendung im Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und dem Immunoblot. Der ELISA basiert dabei auf nativen viralen Antigen oder rekombinanten Nukleokapsidprotein von Puumalavirus oder Hantaan (Schmaljohn et al., 1988; Groen et al., 1989; Niklasson et al., 1990). Eine weitere Methode zum Nachweis von Antikörpern gegen das Nukleokapsidantigen stellt der Immunoblot dar. Als Antigene werden dabei Zellysate von infizierten Zellen oder rekombinant erzeugte N – Proteine eingesetzt. Der Test wird vor allem als Bestätigungstest eingesetzt. IgG-Antikörper lassen sich mit der ELISA- und der IFT-Methode in rund 60% der Fälle nachweisen. Ferner wird wegen der kurzen Dauer der Virämie zeitlich begrenzt eine RT – PCR bzw. direkte Sequenzierung angewandt (Hörling et al., 1995; Plyusnin et al., 1997). Zur Unterscheidung nah verwandter Hantaviren kann ein Neutralisationstest als FRNT oder Plaque Reduktionstest eingesetzt werden (Hörling et al., 1992). Ein Standardverfahren in der Diagnostik stellt auch die Indirekte Immunfluoreszenz (IFT) dar. Dabei werden infizierte Zellen (Vero E6) als Antigene eingesetzt. Eine punktförmige bis amorphe zytoplasmatische Fluoreszenz, die hauptsächlich perinukleär angeordnet liegt, stellt dabei die spezifische Reaktion einer Hantavirusinfektion dar (Zöller und Zeier, 1990). Dabei sollten immer nicht infizierte Zellen als Kontrolle zur Abgrenzung gegen Autoimmunkrankheiten, bei denen Antikörper gegen zytoplasmatische Antigene vorhanden sein können, mitgeführt werden. Die IFT wird vor allem zum Nachweis von IgG-Antikörpern eingesetzt.

Puumalavirus RNA lässt sich nur in 10-20% in den ersten Tagen der Erkrankung durch eine RT-PCR aus Leukozyten oder Urin nachweisen (Hörlig et al., 1995; Valpahati et

al., 1996). Dagegen ist bei HPS Patienten virale RNA gut nachweisbar, auch bei HFRS ist eine RT-PCR meist erfolgreich. Dagegen ist eine Dobravavirus - Infektion durch RT-PCR nur in 40-50% der Fälle positiv. Generell ist aber zu beachten, dass die Dauer der Virämie in der akuten Phase relativ kurz ist, das also der Nachweis durch RT – PCR zeitlich limitiert ist (Hörling et al., 1995; Plyusnin et al., 1997).

Die Detektion der spezifischen Antikörper- Reaktion durch IFT oder ELISA stellt sich als sensitivste Nachweismethode einer Puumalavirus-Infektion dar. Dabei ist der ELISA aufgrund seiner Sensitivität, der Kapazität mit maximalem Probendurchlauf, sowie einer geringe Zeitdauer der Durchführung von wenigen Stunden und die Unabhängigkeit von subjektiven Einflüssen der IFT überlegen und stellt die Methode der Wahl zur Serodiagnostik einer Hantavirusinfektion dar (Sjölander et al., 1997).

4.3 Hat die Zunahme des Molekulargewichtes der exprimierten Proteine eine Änderung der Antigenität zur Folge?

Da die in meiner Arbeit exprimierten N – Proteine aufgrund der Klonierung in den pRSETB Vektor einen N – terminalen Überhang von etwa 48 Nukleotidtripletts haben, ist das resultierende Molekulargewicht der rekombinanten N - Proteine von 49.5kD auf 54.8 kD für PuumalaN und auf 54kD für DobravaN gegenüber den nativen Proteinen vergrößert. Deshalb ist die Frage zu stellen, ob die Abweichungen im Molekulargewicht einen Einfluß auf die Immunität haben. In sogenannten Epitop – Mappings mit monoklonalen Antikörpern (MABs) konnten mehrere verschiedene Antigenregionen auf dem PuumalaN – Protein gezeigt werden (Lundkvist et al., 1995; Valpahati et al., 1995), wobei die von den MABs als Antigen erkannten Bereiche zwischen verschiedenen Patienten noch variierten (Valpahati et al., 1995). Diese Erkenntnis führte zu der begründeten Annahme, dass kurze Peptide des PuumalaN – Proteins als serologische Nachweismethode dem „Volle Länge Protein“ unterlegen sind (Sjölander et al., 1997). Weitere Untersuchungen für Puumalavirus haben gezeigt, dass die N – terminale Abfolge von 120 Aminosäuren als Hauptepitop einer serologischen Reaktion anzusehen ist, wobei 3/4 der dort vorkommenden Epitope zwischen Aminosäure 1 - 79 zu finden sind (Valpahati et al., 1995; Lundkvist et al., 2002). Ein kreuzreagierendes Epitop konnte für PuumalaN zwischen AS 166 – 175 ermittelt werden, was die bei serologischen Nachweismethoden auftretende Kreuzreaktivität zwischen den

verschiedenen Virussubtypen erklären kann (Lundkvist et al., 1995). Weiter wurden auch serospezifische Epitope am Beispiel des PuuN - Proteins mit MABs untersucht, die zwischen Aminosäure 251 – 260 als der am meisten variablen Region zu liegen scheinen (Lundkvist et al., 1995).

Diese Erkenntnis aus den Untersuchungen mit Epitop – Mapping durch MABs lassen also annehmen, dass eine Verlängerung von N – Protein zu keiner wesentlichen Änderung des immunologischen Charakters führt. Eine Verkürzung würde allerdings durch eine Reduktion der antigenetischen Epitope möglicherweise zu einem Verlust der immunologischen Reaktivität führen.

4.4 Kreuzreaktivität der Hantavirusserotypen

Der Nachweis der Spezifität der erhaltenen Antikörper gegen das N – Protein der Stämme Puumalavirus und Dobravavirus mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen zeigte eine starke Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Hantavirussubtypen. Dabei erkannte der PuumalaN-Antikörper Antigeneigenschaften von Hantaanvirus, Dobravavirus und dem Sandfliegenvirus Typ Toskana. DobravaN – Antikörper kreuzreagierten mit den Antigenen Hantaanvirus, Dobravavirus und Seoulvirus stark, mit dem Puumalaantigen eher schwach. Die nach Boosterreaktion erhaltenen letzten Serumproben werden hier noch einmal im genannten Nachweisverfahren gezeigt, um die wesentlichen Unterschiede in der Reaktion zwischen Puumalavirus und Dobravavirus darzustellen.

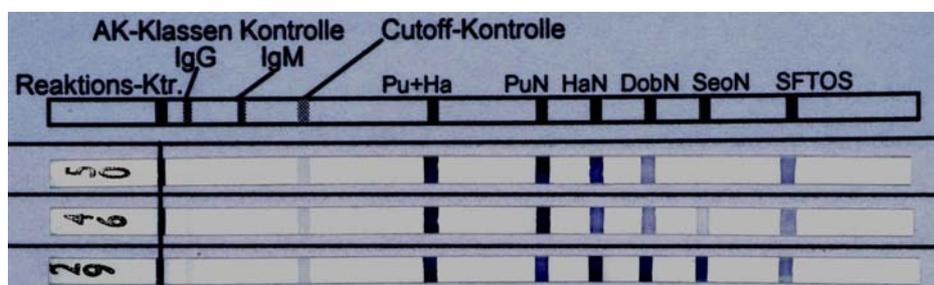


Abb. 27: Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen hantavirales N – Protein mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen

Testung der Antikörper gegen Puumala- und DobravaN-Protein der Final Bleeds nach wiederholter Booster-Reaktion.

50 – PuuN 1, final bleed, 1:100

46 - PuuN 3, final bleed, 1:100

29 - DobN, final bleed, 1:100

Die Antikörper gegen PuumalaN1 reagieren stark kreuz mit Puumala und Hantaan als Antigenkombination und mit Hantaan, eher schwach mit Dobrava und SFTOS. Antikörper gegen PuumalaN3 entsprechen in ihrer Reaktion den PuumalaN1 – Antikörpern, lassen aber zusätzlich eine Reaktion mit SEO als Antigen erkennen. DobravaN – Antikörper reagieren stark mit den Antigenen Puumala und Hantaan als Kombination, Puumala, Hantaan, Dobrava und Seoul und eher schwach mit SFTOS.

Bei der Diagnosestellung einer Hantavirusinfektion muß der hohe Grad an Kreuzreaktivität der Antikörper der verschiedenen Serotypen beachtet werden (Lundkvist et al., 1997). Da die IgG Fraktion beim Einsetzen der Krankheits Symptome noch nicht bzw. gering vorhanden ist, geht ein Teil der Forscher davon aus, dass die Kreuzreaktivität IgM vermittelt ist (Carvalho Nicacio et al., 2000). Andere Autoren gehen allerdings davon aus, dass die Kreuzreaktivität gegen die N – Proteine in der akuten Phase und damit für die IgM- Antikörper am schwächsten ist (Valpahati et al., 1996). Dieser zweiten Annahme entspricht die in Bild 25 dargestellt IgG vermittelte Kreuzreaktivität. Aufgrund der Vermutung der IgM vermittelten Kreuzreaktivität, muß überlegt werden, ob Serum des ersten Monats der Erkrankung überhaupt zur Serotypisierung eingesetzt werden sollte. In späten Konvaleszenzseren findet sich eine große Spezifität für den jeweiligen Serotyp (Carvalho Nicacio et al., 2000).

In den schon angeführten Epitop Mappings mit MABs konnte für PuumalaN ein kreuzreagierendes Epitop zwischen Aminosäure 166 – 175 erkannt werden (Lundkvist et al., 1995). Die Kreuzreaktivität scheint vor allem innerhalb der Virusgruppen sehr hoch zu sein, die durch Murinae (HTNV, SEOV, DOBV), durch Arvicolinae (PUUV, PHV, TULV, TOPV) oder durch Sigmodontinae (SNV, AND-like virus) übertragen werden (Chu et al., 1994). Durchgeführte Sequenzierungen haben für das N – Protein Aminosäurehomologien der verschiedenen Gruppen aufgezeigt, die zwischen 58 und 76% und innerhalb einer Gruppe bei über 79% liegen (Kallio-Kokko et al., 2000). Die serologische Kreuzreaktivität spiegelt also sehr gut die Aminosäurehomologien wieder.

