

**Entwicklung von diagnostischen Methoden zum
Nachweis von europäischen humanpathogenen
Arboviren**

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

„Doctor rerum naturalium“

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsgrundprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Dora Elisabeth Finkeisen

aus Northeim

Göttingen 2014

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. U. Groß, Institut für Medizinische Mikrobiologie, UMG

PD Dr. W. Kramer, Abtlg. Molekulare Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik

PD Dr. M. Weidmann, Abteilung für Virologie, UMG

Mitglieder der Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. U. Groß, Institut für Medizinische Mikrobiologie, UMG

Korreferent: PD Dr. W. Kramer, Abteilung Molekulare Genetik,
Institut für Mikrobiologie und Genetik

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Dr. C.- P. Czerny, Abteilung Tierhygiene und Mikrobiologie mit
Veterinäruntersuchungslabor, Tierärztliches Institut

Prof. Dr. C. Lüder, Institut für Medizinische Mikrobiologie, UMG

Prof. Dr. S. Pöhlmann, Abteilung Infektionsbiologie, Deutsches Primatenzentrum

Prof. Dr. W. Stühmer, Abteilung Molekulare Biologie Neuronaler Signale,
Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2014

Danksagung:

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Frank T. Hufert für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Ermöglichung der Doktorarbeit in der Abteilung für Virologie der Universitätsmedizin Göttingen bedanken.

Besonders danken möchte ich PD Dr. rer. nat. Manfred W. Weidmann für die hervorragende Betreuung während meiner Arbeit, auch über die Grenzen Deutschlands hinaus bis nach Schottland.

Bei Prof. Dr. Uwe Groß und PD Dr. Wilfried Kramer möchte ich mich für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Übernahme des Amtes des Referenten bzw. des Korreferenten bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an RNDr. Daniel Růžek PhD (Department of Molecular Ecology of Parasites, Ceske Budejovice, Czech Republic), Dr. Boris Klempa (Institute of Virology, Slovak Academy of Science (IVSAS), Bratislava, Slovakia), OFA Dr. Gerhard Dobler (Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland), Maria João Alves (Center for Vectors and Infectious Diseases Research, National Institute of Health, Águas de Moura, Portugal) und Koray Ergunay MD. PhD Assistant Prof (Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey) für die freundliche Bereitstellung der seltenen arboviralen Positivseren.

Mein Dank gilt besonders Dr. rer. nat. Meik Dilcher, der in jeder Lebenslage ein offenes Ohr für alle meine Fragen hatte. Die wissenschaftlichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit werden mir fehlen. Natürlich möchte ich mich an dieser Stelle bei der gesamten Arbeitsgruppe Hufert für die tolle Arbeitsatmosphäre bis zum bitteren Ende bedanken und wünsche jedem Einzelnen nach Schließung der Abteilung für Virologie viel Erfolg auf dem weiteren Berufsweg. Tanja Gall und Andrea Paluschkiwitz möchte ich für die schönen Stunden während (ein S3-Labor ohne Tanja kann ich mir gar nicht vorstellen) und vor allem neben dem Laboralltag danken. Wahre Freundschaften halten ein Leben lang, egal wo man sich auf der Welt befindet.

Ich danke Arne, der immer für mich da ist, egal wie es grade läuft und der hoffentlich noch lange einen wichtigen Platz in meinem Leben einnehmen wird.

Darüber hinaus bedanke ich mich besonders bei meinen Eltern, Lothar und Cornelia, die mich mein ganzes Leben stets unterstützt haben. Danke!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Europäische Arboviren – Mögliche Auslöser aseptischer Meningoenzephalitis und ihre Verbreitung</i>	1
1.1.1	Aseptische Meningoenzephalitis.....	1
1.1.2	Europäische Arboviren und ihre Verbreitung.....	2
1.1.3	Arthropoden auf dem Weg in unseren Wohnraum: Biodiversitätsverlust, Klimawandel und Globalisierung	7
1.1.4	Virale Struktur und Genomaufbau	8
1.1.4.1	Reoviridae	8
1.1.4.2	Bunyaviridae	9
1.1.4.3	Flaviviridae	11
1.2	<i>Cytometric-Bead-Array (CBA) und bisher bestehende Nachweismethoden</i>	12
1.2.1	Bestehende Nachweismethoden.....	12
1.2.2	Aufbau und Prinzip der xMAP Technologie – Bio-Plex [®] MAGPIX [™] -System	15
1.2.3	Multiplex Cytometric-Bead-Array (CBA) – Simultaner Antikörpernachweis von europäischen Arboviren	18
1.3	<i>Zielsetzung</i>	19
2	Material und Methoden	21
2.1	<i>Material</i>	21
2.1.1	Verbrauchsmaterial	21
2.1.2	Geräte	22
2.1.3	Chemikalien, Fertiglösungen	23
2.1.4	Lösungen, Medien und Puffer.....	24
2.1.5	Reagenziensätze	26
2.1.6	Enzyme und Nukleotide.....	27
2.1.7	Bakterienstämme.....	27
2.1.8	Zelllinien	28
2.1.9	Viren.....	28
2.1.10	Antikörper	29
2.1.11	Ausgangs-DNA	30
2.1.12	Plasmide	30
2.1.13	Oligonukleotide.....	31
2.1.14	Seren.....	32
2.1.15	Software	33

2.2	Methoden.....	34
2.2.1	Arbeiten mit Zellkulturen.....	34
2.2.1.1	Anzucht von Viren in Zellkultur.....	34
2.2.1.2	Fixierung infizierter Zellen auf Objektträger.....	35
2.2.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	36
2.2.2.1	Spektrophotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen.....	36
2.2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	36
2.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.2.3.1	Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.2.3.2	DNA Extraktion mittels Zymoclean™.....	39
2.2.2.4	Sequenzanalyse.....	40
2.2.3	Rekombinante Molekularbiologie.....	40
2.2.3.1	Donorvektor Herstellung mittels StarGate® Technologie.....	40
2.2.3.2	Herstellung des Expressionsvektors mittels StarGate® Technologie.....	42
2.2.3.3	Transformation rekombinanter DNA in <i>E. coli</i> top 10 bzw. BL21(DE3) Zellen.....	44
2.2.3.4	Anzucht von Bakterienkulturen.....	46
2.2.3.5	Präparation von Plasmid-DNA.....	46
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen.....	47
2.2.4.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) Zellen.....	47
2.2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
2.2.4.3	Transfer von Proteinen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran („Western Blot“).....	49
2.2.4.4	Spezifischer Nachweis exprimierter Proteine mittels Strep-tag® II Antikörper („Immunoblot-Analyse“).....	49
2.2.4.5	Solubilisierung unlöslicher Proteine.....	50
2.2.4.6	Reinigung von Proteinen mittels Strep-tag®/ Strep-Tactin® Technologie.....	51
2.2.4.7	Dialyse von Proteinen mittels Slide-A-Lyzer™ G2 Dialyse Kassetten.....	53
2.2.4.8	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA).....	53
2.2.5	Detektionsmethoden für Antikörper aus Serum.....	54
2.2.5.1	Immunfluoreszenz Test (IFT) zur Kontrolle der Positivseren.....	54
2.2.5.2	Cytometric-Bead-Array (CBA).....	55
2.2.5.2.1	Kopplung von viralen Oberflächenproteinen an magnetische carboxylierte Mikrokugeln (Beads).....	55
2.2.5.2.2	Nachweis der Kopplung mittels Strep-tag® II spezifischem fluoreszenzmarkiertem Antikörper.....	58
2.2.5.2.3	Ermittlung der CBA Sensitivität mittels Positivseren.....	59
2.2.5.2.4	Ermittlung der Kreuzreaktivität und Entwicklung des CBA als Multiplex-Ansatz.....	61
2.2.5.2.5	Multiplex-CBA – Nachweis von Antikörpern gegen europäische Arboviren in Patientenproben.....	62
2.2.5.2.6	Grenzwert-Berechnungen und Auswertung des Multiplex-CBA.....	63

3	Ergebnisse	66
3.1	<i>Amplifikation arboviraler Oberflächenproteingene</i>	66
3.1.1	Primer-Generierung.....	66
3.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	67
3.2	<i>Ligation, Transformation und Sequenzierung</i>	68
3.2.1	Ligation der amplifizierten DNA-Fragmente in den Donorvektor pENTRY-IBA51 und Transfer in den Expressionsvektor pASG-IBA5.....	68
3.2.2	Kontrollverdau und Sequenzierung der rekombinanten Donorvektoren	69
3.2.3	Transformation in kompetente <i>E. coli</i> Zellen	71
3.3	<i>Expression arboviraler Proteine.....</i>	72
3.3.1	<i>In vivo</i> Proteinexpression in <i>E. coli</i> Bakterienkulturen.....	72
3.3.2	Reinigung, Dialyse und Quantifizierung aller exprimierten Proteine.....	74
3.3.3	Spezifischer Protein-Nachweis mittels Western-Blot.....	75
3.4	<i>Bestätigung verwendeter Positivseren durch Immunfluoreszenztest (IFT)</i>	77
3.5	<i>Entwicklung des CBA als Multiplex-Test.....</i>	79
3.5.1	Beweis der Kopplung spezifischer arboviraler Proteine an farbkodierte Populationen magnetischer carboxylierter Beads	79
3.5.2	Vermeidung falsch positiver Ergebnisse durch verbliebene <i>E. coli</i> Proteine	80
3.5.3	Entwicklung interner Kontrollen und Notwendigkeit der Präadsorption	83
3.5.3.1	Entwicklung interner CBA Kontrollen.....	83
3.5.3.2	Präadsorption der Seren zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse.....	84
3.5.4	Sensitivität der gekoppelten Beadpopulationen und optimale Serenverdünnung für Multiplex-Ansätze	86
3.5.5	Ermittlung der Kreuzreaktivität nah verwandter Arboviren	88
3.5.6	Grenzwertberechnung Multiplex-CBA.....	90
3.5.7	IgM- und IgG- Antikörpernachweis gegen europäische humanpathogene Arboviren (Multiplex-CBA)	91
3.5.7.1	Auswertung Multiplex-CBA	92
3.5.7.1.1	Fall 1: Keine arbovirale Infektion: IgM und IgG negativ.	92
3.5.7.1.2	Fall 2: Verdacht auf arbovirale Infektion, die Wochen oder Monate zurückliegt: IgM negativ, IgG positiv	92
3.5.7.1.3	Fall 3: Verdacht auf akute arbovirale Infektion: IgM positiv, IgG negativ	93
3.5.7.1.4	Fall 4: Verdacht auf akute arbovirale Infektion: IgM positiv, IgG positiv	93
3.5.7.2	Bestätigung der Multiplex-CBA Ergebnisse durch Mehrfachmessung auffälliger Seren.....	93
3.5.7.3	Bestätigung der Multiplex-CBA Ergebnisse durch Doppelproben	97
3.5.7.4	Zusammenfassung Multiplex-CBA und IFT-Bestätigung.....	99