Hantaan	MATMEELQRE AVSIQAKIDE	INAHEGQLVI	ARQKVRDAEK	QYEKDPDELN	KRTLTDREGV
Dobrava	MATLEELQKE AQSIQGKIDE	INSHEGQLVI	ARQKVKDAEK	QYEKDPDDLN	KRALSDRESI
Puumala	<u>MSDLTDIQED</u> VSALEDKLAD	<u>ITRHEQQLIV</u>	<u>ARQKLKDAER</u>	<u>AVEVDPDDVN</u>	<u>KNTLQARQQT</u>
	60				
Hantaan	LKRQLADRIA EPTGQTADWL	TGKNLGKEQD	PTGVEPGDHL	KERSMLSYGN	VLDLNHLDID
Dobrava	LRRQLADRVA EPTGQTADWL	AGKNIGKERD	PTGLDPGDHL	KEKSMLSYGN	VIDLNHLDID
Puumala	<u>YKRRMADAVS</u> <u>EPSGQTADWY</u>	<u>RKKMDTKPTD</u>	<u>PTGIEPDDHL</u>	<u>KERSSLR YGN</u>	<u>VLDVNAIDIE</u>
	120				
Hantaan	SIIVYLTSFV IRKPKHLYVS	VPILLKALYM	LTTRGRQTTK	DNKGTRIRFK	DDSSFEDVNG
Dobrava	SIVIYLSFV IRKPKHLFLS	VPILLKALYM	LTTRGRQTTK	DNKGMRIRFK	DDSSFEDVNG
Puumala	<u>TIGVYVIGFT</u> <u>IRRPKHL YVS</u>	<u>LPILLKALYM</u>	<u>LSTRGROTVK</u>	<u>ENKGTRIRFK</u>	<u>DDTSFEEDING</u>
	180				
Hantaan	LPNAQSSMKA DWSDRIEQWL	EEITPGRYRT	AVCGLYPAQI	KARQMISPM	SVIGFLALAK
Dobrava	MPNAQSSMKA NWTERVEEWL	DEITPGRFRT	VACGLYPAQV	KARNLISPM	SVIGFLTLAK
Puumala	<u>MPTAQSTMKA</u> <u>DWSERIREFM</u>	<u>EELTPGRFRT</u>	<u>IVCGLFPTQI</u>	<u>QVRNIMSPM</u>	<u>GVIGFSFFVK</u>
	240				
Hantaan	IPECKLLPDT AGCSMIEDIE	AAVSLGGPA	TNRDYLQRQ	VALGNMETKE	SKAIRQHAEA
Dobrava	LPCCKLLSEPS GCNIIDHID*	PTSLTKGPST	NRDYLQRQG	ALAKMETKEA	QVVRKHAIDA
Puumala	<u>EKECPFIPKE</u> <u>YAASGDPTSP</u>	<u>VKPGTPAQEI</u>	<u>EMLKRNIYF</u>	<u>MQRQDVLDKN</u>	<u>HVADIDKLID</u>
	300				
Hantaan	SPSSIWVFAG SEEKLRKKSS	APDRCPPTCL	FIAGIAELGA	FFSILQDMRN	TIMASKTVGT
Dobrava	SPSSIWVFAG SEEKLRKKSS	APDRCPPTCL	FIAGMAELGA	FFAVLQDMRN	TIMASKTIGT
Puumala	<u>DNIDSPNAPW</u> <u>VGTAEEKLK</u>	<u>VFACAPDRCP</u>	<u>PTCIYVAGMA</u>	<u>ELGAFFSILQ</u>	<u>DMRNTIMASKT</u>
	360				
Hantaan	FYQSYLRRQT QSLIDVKVKE	SMGIQLGQRI	IVLFMVAWG	EAVDNFHLGD	DMDPELRTLA

Dobrava	FYQSYLRRTQ	SMGIQLDQRI	IVLFMIEWGK	EAVDSFHLGD	DMDPEIRSLA
	QALIDQKVKE				
Puumala	KKSSFYQSYL	RRTQSMGIQL	DQRILLFML	EWGKEMVDHF	HLGDDMDPEL
	RGLAQALIDQ				

Hantaan ISNQEPLKL 429
Dobrava ISNQEPLKL 429
Puumala KVKEISNQEP LKI 433

Abb. 28:

Vergleich der Aminosäureabfolgen von Hantaan, Dobrava/ Saarema/ 160V/N und PuumalaN/ Sotkamo/ V – 2969/81

Die Aminosäuren, die sich in allen 3 Subtypen entsprechen sind markiert. Dabei ist zu beobachten, dass sich vor allem innerhalb der ersten 240 AS eine starke Homologie zeigt (etwa 50%). Dies entspricht der Annahme, dass die antigenetischen Hauptepitope innerhalb der ersten 120 AS zu finden sind (Valpahati et al., 1995) (45% Homologie im Vergleich). Da sich die Virustypen in diesem Bereich sehr ähnlich sind, lässt sich damit auch die starke Kreuzreaktivität erklären. Außerdem wurde für PuumalaN ein kreuzreagierendes Epitop zwischen AS 166 – 175 ermittelt (Lundkvist et al., 1995), und wie der Vergleich zeigt, liegt die Homologie der Aminosäuren bei 66.6%.

Serospezifische Epitope wurden von Lundkvist und Mitarbeitern 1995 zwischen Aminosäure 251 – 260 als variabelster Region für das PuumalaN – Protein definiert. Die Variabilität stellt sich im Sequenzvergleich aber für den gesamten Bereich zwischen Aminosäure 240 – 300 als sehr hoch dar. Es lässt sich deshalb die Frage stellen, ob möglicherweise 2 Antigene (z.B. DOBV und PUUV) für eine effiziente serologische Diagnostik in Europa ausreichen würden. Denn die Kreuzreaktivität innerhalb der Virusgruppen deckt den serologischen Nachweis einer Infektion ab, zumal Puumalavirus und Dobravavirus bis zum heutigen Zeitpunkt die einzig bekannten pathogenen Hantaviren in Europa sind (Kallio-Kokko et al., 2000). Diese Überlegung spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass kommerziell erhältliche Nachweismethoden zur Hantavirusdiagnostik zum Teil nur auf Puumalavirus und Hantaanvirus Antigenen basieren (Sjölander et al., 2000).

4.5 Aminosäureaustausch innerhalb der exprimierten Proteine

In den Abbildungen 21 und 22 im Ergebnisteil wurde gezeigt, dass sich die exprimierten Proteine in einigen Aminosäuren von der Originalsequenz unterscheiden.

Es ist deshalb die Frage zu stellen, ob diese Änderungen Einfluß auf den resultierenden Proteincharakter haben. Die beiden PuumalaN Klone erfahren an der 27. Aminosäure einen Austausch einer Glutaminsäure durch eine Asparaginsäure. Da beide Aminosäuren einen sauren Charakter aufweisen, ist diese Änderung eher zu vernachlässigen. An der 142. Aminosäure ist bei Klon 3 statt des Serins der Originalsequenz ein Prolin vorzufinden, das heißt eine ungeladene polare Aminosäure wird durch eine unpolare ausgetauscht. Dies ist einer Zunahme der Hydrophobie gleichzusetzen, die Löslichkeit ist eventuell dadurch herabgesetzt.

Puumala Klon 1 erfährt an Stelle 275 einen Austausch einer Asparaginsäure durch ein neutrales Asparagin, das heißt hier ist eine Verminderung des sauren Charakters zu erwarten. Der DobravaN Klon weist eine Änderung an der 122. Aminosäure auf, an der ein Isoleucin als unpolare Aminosäure durch ein Threonin mit ungeladenen polaren Charakter ausgetauscht wurde. Möglicherweise wird dadurch die Hydrophilie erhöht. An der 283. Stelle wird ein Valin gegen ein Alanin ausgetauscht, da beide Aminosäuren polare Eigenschaften zeigen, ist diese Änderung als gering einzuschätzen. An der 356. Position ist ein basisches Arginin gegen ein unpolares Glycin getauscht, was die Löslichkeit also möglicherweise herabsetzt. An der 359. Aminosäurenstelle besteht ein Austausch eines unpolaren Phenylalanins gegen ein ungeladenes polares Serin, was wiederum die Löslichkeit des resultierenden Proteins erhöht. Zusammenfassend ist für das DobravaN Protein, wenn überhaupt, eine geringe Änderung im Sinne einer Zunahme der Hydrophilie zu erkennen, d. h. eine Zunahme der Löslichkeit zu erwarten.

Es lässt sich diskutieren, ob die zahlenmäßig geringen Austausche überhaupt Einfluß auf den Proteincharakter haben. Die erzeugten Antikörper erkennen im recom Line Bunyavirustest die dargestellten Antigene, was eine bedeutsame Änderung des Proteincharakters ausschließen lässt. Allerdings ist im in Abb. 25 bzw. 27 gezeigten recom Line Bunyavirustest zum Nachweis der Spezifität der erzeugten Antikörper eine Kreuzreaktivität des PuumalaN 3 Klons gegen das Seoulvirus als Antigen zu erkennen, die beim PuumalaN 1 Klon nicht zu beobachten ist. Das führt zu der möglichen Annahme, dass die geringen Änderungen der Aminosäuresequenz doch eine Änderung in den antigenetischen Epitopen der Proteine erzeugt haben. Da die antigenetischen Epitope vor allem innerhalb der ersten 120 Aminosäuren zu erwarten sind, ist der Austausch im PuumalaN Klon 3 möglicherweise als Änderung im Sinne einer Erhöhung der Kreuzreaktivität gegenüber Antigeneigenschaften des Seoulvirus zu deuten. Eher

scheint diese Reaktion aber auf höhere Antikörper – Titer zurückzuführen zu sein. Die Änderung des PuumalaN Klon1 an der 275. Stelle scheint vernachlässigbar zu sein.

4.6 Vakzination

Schon lange versuchen Forschungsgruppen aus der ganzen Welt einen zuverlässigen Impfstoff gegen Hantaviren zu etablieren. Das HFRS zeigt trotz intensivmedizinischer Anstrengung immer noch eine Mortalität von bis zu 15 %. Dieses Wissen treibt die Bemühungen um die Entwicklung von Vakzinen voran. Verschiedene Ansätze sind dabei unternommen worden. Schon 1990 wurde von C. Schmaljohn et al. postuliert, dass Antikörper gegen G1- und G2 – Proteine (M – Segment) einen Schutz vor Infektion leisten. Die Vakzination von Hamstern mit einem Plasmid, das das Seoul M Gen exprimiert, induzierte nach Inokulation in die Epidermis bzw. intramuskuläre Gabe in den Musculus gastrocnemicus die Bildung neutralisierender Antikörper. Die Tiere wurden anschließend 28 Tagen nach Immunisierung intramuskulär mit Seoul – und Hantaanvirus infiziert, sie waren aber durch vorangegangene Vakzination geschützt und eine Infektion konnte nicht nachgewiesen werden (Hooper et al., 2001).

Ein ähnlicher Versuch wurde mit einem Plasmid, das das M – Segment von Hantaanvirus exprimiert, unternommen. Dazu wurde den Hamstern das HantaanM – Expressionsplasmid in gleicher Weise verabreicht und die Tiere anschließend mit Hantaan -, Seoul – und Dobravavirus durch intramuskuläre Gabe infiziert. Auch in diesem Versuch blieb eine Infektion der Tiere aus (Hooper et al., 2001). Beide Versuche wurden schließlich bei Rhesusaffen angewandt mit dem Ergebnis, dass hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern erreicht wurden. Dieser Versuch liefert die ersten immunologischen Daten einer Vakzine zum Schutz von Primaten vor Hantavirus - Infektionen und führt zu der Annahme, dass das Hantavirus M – Gen zur Impfung von Menschen herangezogen werden kann (Hooper et al., 2001).

Die starke Antigeneigenschaft des hantaviralen N – Proteins führte zu der Überlegung, ob eine Vakzination durch Gabe von nativen oder rekombinant exprimierten N – Protein möglich ist. In einem Tiermodell, bestehend aus einer Kolonie des natürlichen Wirtstieres, wurden diese mit rekombinanten Puumala N – Protein bzw. mit einem N – terminalen Fragmenten (AS 1-118) von N – Protein, beide exprimiert in E.coli, immunisiert. Danach wurden sie einer infektiösen Dosis von Puumalavirus ausgesetzt. Klinisch und serologisch ergab sich kein Anhalt für eine Infektion, die sich wegen des

asymptomatischen Verlaufes im natürlichen Wirtstier durch das Auftreten von PuumalavirusN – Antigen bzw. von spezifischen Antikörpern gegen die Glykoproteinen G1 und G2 zeigen würden. Immunisierte man Tiere allerdings mit kürzeren N – terminalen Fragmenten, so wiesen 25% der Population entweder ein durch PCR nachweisbares N – Antigen oder spezifische Antikörper gegen die Glykoproteine auf (Lundkvist et al., 1996).

Eine Vakzination mit der cDNA des S – Segmentes, als Expressionseinheit in ein Plasmid kloniert, zeigte, dass sich 6 bis 11 Wochen nach i.m. Injektion von 50 µg der Plasmid - DNA in jeden M. tibialis anterior von Mäusen eine Antikörperantwort ausbildete. Analysen ergaben, dass die Antikörper mit sämtlichen Epitopen des Nukleokapsidproteins reagierten. Aufgrund dieser Epitopspezifität scheint die DNA – Vakzination der immunologischen Reaktion einer natürlichen Infektion zu gleichen (Koletzki et al., 2001).

Nachdem eine effiziente Immunität durch Verabreichung von N – Protein in verschiedenen Tiermodellen bestätigt wurde, wurde in einem weiteren Versuch geprüft, ob sich durch Immunisierung mit einem Subtypen eine Kreuzprotektion vor Infektion mit einem anderen Stamm ergibt. Dafür wurden natürliche Wirtstiere dreimal mit je 50µg des aufgereinigten rekombinanten N – Proteins von Puumala -, Topografov -, Andes-, und Dobravavirus immunisiert. Die Tiere wurden 3 Wochen später mit 20-50% der infektiösen Dosis des Wildtyps von Puumalavirus subcutan infiziert. Da keine klinischen Anzeichen einer floriden Infektion zu erwarten waren, wurden die Tiere 3 Wochen nach Virusverabreichung getötet und deren Lungen mit der RT-PCR auf die Anwesenheit von PuumalavirusN - RNA und mit ELISA auf PuumalavirusN – Antigen überprüft. Weder RNA noch Antigen konnten in den 16 Tieren nachgewiesen werden, die vorher mit Puumala und Topografov immunisiert wurden. Bei einem Teil der mit Andesvirus und Dobravavirus immunisierten Tiere konnte virale RNA nachgewiesen werden, bei Dobrava zusätzlich auch virales Antigen. Die rekombinanten N – Proteine scheinen also zu einem gewissen Grade eine Kreuzprotektion vermitteln zu können (Carvalho Nicacio et al., 2002).

Virusvektoren die das S – und M – Segment von Hantaanvirus exprimierten wurden in einem weiteren Versuch als Vakzin zur Immunisierung durch intramuskuläre Gabe in Hamstern verwendet. Nach 30 Tagen wurden die Tiere mit Hantaan -, Seoul -, und Puumalavirus infiziert und nach verschiedenen Zeiten das Vorhandensein von viruspezifischer RNA bzw. viralen Antigen in Lunge und Nieren überprüft. So zeigte

sich für die mit Hantaanvirus und Seoulvirus infizierten Hamster, dass weder virales Antigen noch RNA vorhanden war. In den Organen der mit Puumalavirus infizierten Tiere konnte allerdings virusspezifische RNA nachgewiesen werden. Die Hamster wurden demnach nicht durch das eingesetzte Vakzin vor einer Infektion mit Puumalavirus geschützt (Chu et al., 1995). Umgekehrt wurde in einem ähnlichen Versuch gezeigt, dass nach Immunisierung von Tieren mit Puumala- und Prospect Hillvirus ein begrenzter Schutz vor einer Infektion mit Hantaanvirus erreicht werden kann (Asada et al., 1988).

Ein weiterer Ansatz ist die Herstellung eines inaktivierten Hantavirus zur aktiven Immunisierung. So sprach die WHO 1984 die Empfehlung aus, möglichst schnell einen effektiven inaktivierten Impfstoff gegen das HFRS herzustellen. Daraufhin entwickelte die Forschergruppe um Lee das sogenannte Hantavax. Dieses wird als Hantaanvirus aus Gehirnen von Mäusen, in denen das Virus wächst, gewonnen und anschließend mit Formalin inaktiviert. Der Impfstoff ist in Korea zugelassen. In einer Studie wurden 64 Patienten untersucht, die eine zweimalige intramuskuläre Gabe von Hantavax im Abstand von einem Monat erhalten hatten. Serumproben wurden am Tag der Impfung, nach 30 Tagen und nach einem Jahr entnommen und mit dem ELISA – und Immunfluoreszenz - Verfahren auf IgG spezifische Antikörper untersucht. 30 Tage nach der Vakzination zeigten dabei bis zu 79% der getesteten Personen eine Antikörperantwort, nach der 1. Boosterreaktion erhöhte sich der Anteil der Patienten auf 97%. Allerdings waren nach einem Jahr nur noch bei 43 % der Testpersonen Antikörpertiter nachzuweisen, es wurde also keine langanhaltende humorale Immunantwort erreicht. Die Studie bestätigte außerdem die gute Verträglichkeit von Hantavax aufgrund der geringen Nebenwirkungen, und der Einsatz wird heute in Endemiegebieten als zweimalige Gabe innerhalb eines Monats und Boosterdosis nach 13 Monaten empfohlen. Nachdem 1991 damit eine Impfkampagne in Korea gestartet wurde sind die Erkrankungsfälle für das HFRS deutlich gesunken (Cho et al., 2002).

Die Idee der Herstellung eines aktiven Impfstoffes wurde auch von einer anderen Forschergruppe umgesetzt. Sie isolierten Hantaanvirus aus Vero E6 Zellen, reinigten es über Ultrafiltration und Zentrifugation über einen Dichtegradient auf und inaktivierten das Virus anschließend mit Formaldehyd. Die immunogenen Eigenschaften des Vakzins wurden im Vergleich mit Hantavax geprüft. So konnte im Mausversuch eine 5fach höhere neutralisierende Aktivität der Antikörper als bei Hantavax gezeigt werden, was also möglicherweise eine effektivere Immunität erzeugt (Choi et al., 2003).

Eine Forschergruppe aus China entwickelte 2002 18 anti – Hantaanvirus - neutralisierende MABs zur Behandlung und Prävention von Hantaanvirusinfektion. Davon waren 13 gegen das N – Protein, 4 gegen das G2 – Protein und 1 MAB gegen N- und G2 – Protein gerichtet. Es zeigte sich *in vitro*, dass nur die MABs, die das G2 - Protein erkannten, virusneutralisierende Eigenschaften besitzen. Im Mausversuch induzierten ebenfalls nur die gegen G2-Protein gerichteten MABs die Induktion eines Schutzes vor Infektion. Alle Mäuse waren nach Gabe dieser MABs ein Tag vor sowie zwei Tage nach Exposition mit Hantaanvirus vor einer Infektion geschützt. Sie scheinen also zur Prä – und Postexpositionsprophylaxe und zur Immuntherapie bei Hantaanvirusinfizierten Patienten geeignet zu sein. Klinische Studien werden dazu in endemischen Gebieten Chinas bereits betrieben (Xu et al., 2002).