4	Diskussion	101
5	Zusammenfassung.....	124
6	Anhang	126
6.1	<i>Zusammenfassung: Sequenzanalyse LasergeneTM</i>	<i>126</i>
6.1.1	Sequenzanalyse aller rekombinanten Donorplasmide (Strategy View)....	126
6.1.2	Beispiel: BATV-N-pENTRY (Alignment).....	127
6.2	<i>Zusammenfassung: Ergebnisse CBA Präadsorptions-Test.....</i>	<i>128</i>
6.3	<i>Zusammenfassung: Ergebnisse CBA Sensitivitätstest.....</i>	<i>128</i>
6.3.1	MFI (PE) aller Sensitivitätstests, IgG-Antikörper, n=3 (Daten).....	128
6.3.2	Einzeldarstellung Sensitivität Typ I und Typ II (GraphPad Prism 6).....	129
6.4	<i>Zusammenfassung: Ergebnisse Multiplex-CBA Kreuzreaktivitätstest.....</i>	<i>131</i>
6.4.1	MFI (PE) aller Kreuzreaktivitätstests, IgG-Antikörper, n=3 (Daten).....	131
6.4.2	Kreuzreaktivitätstest mit erwarteten Kreuzreaktionen (GraphPad Prism 6).... 131
6.4.3	Kreuzreaktivitätstest ohne Kreuzreaktion (GraphPad Prism 6).....	133
6.5	<i>Zusammenfassung: Ergebnisse Multiplex-CBA Negativseren.....</i>	<i>134</i>
6.5.1	MFI (PE) 45 Negativseren zur Grenzwertberechnung IgG (Daten)	134
6.5.2	MFI (PE) 45 Negativseren zur Grenzwertberechnung IgM (Daten)	134
6.5.3	Zusammenfassung: Grenzwertberechnung IgG und IgM	135
6.6	<i>Zusammenfassung: Ergebnisse Multiplex-CBA Patientenproben</i>	<i>135</i>
6.6.1	MFI (PE) Patientenproben IgG n=1 (Daten).....	135
6.6.2	MFI (PE) Patientenproben IgM n=1 (Daten).....	136
6.6.3	Bestätigung Multiplex-CBA durch Untersuchung weiterer Proben des selben Patienten (Zeitraum der Probennahme innerhalb von zwei Wochen)	137
6.6.4	Bestätigung seropositiver Patientenproben auf arbovirale IgG-Antikörper durch Mehrfachmessung (Daten).....	138
6.6.5	Bestätigung seropositiver Patientenproben auf arbovirale IgM-Antikörper durch Mehrfachmessung (Daten).....	139
6.6.6	Graphische Darstellung Patientenseren Fall 2 (GraphPad Prism 6)	140
6.6.7	Graphische Darstellung Patientenseren Fall 3 (GraphPad Prism 6)	141
6.6.8	Graphische Darstellung Patientenseren Fall 4 (GraphPad Prism 6)	143
7	Literaturverzeichnis.....	144

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
AHT	Anhydrotetracyclin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BP	Beadpopulation
CBA	Cytometric Bead Array
cDNA	komplementäre DNA (englisch: <i>complementary DNA</i>)
CPE	Cytopathischer Effekt
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's modified Eagle- medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
dpi	Tage nach Infektion (englisch: <i>days past infection</i>)
ds	Doppelstrang-
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz
Endkonz.	Endkonzentration
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitiserkrankung
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure

HRP	Meerrettich-Peroxidase (englisch: <i>horseradish-peroxidase</i>)
IFT	Immunfluoreszenz Test
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
Lsg.	Lösung
M	molar
mA	Milliampere
MEM	minimum essential medium
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht in Dalton
MWCO	Molekulargewichts Cutoff in Dalton
n.d.	nicht determiniert
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (englisch: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (englisch: <i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate/Lauryl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)

sec	Sekunde
ss	Einzelstrang-
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ü. N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
US	Ultraschall
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	Virales Protein
v/v	Volumenverhältnis (volume/volume)
w/v	Gewichtsverhältnis (weight/volume)
z.B.	zum Beispiel
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem
μ	Mikro-

Alle chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt.

Alle Viren wurden mit den üblichen Buchstaben abgekürzt zusätzlich befindet sich eine erläuternde Tabelle in der Einleitung (Tabelle 1.1).

1 Einleitung

1.1 Europäische Arboviren – Mögliche Auslöser aseptischer Meningoenzephalitis und ihre Verbreitung

1.1.1 Aseptische Meningoenzephalitis

Als Meningitis wird allgemein eine entzündliche Erkrankung der Hirnhäute (Meningen) bezeichnet. Kommt es im Verlauf der Infektion zu einer Beteiligung des Gehirns, so wird von einer Meningoenzephalitis gesprochen. Die häufigste Ursache der Meningitis sind virale Infektionen (Herpesviren, Enteroviren, Paramyxoviren und bestimmte Arboviren). ZNS-Infektionen können auch durch Bakterien (z.B. *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*) oder seltener auch durch Pilze (z. B. *Cryptococcus neoformans*) und Parasiten (z.B. *Toxoplasma gondii*) (Solomon, Hart & Beeching, 2007) hervorgerufen werden.

Als aseptische Meningitis wird eine Meningitis, die nicht durch eine bakterielle Infektion ausgelöst wurde, bezeichnet. Virale Meningitiden stellen damit eine Form der aseptischen Meningitis dar. Symptome wie hohes Fieber, ein schweres, allgemeines Krankheitsgefühl mit grippeähnlichen Symptomen und zunehmende, unerträgliche Kopfschmerzen, Übelkeit mit Erbrechen sowie eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber Licht, Lärm und Berührung können auftreten. Im späteren Verlauf tritt eine Nackensteifigkeit auf. Spätfolgen einer Meningoenzephalitis können Hörstörungen, Krampfleiden, Hirnnervenlähmungen, Entwicklungsrückstand, Verhaltensstörungen, Hydrozephalus (nur beim Fetus), psychische Defektsyndrome und Ataxien sein (Oechtering & Petzold, 2012; Scheibe & Schulz, 1991).

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis („FSME“, englisch: *tick-borne encephalitis* = „TBE“) ist in Deutschland eine endemische Viruskrankheit und nach der Lyme-Borreliose (Erreger: *Borrelia burgdorferi*) die zweithäufigste von Zecken übertragene Krankheit. In 20% der Fälle manifestiert sich eine Infektion als aseptische Meningitis und aseptische Meningoenzephalitis (Misić, Daković & Ruzić, 2009). Die klinischen Symptome einer TBEV-Infektion reichen von mildem Fieber bis zu schweren neurologischen Schäden (2% der Fälle) (Burke, 2001).

1.1.2 Europäische Arboviren und ihre Verbreitung

Arboviren (englisch: *arthropode-borne virus*) werden durch Arthropoden-Vektoren (*Arthropoda* = Gliederfüßer) übertragen, hierzu zählen unter anderem verschiedene Stechmücken-, Sandmücken- und Zeckenarten. Sie gehören unterschiedlichen Familien von RNA-Viren an: u.a. den Flavi-, Bunya-, Toga-, Reo-, und Picornaviren und rufen Krankheiten wie *Gelbfieber*, *Denguefieber*, *West-Nil-Fieber*, *Sandmückenfieber* und die in Mitteleuropa von Zecken übertragene TBE hervor.

Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus („FSME“ englisch: *tick-borne encephalitis virus* = „TBEV“) ist sowohl in Deutschland als auch in Europa das am häufigsten vorkommende humanpathogene Arbovirus (Danielova et al., 2006; Lindgren & Gustafson, 2001; Lindgren, Talleklint & Polfeldt, 2000). Es existieren taxonomisch zwei Familien von Zecken, die sog. *Ixodidae* (Schildzecken) und die *Argasidae* (Lederzecken). Prototyp für die Familie der *Ixodidae* ist *Ixodes ricinus*, der Gemeine Holzbock, der den Hauptüberträger aller durch Zecken übertragenen menschlichen Erkrankungen in Europa darstellt (Süss J., 2004). Neben den *Ixodes*, welche vorwiegend in Gebieten dichter Vegetation mit hoher Luftfeuchtigkeit (Gebüsch, Laub- und Mischwald) vorkommen (Gray, 2002), zählen ebenso *Dermacentor* (Buntzecke, bevorzugt warme und trockenere Gebiete: sonnige Hänge, Trockenrasen) und *Haemaphysalis* zu den in Europa vorkommenden Virus übertragenden Schildzecken. Weitere ebenfalls von Zecken übertragene Viren wurden in Tabelle 1.1 aufgelistet.

Das West-Nil-Fieber, eine von Stechmücken auf den Menschen übertragene Krankheit bleibt zwar in 80% der West Nil Virus (WNV) - Infektionen des Menschen asymptomatisch, allerdings entwickeln 20% der Betroffenen Fieber und bei knapp unter 1% manifestieren sich neurologische Erkrankungen wie eine aseptische Meningoenzephalitis (Artsob et al., 2009). WNV wurde erstmals 1937 in Afrika (West-Nil Provinz Sudan) beschrieben. In Europa fand man 1963 das erste europäische Isolat aus Patienten und Stechmücken in Frankreich (Hubalek & Halouzka, 1999), zuvor waren Fälle aus Afrika, Süd-Afrika und Australien bekannt (Schultze-Amberger et al., 2012). In Rumänien gab es 1996 eine größere Epidemie (Tsai et al., 1998), 1999 sprang es nach Amerika über (Lanciotti et al., 1999). Nach Hubalek und Halouzka wurde WNV in Portugal, der Slowakei, Moldawien, Ukraine, Ungarn, Rumänien, Tschechien und Italien isoliert, demnach ist es nur noch eine Frage der Zeit, wann die Zahl der WNV-

Erkrankungen in Deutschland steigt (siehe Abb. 1.2). Als Vektoren kommen mehrere Stechmückenarten der Gattungen *Culex*, *Aedes*, *Culiseta* und *Anopheles* in Betracht. Diese Vektoren übertragen auch andere, bislang vernachlässigte Viren wie: Tahyna Virus (TAHV), Batai Virus (BATV) und Inkoo Virus (INKV).

Toskana Virus (TOSV) Infektionen können, wie bereits aus Italien (Nicoletti, Ciufolini & Verani, 1996) und Spanien (Echevarria et al., 2003; Navarro et al., 2004) bekannt, Auslöser aseptischer Meningitis oder aseptischer Meningoenzephalitis sein (Nicoletti et al., 1991). Als Überträger des Virus kommen einige der Sandmückenarten der Gattung *Phlebotomus* in Frage. Weitere Vertreter aus dieser Sandmücken-Fieber-Gruppe sind Sandfly Fever Naples Virus (SFNV), Sandfly Fever Sicilian Virus (SFSV), Sandfly Fever Turkey Virus (SFTV), deren Infektionen in den meisten Fällen Symptome des *Phlebotomusfiebers* verursachen. Hierbei handelt es sich um eine nicht tödliche etwa zwei bis vier Tage anhaltende milde fiebrige Erkrankung, assoziiert mit Unwohlsein und Grippe-ähnlichen Symptomen. Sandmücken sind 2mm kleine sandfarbene Stechmücken mit einer Lebenserwartung von bis zu 40 Tagen. Ihre theoretische Verbreitungsgrenze liegt bei 10°C Jahresisothermie, was eine Verbreitung entlang des Rheingrabens bis Köln theoretisch ermöglicht. Zwei Arten von Sandmücken *Ph. mascittii* und *Ph. perniciosus* wurden bereits in Rheinland-Pfalz (Wasgau) und Baden-Württemberg (Breisgau) beschrieben (Naucke et al., 2008). Des Weiteren wurden Sandmücken in Belgien, England, Frankreich, Griechenland, Italien, Portugal, Schweiz und Spanien gesichtet (Depaquit et al., 2010), daher sollte in Zukunft den von Sandmücken übertragenen Phleboviren mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden.