Eine relativ neue Idee einer Vakzination durch transgene Pflanzen verwirklichte eine Gruppe der Kinderklinik aus Dresden. Sie etablierten die Expression des Puumalavirus N – Proteins (AS 1-182) in Tabak- und Kartoffelpflanzen. Nach der Herstellung eines rekombinanten Vektors, der für das PuumalaS – Segment codierte, wurde dieser Agrobakterien transformiert. Durch anschließende Kokultivierung mit Blätteranteilen der Tabakpflanze bzw. Inokulation des Plasmids in Wurzelanteile der Kartoffelpflanze konnte die Transformation des Expressionsplasmids in die Zielpflanze erreicht werden. Nach deren Kultivierung und Wachstum konnte durch PCR die Anwesenheit des PuumalaS – Genoms und durch Immunoblot das Vorhandensein von PuumalaN – Protein in der nun transgenen Pflanze bestätigt werden. Dabei unterschieden sich die transgenen Pflanzen in Phänotyp und Wachstumsrate nur unwesentlich von den natürlichen Pflanzen und produzierten in den Blättern, Kartoffeln auch in Wurzel und Knolle das N – Protein. Nach intraperitonealer bzw. intramuskulärer Gabe von Extrakten, die aus den Blättern der jeweiligen Pflanze gewonnen wurde, induzierten die rekombinanten Proteine eine spezifische humorale und mukosale Immunantwort in Kaninchen. Damit konnte eine billige und kontaminationsarme Methode der Vakzination entwickelt werden, die vor allem in Zukunft von ökonomischen Interesse sein wird (Kkattak et al., 2002).

4.7 Zukunftsaussichten

Die genetische Struktur der Hantaviren ist entschlüsselt und sogar das L – Segment, das lange Zeit noch unbekannt war ist mittlerweile von einer chinesischen Gruppe charakterisiert worden (Zhonghua et al., 2001). Trotzdem sind die molekularen Mechanismen der Virusreplikation noch weitgehend unverstanden. Es existiert bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein Reverse Genetic System, um als In-Vitro-Replikationsmodell eine Identifikation und Analyse funktioneller Elemente auf Nukleinsäure- und Proteinebene zu ermöglichen. Die Schaffung eines solchen Modells würde einen entscheidenden Fortschritt in der Hantavirusforschung darstellen.

In der Diagnostik ist mit den bestehenden Assays eine effiziente und zuverlässige Identifikation einer Hantavirusinfektion gesichert. Allerdings ist bei der Unterscheidung der verschiedenen Virussubtypen die Kreuzreaktivität zu beachten.

Die genetische Information der verschiedenen RNA – Segmente sind bekannt, allerdings fehlen noch Informationen über die detaillierten Funktionen der verschiedenen Proteine.

Die spezifische Immunisierung gegen eine Hantavirusinfektion ist vor dem Hintergrund der gleichbleibenden hohen Mortalität des HFRS von besonderem Interesse. Neue Forschungsansätze bzw. die Verbesserung der bestehenden Methoden sind nötig, um in Zukunft ein effizientes Modell einer Immunisierung etablieren zu können. Auch müssen im europäischen Raum epidemiologische Daten über die Inzidenz und Prävalenz von Hantavirusinfektionen durch ein breiteres Screening erweitert werden. Die hier vorgelegten Ergebnisse stellen die Grundlage dafür dar, Untersuchungen menschlicher Seren kosteneffektiv mit den für Mitteleuropa relevanten Hantavirus – Antigenen durchzuführen und sind außerdem als erster Schritt auf dem Weg zur Etablierung eines Reverse Genetic Systems für Hantaviren zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Hantaviren sind infektiöse Ursache des Hämorrhagischen Fiebers mit Renalem Syndrom (HFRS), des Hantavirus Pulmonary Syndrome (HPS) und der Nephropathia epidemica (NE). Aufgrund der Pathogenität der Viren und einer gleichbleibend hohen Mortalität, vor allem des HFRS und HPS ist die Entwicklung einer Immunisierung von besonderem Interesse. Vor allem das hantavirale N-Protein (Nukleokapsidprotein), codiert durch das S-Segment stellt sich als antigenetische Hauptziel der humoralen Immunität dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Virusanzucht der beiden Hantavirusstämme Puumala und Dobrava RNA extrahiert und durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt. Die cDNA wurde anschließend in den pCR2.1-TOPO Vektor der Fa. Invitrogen kloniert und nachfolgend in den pRSETB-Vektor der gleichen Firma, einem bakteriellen Expressionsvektor umklont. Dadurch erhielt man die beiden rekombinierten Plasmide pRSETBPuumalaN und pRSETBDobravaN als Grundlage für eine bakterielle Expression der beiden hantaviralen N-Proteine. Nach der Proteinexpression in kompetenten BL21DE₃-Bakterien wurden die Proteine durch die immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt und anschließend an die Fa. Eurogentec/ Belgien verschickt. Dort wurde durch Injektion in Kaninchen eine Antikörperproduktion erreicht. Die erhaltenen polyklonalen Antikörper anti-PuumalaN-Antikörper (IgG) und anti-DobravaN-Antikörper (IgG) wurden im recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen und im Western Blot getestet. Sie stehen jetzt für weitere Untersuchungen mit Hantavirusantigenen als molekulare Werkzeuge zur Verfügung und stellen Grundlage auf dem weiteren Weg zur Etablierung eines Reverse Genetic Systems für Hantaviren dar.

6. Literaturverzeichnis

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, R., Watson, J.D. (1995).
Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage

Alexeyev, O.A., Ahlm, C., Billheden, J., Settergren, B., Wadell, G., Juto, P. (1994).
Elevated levels of total and Puumala virus specific immunoglobuline E in the
Scandinavian type of hemorrhagic fever with renal syndrome. Clin Diagn Lab Immunol
1, 269-272

Antonidas, A., LeDuc, J.W., Daniel-Alexiou, S. (1987).
Clinical and epidemiological aspects of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS)
in Greece. Eur J Epidemiol 3, 295-301

Araki, A., Yoshimatsu, K., Ogino, M., Ebihara, H., Lundkvist, A., Kariwa, H.,
Takashima, I., Arikawa, J. (2001). Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for
seotyping Hantaan, Seoul and Dobrava hantavirus infections. J Clin Microbiol 39,
2397-404

Arikawa, J., Schmaljohn, A.L., Dalrymple, J.M., Schmaljohn, C.S. (1989).
Characterisation of Hantaan virus envelope glycoprotein antigenic determinants defined
by monoclonal antibodies. J Gen Virol 70, 615-24

Arnold, O.H. (1944). Die sogenannte Feldnephritis: klinische Studien zur
Symptomologie, Pathologie und Artologie einer akuten diffusen Gefässerkrankung
infektiöser Genese. Thieme, Leipzig

Asada, H., Balachandra, K., Tamura, M., Kondo, K., Yamanishi, K. (1988). Cross-
reactive immunity among different serotypes of virus causing hemorrhagic fever with
renal syndrome. J Gen Virol 70, 819-25

Bradford, J.R. (1916). Nephritis in the british troops in flanders. Q J Med 9, 445-459

Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Hovi, T., von Bonsdorff, C.H., Vuorimies, J., Manni, T., Penttinen, K., Oker-Blom, N., Lähdevirta, J. (1980). Nephropathia epidemica: Detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infections. *J Infect Dis* 141, 131-134

Brus Sjölander, K., Elgh, F., Kallio-Kokko, H., Valpahati, O., Hägglund, M., Palmcrantz, V., Juto, P., Vaheri, A., Niklasson, B., Lundkvist, A. (1997). Evaluation of serological methods for diagnosis of puumala hantavirus infection (Nephropathia epidemica). *J Clin Microbiol* 35, 3264-3268

Brus Sjölander, K., Lundkvist, A. (1999). Dobrava virus infection: serological diagnosis and cross – reaction other hantaviruses. *J Virol Meth* 80, 137-143

Brus Sjölander, K., Golovljova, I., Plyusnin, A., Lundkvist, A. (2000). Diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *J Clin Microbiol* 38, 2324-2329

Carvalho Nicacio, C., Lundkvist, A., Sjölander, K., Plyusnin, A. (2000). A neutralizing recombinant human antibody Fab fragment against Puumala hantavirus. *J Med Virol* 60, 446-54

Carvalho Nicacio, C., Gonzalez Della Valle, M., Padula, P., Björling, E., Plyusnin, A., Lundkvist, A. (2002). Cross-protection against challenge with Puumala virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses. *J Virol* 76, 6669-77

Casals, J., Henderson, B.E., Hoogstraal, H., Johnson, K.M., Shelokov, A. (1970). A review of Soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. *J Infect Dis* 122, 437-453

Chen, H.X., Qiu, F.X., Dong, B., Li, Y.T., Wang, Y., Wang, H.M., Zuo, G.F., Tao, X., Gao, S. (1986). Epidemiological studies on hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *J Infect Dis* 154, 394-398

Chen, H., Tang, L., Luo, L., Zhang, J., Hu, M., Wenig, J., Liu, W. (2000). Preventive effects of three kinds of inactive vaccines against epidemic hemorrhagic fever after 5 years of vaccination. Article in chinese

Cho, H.W., Howard, C.R., Lee, H.W. (2002). Review of an inactivated vaccine against hantavirus. *Intervirology* 45, 328-33

Choi, Y., Ahn, C.J., Seong, K.M., Jung, M.Y., Ahn, B.Y. (2003). Inactivated Hantaan virus vaccine derived from suspension culture of Vero cells. *Vaccine* 21, 1867-73

Chu, Y.K., Rossi, C., LeDuc, J.W., Lee, H.W., Schmaljohn, C.S., Dalrymple, J.M. (1994). Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *Virology* 198, 196-204

Chu, Y.K., Jennings, G.B., Schmaljohn, C.S. (1995). A Vaccinia Virus-Vectored Hantaan Virus Vaccine protects hamsters from challenge with Hantaan and Seoul Viruses but not Puumala virus. *J Virol* 69, 6417-6423

Dargeviciute, A., Brus Sjolander, K., Sasnauskas, K., Kruger, D.H., Meisel, H., Ulrich, R., Lundkvist, A. (2002). Yeast-expressed Puumala hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. *Vaccine* 20, 3523-31