In Europa bleibt in etwa 70% aller Fälle aseptischer Meningoenzephalitis das ätiologische Agens ungeklärt. In den letzten 20-30 Jahren konnten alle erwähnten und in Tabelle 1.1 zusammengefassten europäischen Arboviren mit neurologischen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht werden. Diese Viren könnten ursächlich zu etwa 50% der ungeklärten aseptischen Meningoenzephalitiden beitragen. (Bigl, 2001; Davison et al., 2003; Nowak, Boehmer & Fuchs, 2003; Rockx et al., 2006; Studahl, Bergstrom & Hagberg, 1998). Mit Ausnahme des Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus (TBEV) und des West Nil Virus (WNV) sind virale Infektionen mit Batai Virus (BATV), Bhanja Virus (BHAV), Erve Virus (ERVEV), Eyach Virus (EYAV), Inkoo Virus (INKV), Palma

Virus (PALV), Sandfly Fever Naples Virus (SFNV), Sandfly Fever Sicilian Virus (SFSV), Sandfly Fever Turkey Virus (SFTV), Tahyna Virus (TAHV), Toscana Virus (TOSV), Tribec Virus (TRBV) und Uukuniemi Virus (UUKV) nur wenig erforscht. Dabei ist durch vorherige Forschungsergebnisse bereits bekannt, dass neben TBEV (Lindquist & Vapalahti, 2008) und WNV (Tsai et al., 1998; Tyler, 2001) noch weitere europäische Arboviren, wie das durch Sandmücken übertragene TOSV (Schwarz, Gilch & Jager, 1995) und SFTV (Ergunay et al., 2012), sowie das durch Stechmücken übertragene TAHV (Bardos, 1974) und die von Zecken übertragenen Viren: EYAV (Malkova et al., 1980), TRBV (Gresikova, Rajcani & Hruzik, 1966; Libikova, Tesarova & Rajcani, 1970), ERVEV (Chastel et al., 1989; Treib et al., 1998) und BHAV (Balducci et al., 1970; Hubalek, 1987) aseptische Meningoenzephalitis verursachen können.

Abb. 1.1 zeigt die Verbreitung der in Zeckenspezies nachgewiesenen in dieser Arbeit untersuchten Viren in Europa. TBEV wurde nicht dargestellt. Die TBE kommt, mit Ausnahme der Iberischen Halbinsel, in den Beneluxstaaten und Großbritannien überall in Europa vor. In Abb. 1.2 und Abb. 1.3 ist zum Vergleich die Verbreitung der Stechmücken- und Sandmücken-übertragenen Viren in Europa dargestellt.

Alle verfügbaren Daten weisen darauf hin, dass in Europa durch Arthropoden-Vektoren übertragene Viruserkrankungen ein zunehmendes Problem darstellen, das auch in Deutschland weiter an Bedeutung gewinnen wird (Süss J., 2004).

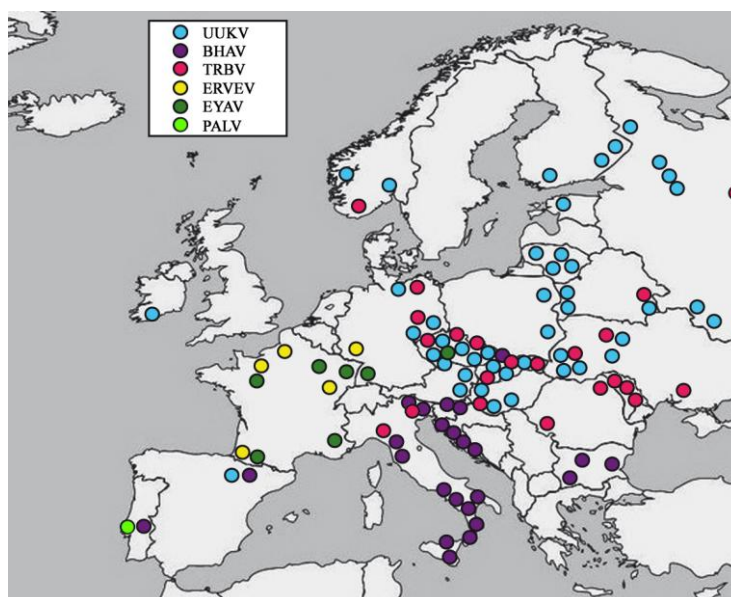


Abb. 1.1: Verbreitung von zeckenübertragenen Viren in Europa. Nachgewiesen durch Virusisolation bzw. Antikörperdetektion unter Verwendung von Daten aus (Dobler, 1996; Hubalek & Rudolf, 2012; Rhese-Küpper B, 1976; Süss J, 1995; Süss J., 2004).

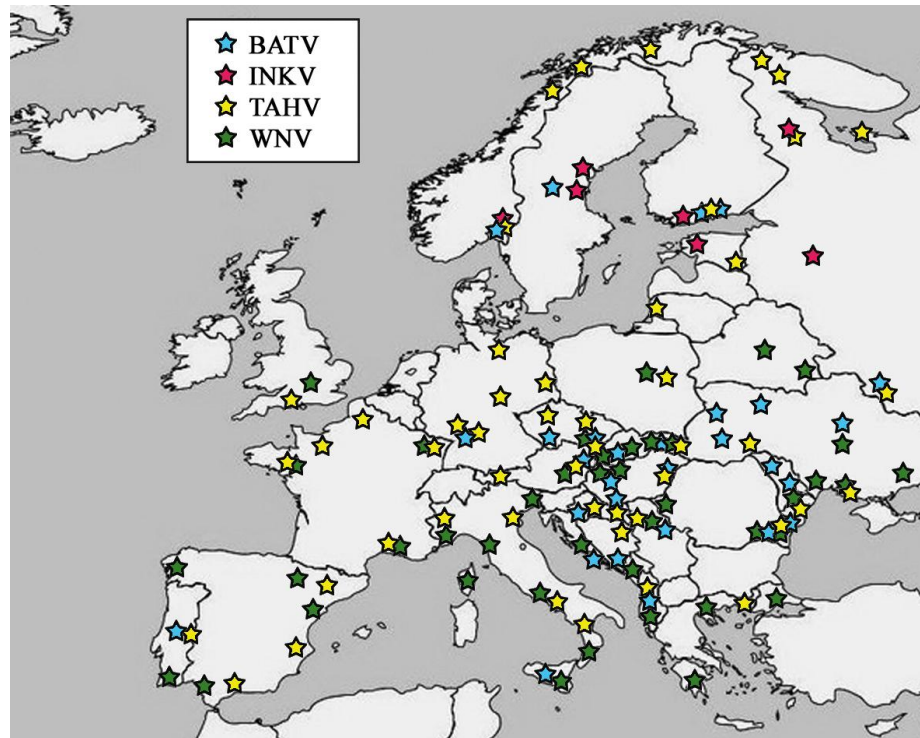


Abb. 1.2: Verbreitung von stechmückenübertragenen Viren in Europa. Nachgewiesen durch Virus-isolation bzw. Antikörperdetektion unter Verwendung von Daten aus (Hubalek, 2008; Hubalek & Halouzka, 1999; Sissy T. Sonnleitner, 2013)

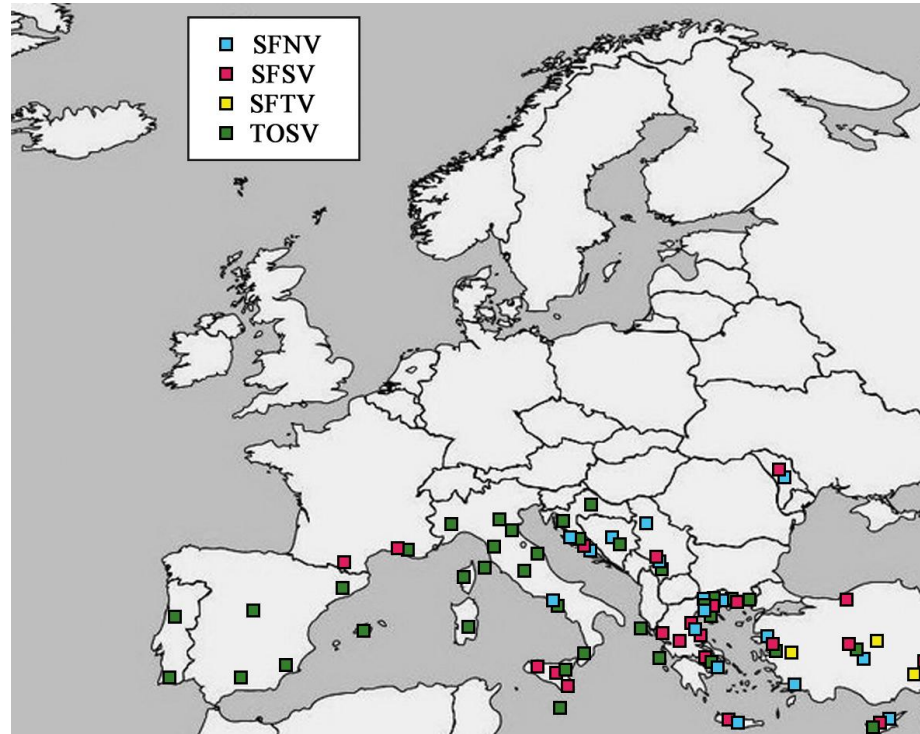


Abb. 1.3: Verbreitung von sandmückenübertragenen Viren in Europa. Nachgewiesen durch Virus-isolation bzw. Antikörperdetektion unter Verwendung von Daten aus (Alkan et al., 2013; Anagnostou & Papa, 2013; Carhan et al., 2010; Ergunay et al., 2011; Hukic & Salimovic-Besic, 2009)

Tabelle 1.1: Europäische Arboviren, deren Vektoren und verursachte Krankheitsbilder

Virus	Familie	Genus	Vektor	Krankheitsbild
Eyach Virus (EYAV)	Reoviridae	Coltivirus	Zecke (<i>Ixodes spp.</i>)	Enzephalitis, Polyradiculoneuritis
Tribec Virus (TRBV)	Reoviridae	Orbivirus	Zecke (<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i>)	Fieber, Meningoenzephalitis
Erve Virus (ERVEV)	Bunyaviridae	Nairovirus	Zecke (<i>Ixodes spp.</i> , <i>Dermacentor marginatus</i>)	ZNS-Hämorrhagien
Bhanja Virus (BHAV)	Bunyaviridae	Phlebovirus	Zecke (<i>Haemaphysalis spp.</i>)	Fieber, Meningoenzephalitis
Palma Virus (PALV)	Bunyaviridae	Phlebovirus	Zecke (<i>Haemaphysalis punctata</i>)	Bisher beim Menschen nicht diagnostiziert.
Uukuniemi Virus (UUKV)	Bunyaviridae	Phlebovirus	Zecke (<i>Ixodes ricinus</i>)	Enzephalitis, neuropathologische Störungen
Tick Borne Enceph. Virus (TBEV)	Flaviviridae	Flavivirus	Zecke (<i>Ixodes ricinus</i>)	Fieber, Enzephalitis
Tahyna Virus (TAHV)	Bunyaviridae	Orthobunyavirus	Stechmücke (<i>Aedes spp.</i> , <i>Culex spp.</i> , <i>Culiseta annulata</i>)	ZNS-Infektion, Fieber, Grippe-ähnlich
Batai Virus (BATV)	Bunyaviridae	Orthobunyavirus	Stechmücke (<i>Anopheles spp.</i> , <i>Aedes communis</i>)	Fieber mit Bronchopneumonie oder Gastritis
Inkoo Virus (INKV)	Bunyaviridae	Orthobunyavirus	Stechmücke (<i>Aedes spp.</i> , <i>Culiseta spp.</i>)	Enzephalitis, Meningitis
West Nil Virus (WNV)	Flaviviridae	Flavivirus	Stechmücke (<i>Aedes spp.</i> , <i>Culex spp.</i> , <i>Culicoides spp.</i>)	Enzephalitis
Sandfly Fever Naples Virus (SFNV)	Bunyaviridae	Phlebovirus	Sandmücke (<i>Phlebotomus spp.</i>)	Phlebotomusfieber
Sandfly Fever Sicilian Virus (SFSV)	Bunyaviridae	Phlebovirus	Sandmücke (<i>Phlebotomus spp.</i>)	Phlebotomusfieber
Sandfly Fever Turkey Virus (SFTV)	Bunyaviridae	Phlebovirus	Sandmücke (<i>Phlebotomus spp.</i>)	Phlebotomusfieber
Toscana Virus (TOSV)	Bunyaviridae	Phlebovirus	Sandmücke (<i>Phlebotomus spp.</i>)	Phlebotomusfieber Enzephalitis, seröse Meningitis (2-12%)

1.1.3 Arthropoden auf dem Weg in unseren Wohnraum: Biodiversitätsverlust, Klimawandel und Globalisierung

Vor dem Hintergrund einer beginnenden Klimaveränderung ist eine zunehmende Dynamik, auch der Arthropodenpopulation und damit der Vektoren der Arboviren zu erwarten. „Die Zeiten, in denen man von exotischen Erregern sprechen und sich gleichzeitig in Europa sicher vor ihnen fühlen konnte, sind vorbei“ (Martin Pfeffer, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, AfT- Frühjahrssymposium 2009). Bei den Arboviren ist neben dem Anstieg der globalen Reise- und Handelstätigkeit des Menschen das Klima der wichtigste Faktor, der es einem exotischen Erreger ermöglicht einen natürlichen Übertragungszyklus in unseren Breitengraden zu etablieren (Martin Pfeffer, 2009). Arthropoden gehören zu den wechselwarmen Tieren, sie sind von ihrer Umgebungstemperatur abhängig (ektotherm). Temperatur und Wetter beeinflussen ihre Vermehrungsrate und ihren Lebensraum (Semenza & Menne, 2009).

Bisher kam der Großteil der Arboviren hauptsächlich in den Tropen und Subtropen vor, jedoch steigt die Anzahl der durch Gliedertiere übertragenen Virusinfektionen weltweit an und die Verbreitung nimmt zu (Süss J., 2004). Wie schon in Abb. 1.1 bis Abb. 1.3 gezeigt, sind Zecken, Stechmücken und Sandmücken bereits in vielen Teilen Europas präsent, Tendenz steigend. Wird auf lange Sicht gesehen das Klima für Stechmücken zu heiß und zu trocken, werden die Sandmücken aus den südlichen Breitengraden verschwinden und sich in Europa mehr und mehr ausbreiten (Semenza & Menne, 2009). Mildere und länger anhaltende Wärmeperioden vom Frühling bis Herbst, sowie kürzere und mildere nasse Winter ermöglichen es den blutsaugenden Arthropoden über einen immer größer werdenden Zeitraum Wirte zu beißen, Blut zu saugen und so die Verbreitung der Arboviren zu forcieren.

Umweltkatastrophen, wie Überschwemmungen verdrängen zwar beispielsweise Zecken aus ihren Lebensräumen, bieten dafür aber Stechmücken und Sandmücken optimale Bedingungen zur Eiablage (Hubalek et al., 2005). Zecken hingegen erobern jetzt schon Höhenlagen oberhalb von 800m über NN (Daniel et al., 2004; Danielova et al., 2006).

Doch das Klima ist nicht der einzige Faktor, der zur Verbreitung der Arboviren in Europa trägt. Bevölkerungswachstum und die damit einhergehende Erweiterung von Wohngebieten des Menschen führen bei den Arthropoden zu einer Anpassung ihres Brut- und Jagdverhaltens. Wo Stechmücken noch vor einigen Jahren ihre Eier in Tümpeln und

Baumhöhlen ablegten und sich von umherstreifenden Wildtieren ernährten, dienen heutzutage Regenwassertonnen als Brutplatz und der Mensch wird zur leicht verfügbaren Nahrungsquelle (Dekoninck et al., 2011). Neben der horizontalen Verbreitung der Arboviren von einem Wirt durch den Biss auf den Nächsten, erfolgt bei den Arthropoden zusätzlich die vertikale transovariale Weitergabe der Viren der Elterngeneration auf die Nachkommen (Danielova et al., 2002; Rosen, 1981; Tesh & Chaniotis, 1975).

Ebenso ist es möglich, dass im Zuge der Globalisierung Mücken (*Aedes albopictus*-Asiatische Tigermücke) aus Italien, als blinde Passagiere mit dem Güterverkehr über die Schweiz beziehungsweise Österreich nach Deutschland kommen (Prof. Egbert Tannich, BNITM, Gemeinsame Pressemitteilung Nr. 02/2013). Bereits 2011 wurden zwei Arten (*Aedes albopictus* und *Aedes japonicus japonicus*) in Südwest-Deutschland nachgewiesen (Werner et al., 2012). Drei Arten *Aedes albopictus*, *Aedes atropalpus* und *Aedes aegypti* wurden bis 2010 an mehreren Orten in den Niederlanden nachgewiesen (Scholte et al., 2010). In Schiffslieferungen mit Glücksbambus aus China 2005 *Aedes albopictus* (Scholte, 2007), in Lieferungen gebrauchter Reifen 2009 *Aedes atropalpus* (Scholte et al., 2009) und in Reifenlieferungen aus Florida 2010 *Aedes aegypti* (Brown et al., 2011) gelangten die Mücken in die Niederlande. Als größter Seehafen Europas nimmt Rotterdam eine große Bedeutung im Im- und Export von Waren ein. So könnten durch weitere Transportwege via Schiff auf dem Rhein oder via LKW über die Autobahnen die Mücken mit der importierten Ware nahezu unbemerkt nach Deutschland gelangen.

Die Entwicklung von Virusnachweisverfahren und serologischen Verfahren würde den Anteil aseptischer arboviraler Meningoenzephalitiden am Gesamtanteil der aseptischen Meningoenzephalitis-Fälle in Endemiegebieten ermöglichen und einen Aufschluss über die tatsächliche Verbreitung der Arboviren in Europa ermöglichen.

1.1.4 Virale Struktur und Genomaufbau

1.1.4.1 Reoviridae

TRBV (Genus Orbivirus) und EYAV (Genus Coltivirus) gehören zu der Familie der Reoviridae. Das Genom der Reoviren besteht aus 10-12 doppelsträngigen RNA-Segmenten mit einer Gesamtlänge von ca. 20kb bei den Orbiviren und ca. 30kb bei den

Coltiviren (siehe Abb. 1.4 A-C) die für 10-13 Proteine kodieren. TRBV wurde erstmalig 1963 aus Zecken aus dem Tribec-Gebirge (Slowakei) isoliert (Gresikova et al., 1965; Libikova et al., 1964), EYAV 1972 in Eyach, einem Ortsteil von Eutingen im Gäu, nahe Tübingen, Deutschland, aus *Ixodes ricinus* (Rhesse-Küpper B, 1976).

Die nicht-umhüllten Viruspartikel sind aus drei Kapsidschichten aufgebaut, dem inneren, mittleren und äußeren Kapsid (siehe Abb. 1.4 A). Diese bestehen bei den Orbiviren aus den viralen Proteinen VP3 (inneres Kapsid), VP7 (mittleres Kapsid), VP2 und VP5 (äußeres Kapsid). Auf Grund einer abweichenden Nomenklatur der Segmente der Coltiviren ist das VP6 von EYAV vergleichbar mit dem VP5 von TRBV, liegt ebenfalls auf Segment 6 und kodiert für ein Protein des äußeren Kapsids.

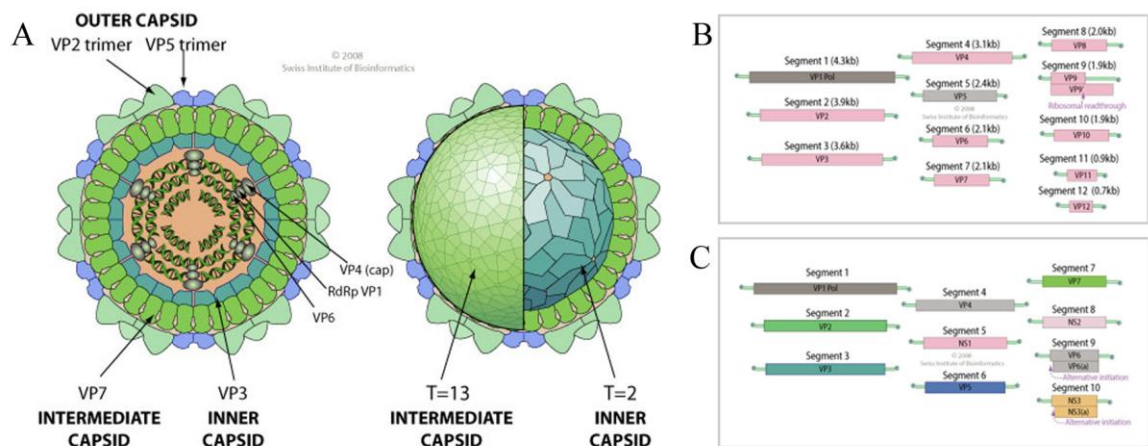


Abb. 1.4: Darstellung Struktur und Genom von Orbivirus und Coltivirus, Familie der Reoviridae. (Quelle: ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics) **A:** Darstellung der Struktur eines Viruspartikels (hier Orbivirus), unterteilt in inneres (VP3), mittleres (VP7) und äußeres (VP2 und VP5) Kapsid. Durchmesser: 60-80nm. **B:** Darstellung des Virusgenoms der Coltiviren mit 12 doppelsträngigen RNA-Segmenten, die für 13 Proteine kodieren und einer Gesamtlänge von ca. 30kb. **C:** Darstellung des Virusgenoms der Orbiviren mit 10 doppelsträngigen RNA-Segmenten, die für 12 Proteine kodieren und einer Gesamtlänge von ca. 20kb.

1.1.4.2 Bunyaviridae

Die Familie Bunyaviridae ist eine der größten Virenfamilien und umfasst mehr als 350 Mitglieder weltweit. Sie wurden unterteilt in fünf verschiedene Genera: Phlebovirus, Nairovirus, Orthobunyavirus, Hantavirus und Tospovirus (Fauquet, 2005).

Auch in dieser Arbeit gehört ein großer Teil der Viren zur Familie der Bunyaviren: Nairovirus (ERVEV), Orthobunyavirus (TAHV, INKV, BATV) und Phlebovirus

(BHAV, PALV, UUKV, SFSV, SFNV, SFTV, TOSV). Das Genom der Bunyaviren besteht aus 3 negativen, linearen einzelsträngigen RNA-Segmenten. Diese sogenannten L- (englisch: *large*), M- (englisch: *medium*) und S- (englisch: *small*) Segmente besitzen eine Größe von 6,4-12,2kb bzw. 3,2-4,9kb bzw. 1-3kb und kodieren für 4-6 Proteine (siehe Abb. 1.5 B-C).

Das L-Segment kodiert eine RNA-abhängige RNA Polymerase (L), das M-Segment zwei Oberflächen Glykoproteine (Gn und Gc) und für einige Viren ebenso ein Nichtstruktur-Protein (NSm), das S-Segment ein Nukleoprotein (N) und in einigen Fällen ein Nichtstruktur-Protein (NSs).