Duchin, J.S., Koster, F.T., Peters, C.J., Simpson, G.L., Hantavirus study Group (1994). Hantavirus pulmonary syndrome: a clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *N Engl J. Med* 330, 949-955

Elgh, F., Wadell, G., Juto, P. (1995). Comparison of the kinetics of Puumala virus specific IgM and IgG antibody responses in nephropathia epidemica as measured by recombinant antigen – based enzyme – linked immunosorbent assay and an immunofluorescence test. *J Med Virol* 45, 146 - 150

Elgh, F., Linderholm, M., Wadell, G., Jutö, P. (1996). The clinical usefulness of a Puumalavirus recombinant nucleocapsid protein based enzyme-linked immunosorbent

assay in the diagnosis of nephropathia epidemica as compared with an immunofluorescence assay. *Clinical and Diagnostic Virology* 6, 17-26

Elgh, F., Lundkvist, A., Alexeyev, O., Stenlund, H., Avsic – Zupanc, T., Hjelle, B., Lee, H.W., Smith, K.J., Vainionpää, R., Wiger, D., Wadell, G., Juto, P. (1997). Serological diagnosis of hantavirus infections by enzym-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *J Clin Microbiol* 35, 1122-1130

Elliott, R.M. (1990). Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol* 71, 501-502

Fields (4. Auflage). *Virology*

Gajdusek, D.C. (1956). Das Epidemische Hämorrhagische Fieber. *Klin. Wochenschrift*, 34. Jahrgang, 29./ 30. Heft, 769-777

Gajdusek, D.C., Goldgraber, D., Millard, E. (1983). Bibliography of hemorrhagic fever with renal syndrome (muroid virus nephropathy). U.S Dept. of Health and Human Services. N.I.H., Bethesda, Maryland publication No. 83-2603

Gavrilovskaya, I.N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M.H., Mackow, E.R. (1998). Beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7074-7079

Gavrilovskaya, I.N., Brown, E.J., Ginsberg, M.H., Mackow, E.R. (1999). Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol* 73, 3951-3959

Gavrilovskaya, I.N., Peresleni, T., Geimonen, E., Mackow, E.R. (2002). Pathogenic hantaviruses selectively inhibit beta 3 inetgrin directed endothelial cell migration. *Arch Virol* 147, 1913-31

Geimonen, E., Neff, S., Raymond, T., Kocer, S.S., Gavrillovskaya, I.N., Mackow, E.R. (2002). Pathogenic and nonpathogenic hantaviruses differentially regulate endothelial cell responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13837-42

Goldsmith, C.S., Elliott, L.H., Peters, C.J., Zaki, S.R. (1995). Ultrastructural characteristics of Sin Nombre virus, causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Arch Virol* 140, 2107-2122

Groen, J., Groen, G.v.D., Hoofd, G., G. and A. Osterhaus (1989). Comparison of immunofluorescence and enzym-linked immunosorbent assay for the serology of Hantaan virus infections. *J Virol Meth* 23, 195-203

Groen, J., van der Groen, G., Hoofd, G., Osterhaus, A. (1989). Comparison of immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays for the serology of Hantaan virus infections. *J Virol Meth* 23, 195-203

Hjelle, B. (2002). Center of Emerging Infectious Diseases, Departement of Pathology, University of New Mexico School of Medicine, Albusquerque, USA . Vaccines against hantaviruses. *Expert Rev Vaccines* 1, 373-84

Hof, H., Müller, R.L., Dörries, R. (2000). *Mikrobiologie*

Hooper, J.W., Custer, D.M., Thompson, E., Schmaljohn, C.S. (2001). DNA Vaccination with the Hantaan Virus M Gene protects hamsters against three of four HFRS Hantaviruses and elicits a high-titer neutralization antibody response in rhesus monkeys. *J Virol* 75, 8469-8477

Hortling, H. (1944). Leptospirosista muistuttava epidemia Lapissa. *Sotilaslääk Aikak* 19, 8-19

Hörling, J., Lundkvist, A., Huggins, J.W., Niklasson, B. (1992). Antibodies to Puumala virus in humans determined by neutralization test. *J Virol Meth* 39, 139-147

Hörling, J., Lundkvist, A., Persson, K., Mullart, M., Dzagurova, T., Dekonenko, A., Tkachenko, E., Niklasson, B. (1995). Detection and subsequent sequencing of Puumala virus from human specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 33, 277-282

Huggins, J.W., Hsiang, C.M., Cosgriff, T.M., Guang, M.Y., Smith, J.I. (1991). Prospective, double-blind, concurrent, placebo-controlled clinical trial of intravenous ribavirin therapy of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 164, 1119-1127

Hughes, J.M., Peters, C.J., Cohen, M.L., Mahy, B.W. (1993). Hantavirus pulmonary syndrome: an emerging infectious disease. *Science* 262, 850-851

Hung, T. (1988). Atlas of hemorrhagic fever with renal syndrome. Beijing Press, Beijing

Ivanow, A.P., Tkachenko, E.A., Petrov, V.A. (1988). Enzym immuno assay for the detection of virus specific IgG and IgM antibody in patients with the hemorrhagic fever with renal syndrome. *Arch Virol* 100, 1

Kallio-Kokko, H., Valpahati, O., Lundkvist, A., Vaheri, A. (1998). Evaluation of Puumala virus IgG and IgM enzyme immunoassays based on recombinant baculovirus expressed nucleocapsid protein for early nephropathia epidemica diagnosis. *Clin Diag Virol* 10, 83-90

Kallio-Kokko, H., Valpahati, O., Hedman, K., Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A. (1993). Puumal virus antibody and immunoglobulin G activity assays based on a recombinant nucleocapsid antigen. *J Clin Microbiol* 31, 677-80

Kallio-Kokko, H., Lundkvist, A., Plyusnin, A., Avsic-Zupanc, T., Vaheri, A., Valpahati, O. (2000). Antigenetic properties and diagnosis potential of recombinant Dobrava virus nucleocapsid protein. *J Med Virol* 61, 266-274

Kehm, R., Jakob, N.J., Welzel, T.M., Tobiasch, E., Viczian, O., Jock, S., Geider, K., Süle, S., Darai, G. (2000). Expression of immunogenic Puumala Virus Nucleocapsid protein in transgenic tobacco and potato plants. *Virus Genes* 22, 73-83

Khattak, S., Darai, G., Sule, S., Rösen – Wolff, A. (2002). Characterisation of expression of Puumala virus nucleocapsid protein in transgenic plants. *Intervirology* 45, 334-9

Kirsi, J.J., North, J.A., McKernan, P.A., Murray, B.K., Canonico, P.G., Huggins, J.W. (1983). Broad spectrum antiviral activity of 2-beta-Diribofuranosylenazole-4-carboxamide, a new antiviral agent. *Antimicrob Agents Chemother* 24, 353-361

Kitano, M. (1944). A study of epidemic hemorrhagic fever. *Manchurian Medical Journal* 40, 191-209

Kolakofsky, D., Hacker, D. (1991). Bunyavirus RNA synthesis: genom transcription and replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 169, 143-159

Koletzki, D., Schirmbeck, R., Lundkvist, A., Meisel, H., Kruger, D.H., Ulrich, R. (2001). DNA vaccination of mice with a plasmid encoding Puumala hantavirus nucleocapsid protein mimics the B-cell response induced by virus infection. *J Biotech* 84, 73-8

Koraka, P., Avsic – Zupanc, T., Osterhaus, A.D.M.E., Groen, J. (2000). Evaluation of two commercially available immunoassays for the detection of hantavirus antibodies in serum samples. *J Clin Virol* 17, 189-196

LeDuc, J.W., Lee, H.W. (1989). Virus isolation and identification. In: Lee HW and Dalrymple JM (eds) *Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome*. WHO Collaborating Center for HFRS, Institute for Viral Diseases, Korea University, Seoul

Lee, H.W., Lee, P.W. (1976). Korean hemorrhagic fever. 1. Demonstration of causative antigen and antibodies. *Korean J Int Med* 19, 371-384

Lee, H.W., Lee, P.W., Johnson, K.M. (1978). Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137, 298-308

Lee, H.W. (1982). Korean hemorrhagic fever. *Prog Med Virol* 28, 96-113

Lee, P.W., Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., Yanagihara, R. (1985). Serotypic classification of Hantaviruses by indirect immunofluorescent antibody and plaque reduction neutralisation test. *J Clin Microbiol* 22, 940

Lee, H.W., Dalrymple, J.M. (1989a). Manual of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research, Institute for Viral Diseases, Korea University

Lee, P.W., Meegan, J.M., LeDuc, J.W., Tkachenko, E.A., Tvanov, A.P. (1989b). Serologic techniques for detection of Hantaan virus infection, related antigens and antibodies. In: Lee HW (ed) Manual of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. WHO Colaborating Centre for HFRS, Seoul, 75-106

Lee, H.W., Ahn, C.N., Song, J.W., Baek, L.J., Seo, T.J., Park, S.C. (1990a). Field trial of an inactivated vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome in humans. *Arch Virol Suppl* 1, 35-47

Lee, H.W., Baek, L.J., Chu, Y.K. (1990b). Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. *Arch Virol Suppl* 1, 5-18

Li, X.D., Makela, T.P., Guo, D., Soliymani, R., Koistinen, V., Valpahati, O., Vaheri, A., Lankinen, H. (2002). Hantavirus nucleocapsid protein interacts with the Fas-mediated apoptosis enhancer Daxx. *J Gen Virol* 83, 759-66

Lukes, R.J. (1954). The pathology of thirty-nine fatal cases of epidemic hemorrhagic fever. *Am J Med* 16, 639-650

Lundkvist, A., Hörling, J., Niklasson, B. (1993a). The humoral response to Puumala virus infection (nephropathia epidemica) investigated by viral protein immunoassays. *Arch Virol* 130, 121-130

Lundkvist, A., Björsten, S., Niklasson, B. (1993b). Immunoglobulin G Subclasses responses against the structural components of Puumala virus. *J Clin Microbiol* 31, 368-372

Lundkvist, A., Björsten, S., Niklasson, B. (1993c). Immunoglobulin G subclasses responses against the structural components of Puumala virus. *J Clin Microbiol* 31, 368-72

Lundkvist, A., Björsten, S., Niklasson, B., Ahlborg, N. (1995). Mapping of B-cell determinants in the nucleocapsid protein of Puumala virus: definition of epitopes specific for acute IgG recognition in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2, 82-86

Lundkvist, A., Kallio-Kokko, H., Brus Sjölander, K., Lankinen, H., Niklasson, B., Valpahati, O., (1996). Characterisation of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity. *Virology* 216, 397-406

Lundkvist, A., Hukie, M., Hörling, J., Gilljam., M., Nichol, S., Niklasson, B. (1997). Puumala and Dobrava viruses cause hemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralizing antibody responses in early patient sera. *J Med Virol* 53, 51-59

Lundkvist, A., Meisel, H., Koletzki, D., Lankinen, H., Cifire, F., Geldmacher, A., Sibold, C., Gott, P., Vaheri, A., Kruger, D.H., Ulrich, R. (2002). Mapping of B – cell epitopes in the nucleocapsid protein of Puumala hantavirus. *Viral Immunology* 15, 177-92

McCaughey, C., Hart, C.A. (2000). Hantaviruses. *J Med Microbiology* 49, 587-599

Mc Kee, K.T.J., LeDuc, J.W., Peters, C.J. (1991). Hantaviruses. In: Belshe RB, Textbook of human virology, 2nd edition, St. Louis, Mosby Year book, 615-632

Meyer, B.J., Schmaljohn, C.S. (2000). Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. Trends Microbiol 8, 61-67

Modrow, S., Falke, D. Molekulare Virologie

Morii, M., Yosghimatsu, K., Arikawa, J., Zhou, G., Kariwa, H., Takashima, I. (1998). Antigenetic characterisation of Hantaan and Seoul virus nucleocapsid proteins by recombinant baculovirus: application of a truncated protein, lacking an antigenetic region common to the two viruses, as a serotyping antigen. J Clin Microbiol 36, 2514-2521

Mustonen, J., Brummer-Korvenkontio, M., Hedman, K., Pasternack, A., Pietilä, K., Vaheri, A. (1994). Nephropathia epidemica in Finland: a retrospective study of 126 cases. Scand J Infect Dis 26, 7-13

Mustonen, J., Helin, H., Pietilä, K., Brummer-Korvenkontio, M., Hedman, K., Vaheri, A., Pasternack, A. (1994). Renal biopsy findings and clinicalpathologic correlations in nephropathia epidemica. Clin Nephrol 41, 121-126

Niklasson, B.J., Leduc, J.W. (1987). Epidemiology of nephropathia epidemica in Sweden. J Infect Dis 155, 269

Niklasson, B., Leduc, J., Nystrom, K., Nyman, L. (1987). Nephropathia epidemica: incidence of clinical cases and antibody prevalence in an endemic area of Sweden. Epidemiol Infection 99, 559-62

Niklasson, B., Kjelsson, T. (1988). Detection of nephropathia epidemica (Puumala virus-) specific immunoglobulin M by enzymelinked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 26, 1519

Niklasson, B., Tkachenko, E., Ivanov, A.P., van der Groen, G., Wiger, D., Andersen, H.K., LeDuc, J., Kjelsson, T., Nystrom, K. (1990). Hemorrhagic fever with renal syndrome: evaluation of ELISA for detection of Puumala-virus-specific IgG and IgM. *Res Virol* 141, 637-48

Nolte, K.B., Feddersen, R.M., Foucar, K., Zaki, S.R., Koster, F.T., Madar, D., Merlin, T.L., McFeeley, P.J., Umland, E.T., Zumwalt, R.E. (1995). Hantavirus pulmonary syndrome in the United States: a pathological description of a disease caused by a new agent. *Hum Pathol* 26, 110-120

Pensiero, M.N., Shrefkin, J.B., Dieffenbach, C.W., Hay, J. (1992). Hantaan virus infection of human endothelial cells. *J Virol* 66, 5929-5936

Pilaski, J., Zöller, L., Blenk, H. (1986). Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom (HFRS): eine durch Nagetiere übertragene Nephropathie des Menschen. *Wehrmed. Mschr.* 30, 435-444

Plyusnin, A., Valpahati, O., Lundkvist, A., Henettonen, H., Vaheri, A. (1996). Newly recognized hantavirus in Siberian lemmings. *Lancet* 347, 1835-1836

Plyusnin, A., Valpahati, O., Vaheri, O. (1996). Hantaviruses: genome structure, expression and evaluation. *J Gen Virol* 77, 2677-2687

Plyusnin, A., Hörling, J., Kanerva, M., Mustonen, J., Cheng, Y., Partanen, J., Valpahati, O., Kukkonen, S.K.J. (1997). Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodents. *J Clin Microbiol* 35, 1090-1096

Salonen, E.M., Parren, P.W.H.I., Graus, Y.F., Lundkvist, A., Fisticaro, P., Valpahati, O., Kallio-Kokko, H., Vaheri, A., Burton, D.R. (1998). Human recombinant Puumala virus antibodies: cross-reaction with other hantaviruses and use in diagnostics. *J Gen Virol* 79, 659-665

Sambrook and Russel (3. Auflage). *Molecular Cloning*

Schmaljohn, C.S., Hasty, S.E., Harrison, S.A., Dalrymple, J.M. (1983). Characterisation of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 148, 1005-12

Schmaljohn, C.S., Sugiyama, K., Schmaljohn, A.L., Bishop, D.H. (1988). Baculovirus expression of the small genome segment of Hantaan virus and potential use of the expressed nucleocapsid protein as a diagnostic antigen. *J Gen Virol* 69, 777-86

Schmaljohn, C.S., Chu, Y.K., Schmaljohn, A.L., Dalrymple, J.M. (1990). Antigenetic subunits of Hantaan virus expressed by baculovirus and vaccinia virus recombinants. *J Virol* 64, 3162-70

Schmaljohn, C.S. (1994). Prospects for the vaccines to control viruses in the family Bunyaviridae. *Rev Med Virol* 4, 185-196

Schmaljohn, C.S. and Nichol, S.T. (2001). Hantaviruses

Sjölander K., Elgh F., Kallio-Kokko H., Vapalahti O., Hägglund M., Palmcrantz V., Juto P., Vaheri A., Niklasson B., Lundkvist A. (1997). Evaluation of serological methods for diagnosis of Puumala Hantavirus infection (Nephropathia epidemica). *J Clin Microbiol* 35, 3264-3268

Sjölander K., Golovljova I., Plyusnin A., Lundkvist A. (2000). Diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in *Drosophila melanogaster* cells. *J Clin Microbiol* 38, 2324-2329

Stuhlfauth, K. (1943). Bericht über ein neues schlammfieberähnliches Krankheitsbild bei Deutschen Truppen in Lappland. *Dtsch Med Wochenschr* 69, 439-443, 474-477

Ulrich, R., Koletzki, D., Lachmann, S., Lundkvist, A., Zankl, A., Kazaks, A., Kurth, A., Gelderblom, H.R., Borisova, G., Meisel, G., Kruger, D.H. (1999). New chimeric hepatitis B virus core particles carrying hantavirus (serotyp puumala) epitopes: immunogenicity and protection against virus challenge. *J Biotech* 73, 141-53

Valpahati, O., Lundkvist, A., Kallio-Kokko, H., Paukku, K., Julkunen, I., Lankinen, H., Vaheri, A. (1996). Antigenetic properties and diagnostic potential of Puumala virus nucleocapsid protein expressed in insect cells. *J Clin Microbiol* 34, 119-125

Valpahati, O., Mustonen, J., Lundkvist, A., Henttonen, H., Plyusnin, A., Vaheri, A. (2003). Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 3, 653-61

Wang, X., Li, D., Liu, Z., Li, C., Liang, M., Zhang, Q., Hui, Z., Song, G. (2001). Cloning and nucleotide sequencing of full length L segment cDNA of Hantavirus strain A9. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, 3, 256-61

Xu, Z., Wei, L., Wang, L., Wang, H., Jiang, S. (2002). The in vitro and vivo protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: potential application for immunotherapy and passive immunization. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 552-8

Yanagihara, R., Silverman, D.J. (1990). Experimental infection of human vascular endothelial cells by pathogenic and nonpathogenic hantaviruses. *Arch Virol* 111, 281-286

Yoshimatsu, K., Yoo, Y.C., Yoshida, R., Ishihara, C., Azuma, I., Arikawa, J. (1993). Protective immunity of Hantaan virus nucleocapsid and envelope protein studied using baculovirus-expressed proteins. *Arch Virol* 130, 365-76

Zeier, M., Zöller, L., Haußmann, W., Andrassy, K., Ritz, E. (1990). Klinik und Therapie der Hantavirus – Infektion. *DMW* 44, 1678-1681

Zöller, L., Darai, G. (1990). Hantavirus – Infektionen. Sonderdruck aus „Die gelben Hefte“, Heft 1, 9-18

Zöller, L., Zeier, M. (1990). Serologische Diagnostik der Hantavirus – Infektionen. *DMW* 115, 1674-1677

Zoller, L., Yang, S., Gött, O., Bautz, E.K., Darai, G. (1993). Use of recombinant nucleocapsid proteins of the Hantaan and nephropathia epidemica serotypes of Hantaviruses as immunodiagnostic antigens. *J Med Virol* 39, 200-7

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

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Übersicht über die Hantavirus – Serotypen	3
Tabelle 2: Erstmalige Typisierung von Hantaviren (nach Lee, 1989)	6
Tabelle 3: Vertreter der Hantaviren, die mit HFRS assoziiert sind	13
Tabelle 4: Buchstabencode für die Nomenklatur der Aminosäuren	74