ERVEV wurde erstmalig 1982 in Saulges, Frankreich aus Hausspitzmäusen isoliert (Chastel et al., 1989), TAHV 1958 in Tahyna / Solwakei (Bardos & Danielova, 1959), INKV 1964 in Inkoo / Finnland (Brummer-Korvenkontio et al., 1973), BATV 1955 in Kuala Lumpur / Malaysia (Karabatsos, 1978). Calovo Virus ein Stamm des europäischen BATV weist auf Nukleinsäureebene eine über 80%ige Homologie in S- M- und L-Segment zu BATV auf (Dilcher et al., 2013). Isoliert wurde Calovo Virus 1962 aus Stechmücken in der damaligen Tschechoslowakei (Bardos & Cupkova, 1962). In dieser Arbeit wurde mit BATV gearbeitet, das eine 97%ige Homologie des N-Proteins auf Proteinebene zu Calovo Virus zeigt. Das N-Protein des BATV detektiert entsprechend auch Antikörper gegen den europäischen BATV Stamm Calovo Virus. UUKV wurde 1959 in Uukuniemi, Finnland aus Zecken (Oker-Blom, 1964) und BHAV 1954 ebenfalls aus Zecken in Bhanjanagar / Indien (Shah & Work, 1969) isoliert und ist seitdem mehrmals im Mittelmeerraum beschrieben worden. (siehe Abb. 1.1). Das erste Mal in Europa wurde BHAV 1967 in Italien isoliert (Verani et al., 1970). PALV wurde erstmalig 1992 in Portugal (Filipe et al., 1994) isoliert.

Bei den Sandmückenfiebertviren erstmals klinisch beschrieben von Alois Pick 1886 in der Balkanregion wurde 1943 SFSV isoliert: zuerst aus dem Serum eines kranken Soldaten in Ägypten während des Zweiten Weltkrieges und später aus Seren erkrankter Soldaten amerikanischer Truppen auf Sizilien. Nahezu zeitgleich wurde 1944 aus Seren erkrankter Soldaten SFNV in Neapel isoliert (Sabin, 1951). Es folgten die Isolationen des TOSV 1971 in der Toskana / Italien (Verani, Nicoletti & Ciufolini, 1984) und verhältnismäßig neu 2010 SFTV aus Patientenseren in der Türkei (Carhan et al., 2010).

Nach 6 Monaten Stationierung auf Zypern waren schwedische Soldaten seropositiv auf SFNV, SFSV und TOSV (Eitrem, Vene & Niklasson, 1990), wahrscheinlich bedingt durch Kreuzreaktivitäten des dort vorkommenden zyprischen Sandmückenfiebers Stammes SFCV, das sich in 6,7% zu SFSV auf Nukleinsäureebene unterscheidet (Eitrem, Stylianou & Niklasson, 1991; Papa et al., 2006).

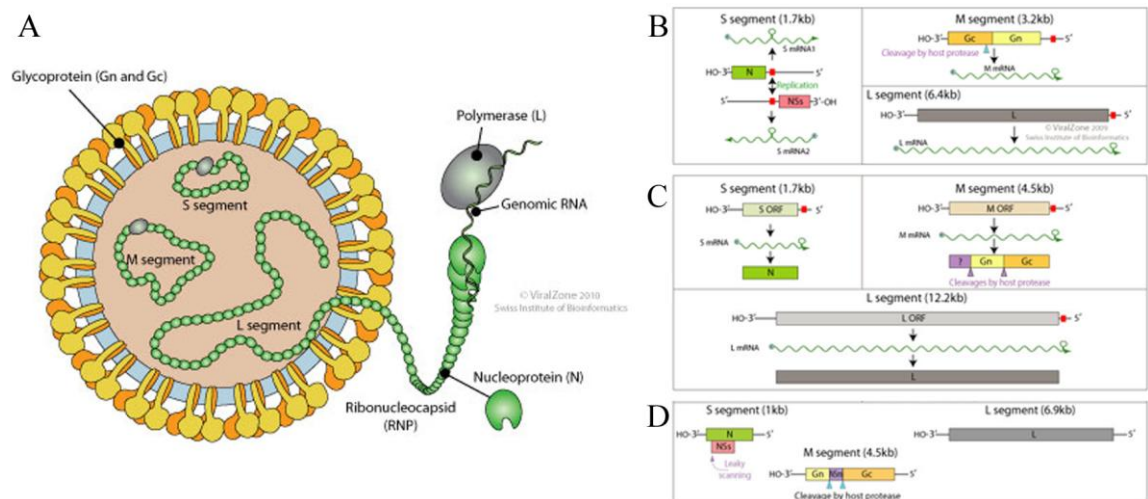


Abb. 1.5: Darstellung Struktur und Genom der Bunyaviridae. (Quelle: ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics) A: Darstellung der Struktur eines Viruspartikels. Durchmesser: 80-120nm. Darstellung des Virusgenoms der Phleboviren (B), Nairoviren (C), Orthobunyaviren (D) mit ihren jeweils unterschiedlich großen drei negativen, einzelsträngigen RNA-Segmenten: S (1-3kb), M (3,2-4,9kb), L (6,4-12,2kb).

1.1.4.3 Flaviviridae

TBEV und WNV gehören zu der Familie der Flaviridae. Das Genom der Flaviviren besteht aus einem linearen, einzelsträngigen RNA-Segment mit einer Gesamtlänge von ca. 10-12kb (siehe Abb. 1.6 B), das für ein Polyprotein kodiert, welches durch wirtseigene Proteasen prozessiert wird. Teile dieses Polyproteins kodieren für das Kapsid-Protein (englisch: *Capsid C*), das Membran-Protein (M), die E-Dimere (englisch: *envelope: E*). NS1, NS2A und NS2B kodieren für unterschiedliche Nichtstrukturproteine, blau dargestellt in Abb. 1.6.

TBE wurde erstmalig 1931 von H. Schneider (Schneider, 1931) in Österreich als epidemische akute Meningitis serosa beschrieben und TBEV konnte 1949 isoliert werden (Kolman JM, 1973). WNV wurde im Rahmen einer Malariastudie 1937 im West-Nil-Distrikt von Uganda entdeckt und isoliert.

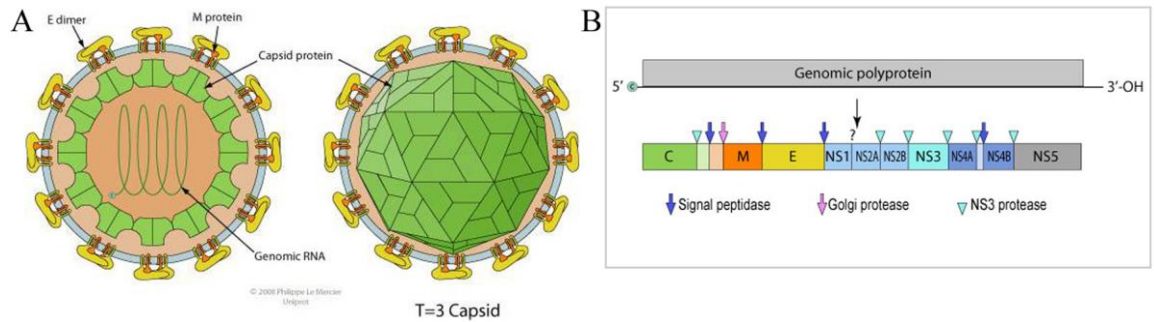


Abb. 1.6: Darstellung Struktur und Genom der Flaviviridae. (Quelle: ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics) **A:** Darstellung der Struktur eines Viruspartikels. Durchmesser: 50nm. **B:** Darstellung des Virusgenoms mit einem linearen einzelsträngigen RNA-Segment, das ein Polyprotein kodiert.

1.2 Cytometric-Bead-Array (CBA) und bisher bestehende Nachweismethoden

1.2.1 Bestehende Nachweismethoden

Um einzuordnen, wo die verschiedenen diagnostischen Nachweismethoden ansetzen ist in Abb. 1.7 das diagnostische Fenster dargestellt, in dem der Virustiter und die Antikörperantwort des Organismus gegen die Zeit aufgetragen sind. Nach einer Virusinfektion vermehren sich die Viren im Körper, der Titer steigt an (Virämie). In dieser kurzen Phase können die Viren direkt z.B. durch PCR-Techniken oder durch einen gegen virale Antigene gerichteten ELISA (englisch: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) nachgewiesen werden. Da die akute Phase relativ kurz ist und Symptome einer Infektion oft erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten, gestaltet sich die rechtzeitige Probenentnahme oftmals schwierig.

Im weiteren Verlauf der Krankheit werden durch die Immunantwort Antikörper (in der frühen Phase IgM, später IgG) gebildet. Diese im Serum enthaltenen Antikörper können nach der Detektion Rückschlüsse auf die zuvor stattgefundene Infektion geben und eventuelle Spätfolgen durch anschließende Behandlung minimieren.

Die diagnostische Lücke beschreibt den Zeitraum zwischen dem Zeitpunkt der Infektion und dem Zeitpunkt ab dem die vorhergehende oder akute Anwesenheit eines Pathogens (z.B. Virus) in einem Organismus durch einen spezifischen Test sicher nachgewiesen werden kann.

Als extremes Beispiel sei die HIV-Infektion genannt. Hier kann ein Zeitraum von bis zu zwölf Wochen vergehen bis Antikörper im Serum nachweisbar werden.

Ein weiteres Beispiel ist die TBEV-Infektion, bei der bereits acht Tagen nach Infektion Antikörper (sowohl gegen Struktur Glykoprotein E, wie auch gegen Nichtstruktur Glykoprotein NS1) in Serum und Spinalflüssigkeit auftreten, diese sind mindestens bis zu zwei Monate nachweisbar (Matveeva et al., 1995). Bei einer potentiellen TBEV-Infektion muss ein signifikanter Serumtiteranstieg gemessen werden, damit das Ergebnis als bewiesen positiv bewertet werden kann. Signifikant bedeutet im Falle von austitrierbaren Testverfahren (z.B. Hämagglutinationstest, IFT, ELISA) einen Anstieg von mindestens zwei Titerstufen. Dazu sind eine Blutabnahme möglichst rasch nach Infektion und eine zweite nach weiteren zwei Wochen nötig. Wird der Zeitpunkt der zweiten Abnahme zu früh gewählt, kann der Anstieg nicht oder nicht signifikant nachweisbar sein und es kann zu einem falsch negativen Ergebnis kommen.