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau eines Hantaviruspartikel	7
Abb. 2: Darstellung der Proteinbiosynthese und der Replikation von Hantaviren	10
Abb. 3: pRSETB-Vektor der Fa. Invitrogen	48
Abb. 4: Darstellung der Induktion der Proteinexpression durch IPTG	49
Abb. 5: Funktionsprinzip der Proteinreinigung mit der immobilisierenden Metallaffinitätschromatographie	50
Abb. 6: Klonierung des hantaviralen S – Segments in den pCR2.1 TOPO Vektor	58
Abb. 7: PCR – Kontrolle: cDNA der hantaviralen S – Segmente von Puumala und Dobrava	59
Abb. 8: pCR2.1 TOPOPuumalaN und pCR2.1TOPODobravaN nach Restriktionsenzymverdau	60
Abb. 9: Übersicht über die Herstellung der bakteriellen Expressionsvektoren	61
Abb. 10: Funktionseinheit des pRSETB – Vektors	61
Abb. 11: Plasmidkarten der Expressionsvektoren pRSETBPuuN und pRSETBDobN	63
Abb. 12: Probespaltung von Plasmiden mit EcoRI zur Identifikation von positiven Expressionsklonen PRSETBPuuN	64

Abb. 13: Probespaltung von Plasmiden mit XhoI zur Identifikation von positiven Expressionsklonen pRSETBPuuN	64
Abb. 14: Probespaltung von Plasmiden mit EcoRI zur Identifikation positiver Expressionsvektoren pRSETBDobN	65
Abb. 15: Sequenzierung der Übergänge des pRSETBPuuN – Expressionsvektors	65
Abb. 16: Sequenzierung der Übergänge des pRSETBDobN – Expressionsvektors	66
Abb. 17: Darstellung des exprimierten PuumalaN – Proteins nach Aufreinigung mit der immobilisierenden Metallaffinitäts-Chromatographie	68
Abb. 18: Western Blot zum Nachweis der exprimierten PuumalaN – Proteine	69
Abb. 19: Bild A: SDS – PAGE mit anschließender Coomassie Blau Färbung von DobravaN-Protein	
Bild B: Western Blot zum Nachweis des exprimierten aufgereinigten DobravaN –Proteins	70
Abb. 20: Western Blot mit den exprimierten hantaviralen N – Proteinen Puumala und Dobrava	71
Abb. 21: Clustal Alignment für das Puumala Nukleokapsid Protein	72
Abb. 22: Clustal Alignment für das Dobrava Nukleokapsid Protein	73
Abb. 23: Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen hantavirales N – Protein mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen, Antikörper gegen PuumalaN – Protein	78
Abb. 24: Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen hantavirales N – Protein mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen, Antikörper gegen DobravaN – Protein	80
Abb. 25: Nachweis der Spezifität der Antikörper gegen hantavirales N – Protein mit dem recom Line Bunyavirus Test der Fa. Mikrogen	81
Abb. 26: Sensitivitätsnachweis der Antikörper gegen PuumalaN – und DobravaN – Protein der Final Bleeds im Western Blot	82
Abb. 27: siehe Abb. 25	87
Abb. 28: Vergleich der Aminosäurenabfolge von Hantaan,	

7.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
A.	Aqua
A	anti
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfoxid
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintri-phosphat
Aufl.	Auflage
AK	Antikörper
β	beta
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
D	Dalton
DMEM	Dulbeccos modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTB	Desoxynukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EtOH	Ethanol

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin
G	Gramm
GP	Glykoprotein
HFRS	Hämorrhagisches Fieber mit Renalem Syndrom
His	Histidin
HLA	human leucocyt antigen
HPS	Hantavirus Pulmonary Syndrome
IFT	Indirekte Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-1-thio-beta-D-Galactosid
k	kilo
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KHF	Koreanisches Hämorrhagisches Fieber
l	Liter
M	Molar
m	milli
μ	mikro
N	Normal
n	nano
NE	Nephropathia epidemica
nm	nanometer
nt	Nukleotide
ORF	open reading frame
OD	Optische Dichte
ORI	origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	potentia hydrogenii

POD	Peroxidase
pol	Polymerase
PPP	Protein Probenpuffer
Prom	Promotor
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Reverse Transcriptase
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sec	Sekunden
s.u.	siehe unten
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T	Thymin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	unit, Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
vRNA	virale RNA
z.B.	zum Beispiel
%	Prozent

7.4 Sequenzierungsergebnisse

Sequenzierungsergebnisse der hantaviralen N – Segmente kloniert in den pCR2.1TOPO – Vektor:

1. pCR2.1TOPOPuuN1cDNA

Puumala N/ Sotkamo/ V- 2969/ 81

```
AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG
CAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGC
AATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATG
```

CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAG
GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAA
TACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACC¹GAGCTCGGATCCACTAGTAACG
GCCGCCAGTGTGCTGGAATTcgccctTt**ATGAGT**GaCTTGACAGATATCCAAGA
GGATATAACCCGCCATGAACAGCAACTTATTGTTGCCAGACAAAACTTAA
GGAGGCAGAGAGAGCAGTGGAAAGTGGACCCAGATGACGTTAATAAAAACA
CACTGCAAGCCAGGCAACAAACAGTGTGAGCACTGGAGGACAAACTCGCA
GACTACAAGAGAAGGATGGCAGATGCTGTGTCCAGGAAAAAATGGATAC
TAAACCTACTGACCCGACTGGGATTGAACCTGATGACCACCTCAAGGAGAG
ATCAAGCCTTAGGTATGGAAATGTCCTTGATGTAAATGCAATTGACATTGAA
GAACCAAGTGGCCAAACAGcAGATTGGTATAACAATTGGAGTGTATGTGATA
GGGTTCACACTTCCTATCATCCTTAAAGCTTTATAACATGCTCTCAACGCGTG
GGAGACAGACTGTAAAAGAAAATAAGGGGACACGTATAAGGTTtAAGGATG
ATACATCaTTTGAAGACATCAATGGCATAAGGAGACCAAAGCATTtTATATGT
TTCTATGCCTACTGCCAGTCAACTATGAAAGCAGAAGAAGCTCACACCAGG
CAGATTTTCGCACAATAGTATGTGGTCTTTTTCCCACTCAGATCCAGGTTTCGT
AACATCATGAGTCCAGTTATGGGGGTCATTGGTTTTTCATTCTTTGTGAAGG
ATTGGTCTGAGAGAATCAGAGAGTTCATGGAAAAAGAGTGCCCATTCATAA
AGCCCGAAGTAAAACCAGGCACACCAGCACAAGAGATTGAGATGTAAAA
AGAAATAAGATCTACTTTATGCAGCGCCAGAATGTGCTTGACAAAAATCAT
GTGGCAGACATTGACAAGTTAATTGACTATGCAGCCT***TGGAGACC**TACAT
CACCTGACAACATTGATTTCGCTAATGCACCATGGGTCTTTGCATGTGCACC
AGACCGATGCCACCAACATGTATCTATGTTGCAGGGATGGCAGAGCTTGG
GGCCTTTTTTTCAATATTGCAGGACATGAGAAACACAATAATGGCATCTAAG
ACTGTTGGCACAGCAGAAGAGAAATTAAGAAAAAGTCTTCCTTTTACCAA
TCTTACCTGCGTCGAACTCAATCAATGGGAATTCAGCTTGATCAAAGAATTA
TCCTCTTGTTTATGTTGGAATGGGGCAAAGAGATGGTAGATCACTTCCATCT
TGGTGATGATATGGATCCAGAGCTCAGAGGTCTTGCACAGGCACTGATAGA
TCAAAGGTGAAGGAAATATCGAACCAGGAACCACTAAAGATATA**AAA**agggc
gAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAG²CATGCATCTAGA
GGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTT
TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGC
AGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTG

TAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC
TACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCTTTC
TCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT
AGGGTTCCGATTTAGAGCTTTACGGCACCTCGACCGCAAAAACTTGATTTG
GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTT
TGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAAC
AACACTCAACCCTATCGCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG
ATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAATTCAGGGCGCA
AGGGCTGCTAAAGGAACCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGG
TGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAAC
GCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATA
GCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGG
GGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTT
CTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGAC
AGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTC
TCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGAC
AATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCC
GGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGAC
GAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCT
GTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAA
GTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCGCCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTAT
CCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG
CCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGAT
GGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCT
CGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGA
GGATCTCGTCGTGATCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAA
AATGGCCGCTTTTCTGGATTCAACGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACC
GCTATCAGGACATAGCGTTGGATACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCG
GCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTC
GCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAA
GGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCG
GCATTTTGCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAG
ATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCA
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT

GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGATACACTATTATCCCGTATTGACGCC
GGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTT
GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTA
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAAC
ATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
GCCATACCAAACGACGAGAGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGCCAACA
ACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAAC
AATTAATAGACTGAATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCT
CGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCG
TGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCGCTCCCG
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTC
AGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAAT
TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA
AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAA
CTTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
CCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTIONAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG
GTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
TCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGT
GATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCCT
TTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCG
TTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA
GCGGAAG

PuumalaN 1– Segment im pCR2.1TOPO Vektor

Die Markierung 1 stellt die Schnittstelle des Restriktionsenzym KpnI, die Markierung 2 den Restriktionsenzymangriffspunkt für XhoI dar. Start- und Stopcodon (ATG und TAA) sind fettgedruckt hervorgehoben, dazwischen liegt das PuumalaS-Segment.

Der pCR2.1 TOPO – Vektor entspricht einem Molekulargewicht von 3.9 kb, das PuumalaN – Insert weist ein Molekulargewicht von 1.6 kb auf.