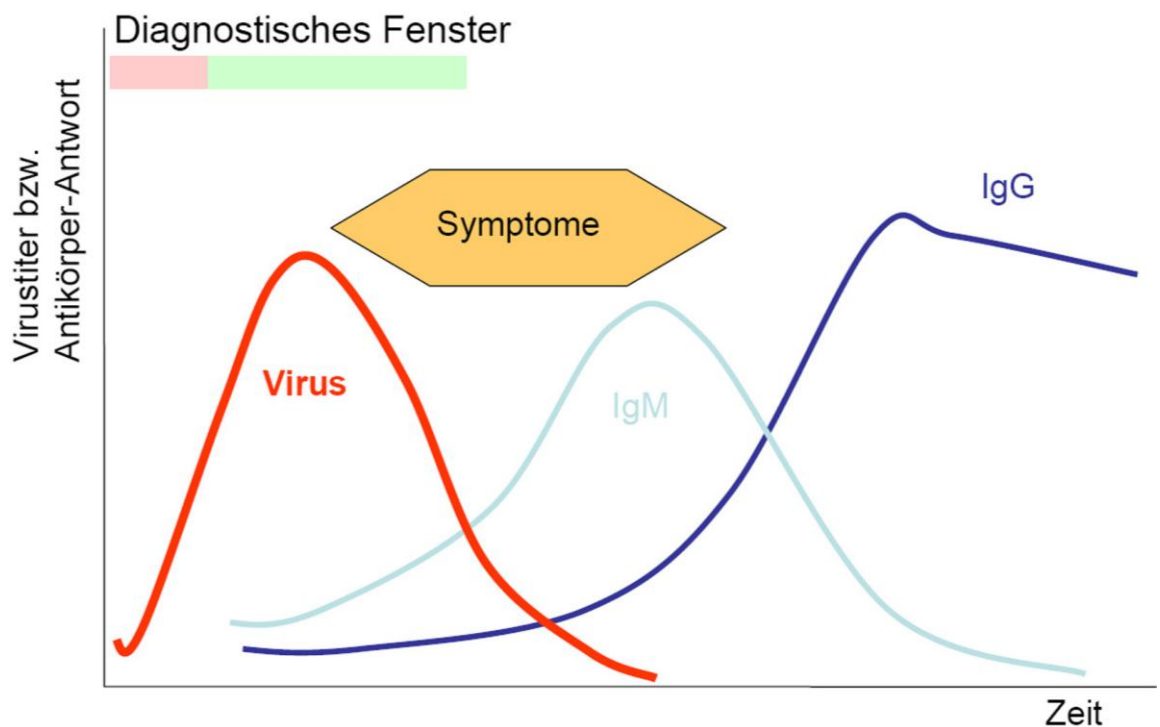


Abb. 1.7: Diagnostisches Fenster. Darstellung des Virustiters bzw. der Antikörper-Antwort nach Infektion mit einem Erreger aufgetragen gegen die Zeit. (Quelle: <http://molecular-virology.uni-hd.de>)

Die Länge der diagnostischen Lücke ist von Virus zu Virus unterschiedlich und muss bei einem Multiplex-Test berücksichtigt werden.

Obwohl sich die Probenentnahme wegen der zuvor genannten Gründe als schwierig gestaltet, wurde an einem Real-Time-PCR-Verfahren zum Direktnachweis des Virus für TRBV, UUKV, SFTV, BHAV und PALV gearbeitet (Weidmann et al., 2003b; Weidmann et al., 2008b). Andere auf PCR-Techniken beruhende Nachweise von TBEV (Suss et al., 1996) und Bunyaviren der Bunyamwera und Kalifornien Serogruppe (Kuno et al., 1996; Weidmann et al., 2003b) wurden ebenfalls über die Jahre etabliert. Weiterhin wurden RT-nested-PCR und Real-Time-PCR Verfahren für TOSV und andere Phleboviren (Weidmann et al., 2008b) und ein moderneres Microarray basiertes Nachweissystem zum Nukleinsäurenachweis entwickelt. Diese sogenannte Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) wurde mit einem Durchfluss-Microarray kombiniert und steht theoretisch für TBEV, TOSV, SFSV, SFNV, TAHV, INKV, BATV, UUKV zur Verfügung (Hasib et al., 2011).

Als letztes im Bereich der direkten Virusnachweismethoden sei das Next-Generation-Sequencing erwähnt. Diese Methode ist hochspezifisch, jedoch vergleichsweise zeit- und kostenintensiv und konnte bereits zur Bestimmung der Genome von BATV, BHAV, PALV, TRBV und ERVEV erfolgreich eingesetzt werden (Dilcher et al., 2012a; Dilcher et al., 2012b; Dilcher et al., 2012c). An einer Anwendung zum ungerichteten Nachweis aseptischer Meningoenzephalitis-auslösender Viren in Patientenmaterialien wird noch gearbeitet.

Serologische Nachweise von Antikörpern nach Virusinfektion existieren bislang größtenteils in Form von enzymatischen Immunadsorptionsverfahren (EIA) inklusive ELISA (basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion) und IFT (Immunfluoreszenztest siehe Kap. 2.2.5.1).

Zum Nachweis von TBEV IgG Antikörpern existieren mehrere industriell hergestellte EIA-Tests (englisch: *Enzyme Immuno Assay*). In einer früheren Studie wurden sechs dieser Tests auf Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen (Niedrig et al., 2001). Es hat sich gezeigt, dass alle Tests durch Kreuzreaktionen zu verwandten Flaviviren (Gelbfieber-Virus und Dengue-Virus) mitunter zu falsch positiven Ergebnissen geführt haben, so dass eine Verbesserung der Sensitivität und der Spezifität dieser Tests empfohlen wurde.

Ebenfalls können mit dem IFT indirekt Antikörper (IgG und IgM) durch eine Inkubation Virus-infizierter Zellen mit einem Serum und anschließender Inkubation mit einem zweiten fluoreszenzgekoppelten spezifischen Antikörper gegen die Serumantikörper mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Connie, Mahon & Manuselis, 1995). Nachteil dieser Methode ist die nicht gleichbleibende Auswertung der Ergebnisse, da die Fluoreszenz subjektiv durch eine Person durch Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt und so über ein positives oder negatives Ergebnis entschieden wird.

Sowohl ELISA wie auch IFT sind für Einzelanalysen ausgelegt (pro Testansatz wird in der Regel der Nachweis von Antikörpern gegen einen Erreger untersucht). Entsprechend zeitintensiv und aufwändig gestaltet sich die Überprüfung eines Serums auf Antikörper gegen mehrere Erreger (Khan et al., 2005).

Die Entwicklung eines Tests der falsch positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen ausschließt, eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweist, objektiv auswertbar ist und simultan ein ganzes Spektrum verschiedener Virenantikörper in einem Ansatz nachweisen kann und entsprechend nur ein geringes Probenvolumen benötigt, wäre demnach wünschenswert und ist Ansatzpunkt dieser Arbeit.

1.2.2 Aufbau und Prinzip der xMAP Technologie – Bio-Plex[®] MAGPIX[™]-System

Die Messungen des in dieser Arbeit entwickelten Tests wurden mit einem relativ neuen auf Fluoreszenz-basierenden Detektionsgerät namens MAGPIX[™] Multiplex Reader (Luminex Corporation) durchgeführt.

Das MAGPIX[™]-System beruht auf dem Prinzip der xMAP-Technologie lizenziert von Luminex Corp. und ermöglicht qualitative und quantitative Analysen von Proteinen und Nukleinsäuren (Houser, 2012). Es handelt sich um ein Analyseinstrument, welches statt der anfälligen Laser bisheriger Durchflusszytometer (z.B. FACS Canto II) licht-emittierende Dioden (LEDs) verwendet. Benutzt werden dabei für Multiplex-Tests derzeit bis zu 50 farbkodierte magnetische Mikrokugeln (Beads) pro Testansatz, bei einer derzeitigen Auswahl von 80 unterschiedlichen Bio-Plex Pro magnetic COOH-Beads (Bio Rad). Die Farbkodierung der Beads wird durch ihre Füllung mit unterschiedlichen

Verhältnissen zweier Fluoreszenzfarbstoffe (rot und infrarot: genaue Zusammensetzung Firmengeheimnis von Luminex Corp.) erreicht, was eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Beadpopulationen bei Auftragung beider Fluoreszenzsignale gegeneinander ermöglicht (siehe Abb. 1.8).

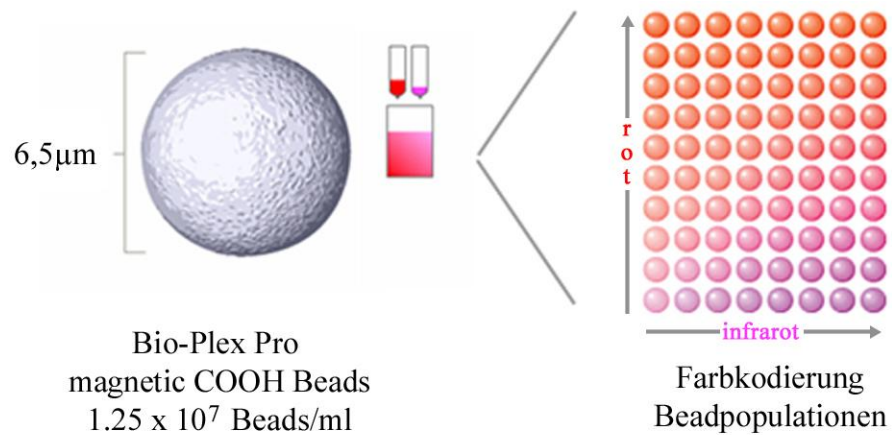


Abb. 1.8: Darstellung der multiplex Technologie mit Mikrokugeln (Beads). Die Beads sind farbkodiert durch Füllung mit unterschiedlichen Verhältnissen zweier Fluoreszenzfarbstoffe (rot und infrarot). Derzeit werden bis zu 80 verschiedene magnetische Beadpopulationen der Firma BioRad angeboten. (Quelle: <http://www.bio-rad.com/magpix>)

Bei der Messung am MAGPIX™-System wird der Ansatz nicht wie bei einem Durchflusszytometer vereinzelt und jede Mikrokugel (Bead) separat in einem laminaren Strom an verschiedenen Lasern vorbeigeführt sondern komplett in eine Kammer gezogen und dort auf einer Magnetplatte verteilt und immobilisiert (siehe Abb. 1.9). Anschließend erfolgt das Auslesen aller Beads parallel mit Hilfe eines CCD-Bildsensors (englisch: *charge-coupled device*).

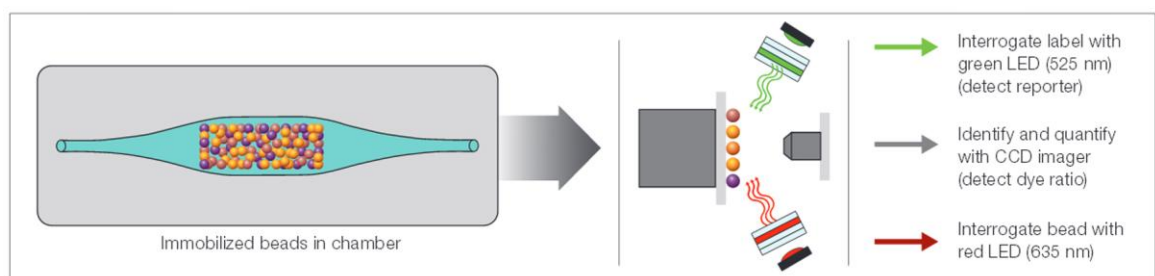


Abb. 1.9: Darstellung der immobilisierten magnetischen Beads beleuchtet mit LEDs und abgebildet durch CCD Technologie. Die rote LED (635nm) dient zur Abfrage der internen Verhältnisse der zwei Fluoreszenzfarbstoffe zur Identifizierung der internen Farbkodierung. Die grüne LED (525nm) dient zur Signalabfrage des Reporterfluoreszenzfarbstoffes zur Bestimmung der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) (Quelle: (Houser, 2012)).

In der Kammer werden die Beads mit einer roten LED mit einer Wellenlänge von 635nm bestrahlt, dies dient zur Identifizierung der vorhandenen Beadpopulationen an Hand der Farbkodierung. Die Eigenschaft, dass die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe (rot und infrarot) sich bei gemeinsamen Wellenlängen anregen lassen (635nm) aber über unterschiedliche, charakteristische Emissionsspektren verfügen (Maxima bei 680nm bzw. 775nm), ermöglicht die Differenzierung der einzelnen Beadpopulationen (siehe Abb. 1.10). Parallel zu der roten LED werden die Beads mit einer grünen LED (525nm) bestrahlt, was eine gleichzeitige Abfrage für das Phycoerythrin (PE)-Signal ermöglicht. Absorptionsspektrum siehe ebenfalls Abb. 1.10 in gelbgestrichelt dargestellt und das Emissionsmaximum bei 575nm.

Aufgenommen werden alle Signale mittels CCD-Bildsensor, der bereits 1970 von Willard Boyle und George E. Smith erfunden wurde. Dieses lichtempfindliche elektronische Bauelement, dessen Funktion auf dem inneren Photoeffekt beruht wird heutzutage in Videokameras und Digitalkameras eingesetzt. Der CCD-Flächensensor ermöglicht das einfache Erfassen zweidimensionaler Bilder, deren Informationen digital gespeichert werden. Diese Informationen werden dann zur Auswertung des gemessenen Testes verwendet und zeigen u.a. die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) für PE und die Anzahl der gemessenen Beads pro Beadpopulation. Ebenfalls kann für Quantitative Tests eine Konzentrationsermittlung an Hand einer mitgeführten Standardreihe erfolgen.

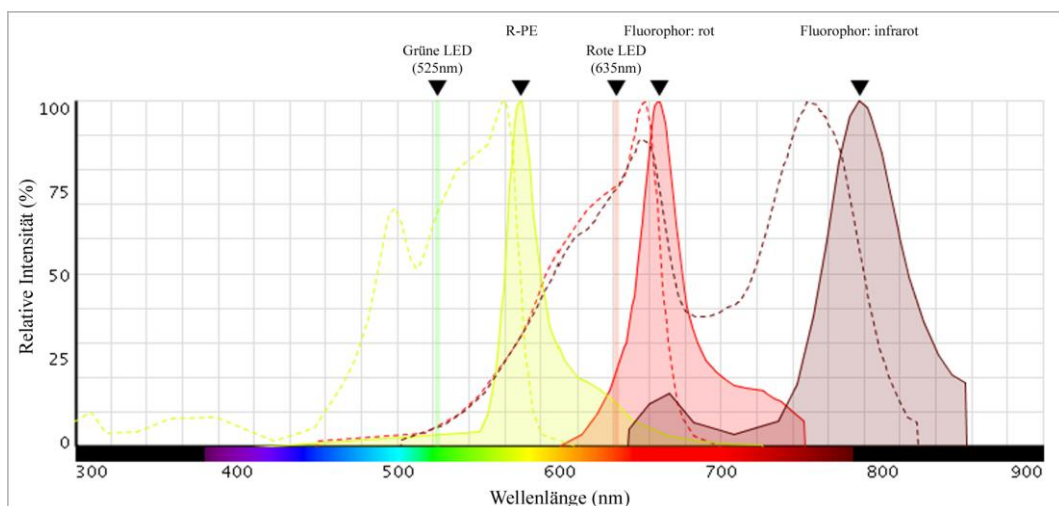


Abb. 1.10: Darstellung der Absorptions- und Emissionsmaxima bekannter Fluoreszenzfarbstoffe. Dargestellt sind die Absorptionsmaxima von PE (480nm, 565nm), APC (650nm), AF750-APC (650nm, 775nm) als gestrichelte Linien, die Emissionsmaxima von PE (575nm), APC (680nm), AF750-APC (775nm) als schraffierte Bereiche. Zusätzlich sind die anregenden LED Signale der Wellenlängen der grünen LED (525nm) und roten LED (635nm) angegeben. (Quelle: www.lifetechnologies.com, Fluorescence Spectra Viewer)

1.2.3 Multiplex Cytometric-Bead-Array (CBA) – Simultaner Antikörpernachweis von europäischen Arboviren

Bei dem in dieser Arbeit entwickelten zytometrischen Kugel-Test-Verfahren (englisch: *Cytometric-Bead-Array* „CBA“) handelt es sich um einen serologischen Nachweis von Antikörpern gegen humanpathogene Arboviren. Die Entwicklung des CBA als Simultanachweis (Multiplex-Nachweis) von Antikörpern ermöglicht die parallele Detektion gegen ein ganzes Spektrum an Viren in einer einzigen Patientenprobe. Es wurden insgesamt 15 durch Zecken, Stechmücken und Sandmücken übertragene europäische Arboviren (siehe Tabelle 1.1) erfasst.

Das Prinzip des CBA ist in Abb. 1.11 dargestellt und beschreibt einen auf Beads basierenden Flüssigphasen-Immunadsorptionstest. Im ersten Schritt werden mit Antigenen gekoppelte Beadpopulationen mit einem Serum inkubiert, dabei binden die antiviralen Antikörper des Serums spezifisch an die viralen Antigene auf den Beads. Im folgenden Schritt wird mit einem fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper inkubiert, der spezifisch an den F_c-Teil des Erstantikörpers bindet. Die Farbkodierung der Beads und das PE-Signal werden durch Fluoreszenzsignalmessung am MAGPIX™-System, wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, gemessen und ausgewertet.

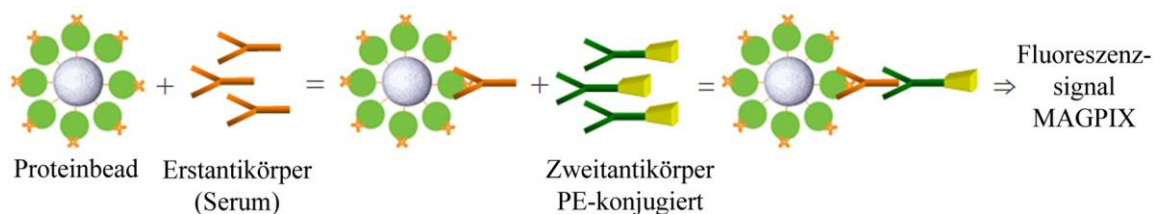


Abb. 1.11: Schematische Darstellung: Prinzip Cytometric-Bead-Array (CBA). Im ersten Inkubationsschritt binden die anti-viralen Antikörper des Serums spezifisch an die viralen Antigene auf den Proteinbeads. Im zweiten Inkubationsschritt bindet der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper spezifisch an den F_c-Teil des Erstantikörpers. Die Fluoreszenzsignalmessung erfolgt am MAGPIX™-System.

Hintergrund dieser Methode sind die Abwehrreaktionen unseres Immunsystems bei Infektionserkrankungen. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur Bildung von Antikörpern. Diese Antikörper sind gegen ein bestimmtes Virus gerichtet und besitzen die Fähigkeit spezifisch an Antigene auf der Virosoberfläche zu binden, so dass diese Viren vom Immunsystem erkannt und vernichtet werden können (siehe auch Kap.1.2.1).

Für den CBA wurden rekombinante virale Oberflächenproteine: Nukleoprotein N der Bunyaviren, Nichtstrukturprotein NS1 der Flaviviren und die Oberflächenproteine VP6

bzw. VP7 der Reoviren (siehe Kap.1.1.4) mit antigenen Eigenschaften exprimiert, gereinigt und kovalent an unterschiedliche farbkodierte Beadpopulationen gekoppelt.

Der Vorteil des CBA gegenüber den anderen in Kap.1.2.1 beschriebenen diagnostischen Nachweismethoden ist die Ermöglichung einer gleichzeitigen Detektion verschiedener Antikörper in einer Patientenprobe. Durch die simultane Messung wird das benötigte Probenvolumen gering gehalten und die Zeit zur Durchführung des Testes stark reduziert (Morgan et al., 2004).

Ein weiterer Vorteil des CBA ist die Bindungskinetik in flüssiger Phase die eine höhere Reaktionskinetik als an der festen Phase der EIA-Systeme erlaubt (Khan et al., 2005; Lal et al., 2005). Dadurch kann eine höhere Sensitivität des CBAs in kürzeren Inkubationszeiten im Vergleich zu ELISA- und IFT-Techniken erreicht werden.

Das Potential der auf Beads basierenden Multiplex-Tests im Vergleich zu bekannten anderen Nachweismethoden wurde bereits im Jahr 2000 erkannt (Vignali, 2000). Die Idee hingegen wurde schon Jahre zuvor aufgegriffen, 1982 wurde der erste Test zum Nachweis von humanem IgG entwickelt (Lisi et al., 1982). Mittlerweile steht eine Vielzahl von Bead-Assays zur Verfügung, mitunter zur Detektion humaner Antikörper gegen West Nil Virus (Wong et al., 2004) oder der Zytokin-Nachweis nach Virusinfektion (Maino & Maecker, 2004).

Einen Multiplex-Test für Arboviren auf Bead basierenden Fluoreszenzmessungen suchte man bisher allerdings vergebens.

1.3 Zielsetzung

Die Mehrzahl der beim Menschen auftretenden aseptischen Meningitis und Enzephalitis Fälle sind ätiologisch ungeklärt. Eine Reihe von europäischen Arboviren stehen im Verdacht Auslöser dieser Erkrankungen zu sein. Diese Wissenslücke gründet sich vor allem auf dem Mangel an standardisierten diagnostischen Verfahren.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Multiplex-CBA-Verfahrens zum simultanen Nachweis von Antikörpern (IgM und IgG) gegen 15 verschiedene europäische humanpathogene Arboviren.

Die dazu erforderlichen Schritte umfassen eine Vielzahl von aufeinander folgenden Techniken aus dem Bereich der Virologie, Zellbiologie, Molekularbiologie und Proteinchemie:

- ★ Virusanzucht aller aufgezählten Arboviren (RNA-Viren)
- ★ Amplifikation von Oberflächenproteingenen mittels PCR
- ★ Ligation der Oberflächenproteingene in Ausgangs- und Expressionsvektoren
- ★ Proteinexpression, Proteinreinigung und Proteinquantifizierung
- ★ Testung von polyklonalen Maus- und Humansenen (Positivseren)
- ★ Entwicklung eines IFTs zur Überprüfung der Positivseren
- ★ Entwicklung des CBAs zur Sensitivitäts- und Spezifitätsermittlung der Antigene zur Antikörperdetektion
- ★ Übertragung des CBAs auf einen Multiplex-CBA
- ★ Evaluation des Multiplex-CBAs an Hand von Patientenmaterial

Das entwickelte Multiplex-CBA-Verfahren wurde final an Proben erkrankter Patienten evaluiert, um neue Erkenntnisse über das Vorkommen und die Verbreitung von Arboviren bei ZNS-Erkrankungen zu erhalten. Mit dem hier entwickelten Testverfahren steht erstmals ein diagnostisches Verfahren zum Simultannachweis für die wichtigsten 15 europäischen Arboviren bereit und macht so künftig auch eine Risikoanalyse für das öffentliche Gesundheitswesen möglich.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle/ Hersteller
96 K Microplatte F-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Falconröhrchen (15ml, 50ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel, DE
Gewebekulturschalen (100x20mm)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Handschuhe – Latex und Nitril	Mikroflex Corporation, Vienna, AT
Mikroschraubgefäße (2,0ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
Objektträger multitest slide 12 well	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, DE
PCR- Reaktionsgefäße (0,2ml)	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
Pipettenspitzen mit Filter (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, DE
Pipettenspitzen ohne Filter (0,1-10µl, 1,0-100µl, 101-1000µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, DE
Protein-Lo-bind Tubes (0,5ml, 1,5ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
PVDF-Membran (0,3x 3,0m Rolle)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, DE
Safe-Lock-Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Schikanekolben (1000ml)	SCHOTT AG, Mainz, DE
Serologische Pipetten (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Slide-A-Lyzer G2 Dialysekassetten (3500 MWCO)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Strep-Tactin-Sepharose Säulen	IBA GmbH, Göttingen, DE
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.2: Geräte