2. pCR2.1TOPOPuuN3cDNA

Puumala N/ Sotkamo/ V- 2969/ 81

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG
CAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGC
AATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATG
CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACACAG
GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAA
TACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACC¹GAGCTCGGATCCACTAGTAACG
GCCGCCAGTGTGCTGGAATTcgccctTt**ATGAGT**GaCTTGACAGATATCCAAGA
GGATATAACCCGCCATGAACAGCAACTTATTGTTGCCAGACAAAACTTAA
GGAGGCAGAGAGAGCAGTGGAAAGTGGACCCAGATGACGTTAATAAAAACA
CACTGCAAGCCAGGCAACAAACAGTGTGTCAGCACTGGAGGACAAACTCGCA
GACTACAAGAGAAGGATGGCAGATGCTGTGTCCAGGAAAAAAATGGATAC
TAAACCTACTGACCCGACTGGGATTGAACCTGATGACCACCTCAAGGAGAG
ATCAAGCCTTAGGTATGGAAATGTCCTTGATGTAAATGCAATTGACATTGAA
GAACCAAGTGGCCAAACAGcAGATTGGTATACAATTGGAGTGTATGTGATA
GGGTTACACTTCCTATCATCCTTAAAGCTTTATACATGCTCCCAACGCGTG
GGAGACAGACTGTAAAGGAAAATAAGGGGACACGTATAAGGTTtAAGGATG
ATACATCaTTTGAAGACATCAATGGCATAAGGAGACCAAAGCATTATATGT
TTCTATGCCTACTGCCAGTCAACTATGAAAGCAGAAGAACTCACACCAGG
CAGATTTTCGCACAATAGTATGTGGTCTTTTTTCCCACTCAGATCCAGGTTTCGT
AACATCATGAGTCCAGTTATGGGGGTCATTGGTTTTTCATTCTTTGTGAAGG
ATTGGTCTGAGAGAATCAGAGAGTTCATGGAAAAAGAGTGCCCATTCATAA
AGCCTGAAGTAAAACCAGGCACACCAGCACAAAGAGATTGAGATGTAAAA
AGAAATAAGATCTACTTTATGCAGCGCCAGAATGTGCTTGACAAAAATCAT
GTGGCAGACATTGACAAGTTAATTGACTATGCAGCCTCGGAGACCCTACAT

CACCTGACAACATTGATTTCGCCTAATGCACCATGGGTCTTTGCATGTGCACC
AGACCGATGCCACCAACATGTATCTATGTTGCAGGGATGGCAGAGCTTGG
GGCCTTTTTTTCAATATTGCAGGACATGAGAAACACAATAATGGCATCTAAG
ACTGTTGGCACAGCAGAAGAGAAATTAAGAAAAAGTCTTCCTTTTACCAA
TCTTACCTGCGTCGAACTCAATCAATGGGAATTCAGCTTGATCAAAGAATTA
TCCTCTTGTTTATGTTGGAATGGGGCAAAGAGATGGTAGATCACTTCCATCT
TGGTGATGATATGGATCCAGAGCTCAGAGGTCTTGCACAGGCACTGATAGA
TCAAAGGTGAAGGAAATATCGAACCAGGAACCACTAAAGATATAAAagggc
gAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAG²CATGCATCTAGA
GGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTT
TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGC
AGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTG
TAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGC
TACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTC
TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTT
AGGGTCCGATTTAGAGCTTTACGGCACCTCGACCGCAAAAACTTGATTTG
GGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTT
TGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAAC
AACACTCAACCCTATCGCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCG
ATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAATTCAGGGCGCA
AGGGCTGCTAAAGGAACCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGG
TGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAAC
GCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATA
GCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGG
GGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAACTGGATGGCTTT
CTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGAC
AGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTC
TCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGAC
AATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGGCGCCC
GGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGAC
GAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCT
GTGCTCGACGTTGTCAGTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGGCGAA
GTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCGCCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTAT

CCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG
CCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGAT
GGAAGCCGGTCTTGTTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCT
CGCGCCAGCCGAACGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGA
GGATCTCGTCGTGATCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAA
AATGGCCGCTTTTCTGGATTCAACGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACC
GCTATCAGGACATAGCGTTGGATACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCG
GCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTC
GCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAA
GGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCCCTTATTCCCTTTTTTGCG
GCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAG
ATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCA
ACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGAT
GAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGATACACTATTATCCCGTATTGACGCC
GGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTT
GAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGA
GAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTA
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAAC
ATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA
GCCATACCAAACGACGAGAGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGCCAACA
ACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAAC
AATTAATAGACTGAATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCT
CGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCG
TGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCGCTCCCG
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAA
TAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTC
AGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAAT
TTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA
AAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAA
CTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGT
CCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG
CCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG

ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG
CGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGC
GAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGG
GTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
TCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGT
GATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCT
TTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCG
TTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATA
CCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAA
GCGGAAG

PuumalaN 3– Segment im pCR2.1TOPO Vektor

Die Markierung 1 stellt die Schnittstelle des Restriktionsenzym KpnI, die Markierung 2 den Restriktionsenzymangriffspunkt für XhoI dar. Start- und Stopcodon (ATG und TAA) sind fettgedruckt hervorgehoben, dazwischen liegt das PuumalaS – Segment.

Der pCR2.1 TOPO – Vektor entspricht einem Molekulargewicht von 3.9 kb, das PuumalaN – Insert weist ein Molekulargewicht von 1.6 kb auf.

3. pCR2.1TOPODobNcDNA

Dobrava/ Saarema/ 160V/ N

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG
CAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGC
AATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATG
CTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAG
GAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAA
TACTCAAGCTATGCATCAAGCTTGGTACC¹GAGCTCGGATCCACTAGTAACG
GCCGCCAGTGTGCTGGAATTegccctTt**ATG**ggcaactagaggaaactccaaaaggagatcaatag
ccacgaggccaattggtgatagccaggcagaaggtgaaagatgcagagaaacaatatgaaaagatcctgatgacctaat
aaaagggcattgagtgatagaaaagcattgcacaatcaatccagggcaaaattgatgagctaaggagacagctggctgacc
gtgtggctgcaggaaaaaacattggcaaggagaggaccaactggactagatcctggtgatcacctaaagagaaatcaat
gcttagttatggaaatgcattgacctcaatcatcttgacattgatgaaccaacagggcaaaactgctgactggctaaggcattgtga

tctattgacatcttctgtagtccaatactcctgaaggctctttacatgttgacaactagaggaggcaaaactactaaagacaata
agggaatgaggattcgatttaaggatgacagttctttgaggatgtgaatggaattcgaaaacaaaacatctgttctgtcgtg
cccaatgcccagtcagcatgaaagcagatgagattacacctggtaggttcagaactgcagctctgtggattatacccagccca
ggttaagcaaggaattgatcagccccgcatgagtgattggtttcttaaccctgcaagaattggacggaacgggttgag
gagtggttgacctccctgcaagctattatctgaacctctccaacatcttaaccaaaggcctccactaacctgattatctg
agtcaaagacaaggagcacttgcgaagatggaacaaaagaagcccagggtttagaaaacatgcatagatgctggttga
acatcattgaccatattgactaccgcatcaattgggttttctggtggcacctgataggtgtccccctacctgctgttcattgc
aggcatggcagaattaggtgcattcttctgctcctccaggatagaggaatcagatcatggcatcaaaaactattggaacatca
gaggagaagttgaggaagaagtctctggttctaccaatcttacctccggaggacacagctctatgggtattcaactggaccagcgc
atcattgtgctttcatgatagaatggggtaaagaggcagttgatagttccacctaggtgatgatatggatccagaaattcgaagt
ctagcacaggcattgatcgaaaaaggtaaaagaatatctaatacaggagccgctcaagctt**TAAA**agggcgAATT
CTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAG²CATGCATCTAGAGGGCC
CAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAA
CGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCAC
ATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCC
CTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCG
GCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACAC
TTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCC
ACGTTTCGCCGGCTTTCCTCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT
TCCGATTTAGAGCTTTACGGCACCTCGACCGCAAAAACTTGATTTGGGTGA
TGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACG
TTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACAC
TCAACCCTATCGCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTG
GCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAATTCAGGGCGCAAGGGCT
GCTAAAGGAACCGGAACACGTAGAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGA
CCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGC
GCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGAC
TGGGCGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCC
TCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAAACTGGATGGCTTTCTTGCCGC
CAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGA
GGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCC
GCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGC
TGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTT
TTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAG

CGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGA
CGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGG
GCAGGATCTCCTGTCATCTCGCCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATG
GCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCG
ACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCG
GTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAG
CCGAACTGTTCCGAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCG
TCGTGATCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCC
GCTTTTCTGGATTCAACGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCA
GGACATAGCGTTGGATACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATG
GGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGC
ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAATTGAAAAAGGAAGAG
TATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTT
GCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGA
AGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG
TAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACT
TTTAAAGTTCTGCTATGTGATACACTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG
AGCAACTCGGTCGCCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTC
ACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG
CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACA
ACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGAT
CATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCA
AACGACGAGAGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGCCAACAACGTTGCGC
AACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAG
ACTGAATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTC
CGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG
CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCGCTCCCGTATCGTAGTT
ATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATC
GCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTT
ACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATC
TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGT
TTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCG
CTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGA

AGGTA ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGT
AGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCT
CGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGT
CTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCTG
GGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC
ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCC
GAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGG
AGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCC
TGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCA
GGGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTC
CTGGGCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGA
TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC
AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

DobravaN-Segment im pCR2.1TOPO Vektor

Die Markierung 1 stellt die Restriktionsschnittstelle von KpnI, die Markierung 2 die Enzymschnittstelle für XhoI dar. Start- und Stopcodon sind fettgedruckt hervorgehoben. Das DobravaN – Segment weist ein Molekulargewicht von ca. 1.6 kb auf und ist in Kleinbuchstaben dargestellt. Der pCR2.1TOPO – Vektor ist in Großbuchstaben dargestellt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Axel Rethwilm für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Unterstützung und nette Betreuung während der ganzen Zeit der Anfertigung der Dissertation.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Thomas Schenk, der die Arbeit betreute, bedanken.

Auch den anderen Mitgliedern des Institutes für Virologie, besonders Dr. Thomas Juretzek, Dr. Wolfram Rudolph, Marc Cartellieri, Dr. Ottmar Herchenröder, Dr. Jaqueline Roy, Sylvia Kanzler und Maya Müller-Hermelink möchte ich danken für die vielen Anregungen und die Unterstützung, die ich in der Zeit erfahren durfte.