Geräte	Bezugsquelle/ Hersteller
96-Well Microtiter Plate Magnetic Separation Rack	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, DE
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hannover, DE
Chemidoc XRS System	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, DE
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gefriertruhe (-140°C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Kühlschrank (5°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, DE
MAGPIX [®]	Luminex Corporation, Austin, USA
NanoDrop [®] ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Proteingelkammer	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
Rotator	Snijders, Tilburg, NL
Sterilbank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, DE
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Ultraschallbad	Bandelin electronic, Berlin, DE
Ultraschall-Desintegrator Branson-Sonifier Modell 250	G. Heinemann, Schwäbisch- Gmünd, DE
Vortex und Plattenvortex	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage	Satorius, Stedim biotech GmbH, Göttingen, DE
Westernblotkammer	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
Wippe	Schuett24 GmbH, Göttingen, DE
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.1.3 Chemikalien, Fertiglösungen

Tabelle 2.3: Chemikalien

Substanzen	Bezugsquelle/ Hersteller
1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimid (EDAC)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Acrylamid-Bis-Lsg. (40%)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
Albumin Standard (BSA) 2mg/ml	Thermo Scientific, Rockford, USA
Amidoschwarz	TMC-Bio Products, Rockland, USA
Ampicillin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Anhydrotetracyclin [25mg]	IBA GmbH, Göttingen, DE
β – Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bacto TM - Agar	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Bacto TM - Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Bacto TM - Tryptone	BD Biosciences, Heidelberg, DE
D(+) Biotin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, DE
Difco TM Skim Milk	BD Biosciences, Heidelberg, DE
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
DMEM - Medium	Lonza GmbH, Köln, DE
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
DNA- Längenstandard (1kbp, 100kbp)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, DE
DPBS	Lonza GmbH, Köln, DE
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid- Lsg.	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
FluoSave TM Reagent	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Glycin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
HEPES Puffer (1M)	Lonza GmbH, Köln, DE
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Laemmli Probenpuffer (SDS-PAGE)	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
MAGPIX [®] Drive Fluid	Luminex Corporation, Austin, USA
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE
MEM - Medium	c. c. pro GmbH, Oberdorla, DE
Molekulargewichtsmarker (10-170 kDa)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
N-hydroxysulfosuccinimid (NHSS)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Orange Loading Dye (6x)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, DE
Penicillin-Streptomycin (PEN / STREP) (je 10 000 Units)	Lonza GmbH, Köln, DE
Roti [®] -Block (10x)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Sarkosyl- L	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
SeraPlus special processed FBS (FKS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE
Tris	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom AG, Berlin, DE
X-Gal	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, DE

2.1.4 Lösungen, Medien und Puffer

Tabelle 2.4: Lösungen, Medien und Puffer

Name	Zusammensetzung
Agarosegel [1%ig]	100ml TAE-Puffer [1X], 1g Agarose, 5µl Ethidiumbromid-Lösung [Endkonz. 0,5µg/ml]

Amidoschwarz-Lösung	50mg Amidoschwarz gelöst in 112ml Methanol, 113ml ddH ₂ O
APS [10%]	1g Ammoniumperoxodisulfat (APS), ad 100ml ddH ₂ O
Blockierungspuffer (Western Blot)	12g Skim Milk, 120ml Waschpuffer (Western Blot)
Ethidiumbromid-Lösung	10mg/ml in ddH ₂ O
Glucoselösung (S.O.C. Medium)	36,03g Glucose [2M], ad 100 ml ddH ₂ O
Laufpuffer (SDS-PAGE)	100ml TGS [10X], 10ml SDS [10%], ad 1l ddH ₂ O
LB-Agar mit Amp	10g Bacto TM -Tryptone, 5g Bacto TM -Yeast Extract, 10g NaCl, 1ml Ampicillin [100µg/ml], 15g Bacto TM -Agar, ad 1l ddH ₂ O
LB-Agar mit Kana	10g Bacto TM -Tryptone, 5g Bacto TM -Yeast Extract, 10g NaCl, 1ml Kanamycin [100µg/ml], 15g Bacto TM -Agar, ad 1l ddH ₂ O
LB-Medium mit Amp	10g Bacto TM -Tryptone, 5g Bacto TM -Yeast Extract, 10g NaCl, 1ml Ampicillin [100µg/ml], ad 1l ddH ₂ O
LB-Medium mit Kana	10g Bacto TM -Tryptone, 5g Bacto TM -Yeast Extract, 10g NaCl, 1ml Kanamycin [100µg/ml], ad 1l ddH ₂ O
Mg ²⁺ -Lösung (S.O.C. Medium)	20,33g MgCl ₂ *6 H ₂ O [1M], 24,65g MgSO ₄ *7 H ₂ O [1M], ad 100 ml ddH ₂ O pH6,8
PBS [1X]	100ml PBS [10X], ad 900 ml ddH ₂ O
PBS [10X]	2g KCl, 2g KH ₂ PO ₄ , 80g NaCl, 5,76g N ₂ HPO ₄ , ad 1l ddH ₂ O
Sarkosyl-Lösung	0,4% Sarkosyl, 0,1M Tris, pH12,0
Sammelgel [12%] (SDS- PAGE)	0,25ml Acrylamid-Bis [40%], 0,325ml Tris pH6,8 [1M], 1,85ml ddH ₂ O, 25µl SDS [10%], 25µl APS [10%], 2,5µl TEMED
SDS [10%]	100g SDS, ad 1l ddH ₂ O
S.O.C. Medium	2g Trypton, 0,5g Hefeextrakt, 0,06g NaCl [10mM], 0,02g KCl [2,5mM], ad 100ml ddH ₂ O + 1ml Mg ²⁺ -Lösung + 1ml Glucoselösung

TAE [1X]	40ml TAE [50X] ad 1960ml ddH ₂ O
TAE [50X]	242g Tris: 57,1ml Essigsäure, 100ml EDTA pH8,0 [0,5M]
TGS [10X]	30,22g Tris, 144,13g Glycin, 1g NaN ₃ , ad 1l ddH ₂ O
Transferpuffer (Western Blot)	3g Tris, 14,4g Glycin, ad 1l ddH ₂ O
Trenngel [12%] (SDS- PAGE)	2ml Acrylamid-Bis [40%], 1,88ml Tris pH8,8 [1M], 1,03ml ddH ₂ O, 50µl SDS [10%], 50µl APS [10%], 5µl TEMED
Tris pH6,8 [1M]	121,14g Tris, ad 1l ddH ₂ O pH-Wert einstellen mit HCl
Tris pH8,8 [1M]	121,14g Tris, ad 1l ddH ₂ O pH-Wert einstellen mit HCl
Waschpuffer (Western Blot)	100ml PBS [10X], 5ml Tween [®] 20, ad 1l ddH ₂ O
Waschpuffer (Beads-MAGPIX)	50ml PBS + 10µl Tween [®] 20 [0,02%]
Zellkulturmedium - Infektionsmedium	500ml DMEM bzw. MEM, 2% FKS, 10mM Pen/Strep, 2mM Glutamin, 20mM HEPES
Zellkulturmedium - Wachstumsmedium	500ml DMEM bzw. MEM, 10% FKS, 10mM Pen/Strep, 2mM Glutamin

2.1.5 Reagenziensätze

Tabelle 2.5: Reagenziensätze

Name	Bezugsquelle/ Hersteller
Amersham [™] ECL [™] Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Europe NV, Brüssel, BE
Bio-Plex Amine Coupling Kit	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
Bio-Plex Pro magnetic COOH Beads # 26, #27, #29, #34, #35, #36, #37, #42, #44, #46, #52, #53, #54, #55, #62, #63, #65	Bio Rad Laboratories GmbH, München, DE
DNA Clean& Concentrator [™] -5 Kit	Zymoclean Research Corporation, Orange, USA
MAGPIX [®] Calibration Kit	Luminex Corporation, Austin, USA

MAGPIX [®] Performance Verification Kit	Luminex Corporation, Austin, USA
peq GOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
StarGate [®] Combi Entry Reagent Set	IBA GmbH, Göttingen, DE
StarGate [®] Transfer Reagent Set	IBA GmbH, Göttingen, DE
Strep-tag protein purification Buffer Set	IBA GmbH, Göttingen, DE
Zymoclean [™] Gel DNA Recovery Kit	Zymoclean Research Corporation, Orange, USA

2.1.6 Enzyme und Nukleotide

Tabelle 2.6: Enzyme und Nukleotide

Name	Bezugsquelle/ Hersteller
<i>Pfu</i> -Ultra [™] II Fusion DNA-Polymerase	Stratagene Europe, Amsterdam, NL
HindIII	Fermentas GmbH, Leon-Rot, DE
XbaI	Fermentas GmbH, Leon-Rot, DE

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen inklusive Puffer wurden von der Firma Fermentas GmbH (Leon-Rot, Deutschland) bezogen. Es handelt sich hierbei um Fast Digest[®] Enzyme und Puffer.

2.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 2.7: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle/ Hersteller
Top 10	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str ^R) endA1 nupG	IBA GmbH, Göttingen, DE
BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Stratagene Europe, Amsterdam, NL
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)] ^c	Zymo Research Corporation, Orange, USA

2.1.8 Zelllinien

Tabelle 2.8: Zelllinien

Zelllinie	Teilordnung - Art - Zelltyp	Bezugsquelle/ Hersteller
Vero B4	Affe – Afrikanische Grün Meerkatzen (<i>Cercopithecus aethiops</i>) – Nierenzellen	DSMZ GmbH, Braunschweig, DE
Vero E6	Affe – Afrikanische Grün Meerkatzen (<i>Cercopithecus aethiops</i>) - Nierenzellen	ATCC, Manassas, USA

2.1.9 Viren

Tabelle 2.9: Arboviren

Virus	Passage und Zeitpunkt der Ernte	Bezugsquelle
Batai (Calovo) Isolat 138	Passage 1, 7dpi (03.12.2008)	Aus Jugoslawien, isoliert u. lyoph. 1983 von J. Pilaski, Universität Düsseldorf
Bhanja-M3811	Passage 4, 7dpi (15.04.2011)	Maria João Alves, Center for Vectors and Infectious Diseases Research, National Institute of Health, Portugal
Erve	Passage 3, 13dpi (25.02.2003)	Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
Eyach Isolat 73	Passage 4, 14dpi (09.11.2011)	Isoliert u. lyoph. von Rehse-Küppers und Pilaski 1980, Universität Düsseldorf
Inkoo	Passage 4, 2dpi (25.07.2009)	Lyophilisat erhalten von R. E. Shope, University of Texas, Galveston, Texas
Palma M3443	Passage 4, 7dpi (15.04.2011)	Maria João Alves, Center for Vectors and Infectious Diseases Research, National Institute of Health, Portugal
SF Naples Oct-85 Sabin	Passage 4, 3dpi (16.01.2012)	Tino F. Schwarz, Stiftung Juliusspital, Würzburg
SF Sicilian Oct-85 Sabin	Passage 3, 5dpi (30.06.2008)	Tino F. Schwarz, Stiftung Juliusspital, Würzburg
SF Turkish (SFTR19/2)	Passage 2, 5dpi (14.02.2009)	Isoliert 2008 von Ahmed Çarhan, Refik Saydam National Public Health Agency, Ankara, Türkei
TBEV Hyper Isolat 68	Passage 1, 16dpi (31.07.2008)	Aus Wien, isoliert und lyoph. 1980 von J. Pilaski, Universität Düsseldorf

Tahyna Isolat 147	Passage 3, 3dpi (24.04.2008)	Isoliert 1982, lyoph. 1983 von J. Pilaski, Universität Düsseldorf
Toscana Virus ISS.Ph1.3	Passage 4, 3dpi (13.02.2012)	Tino F. Schwarz, Stiftung Juliuspital, Würzburg
Tribec	Passage 1, 3dpi (29.08.2008)	Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundes- wehr, München
Uukuniemi	Passage 1, 7dpi (31.01.2008)	Anna Överby, Department of Clinical Microbiology, Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Umeå University, Sweden
West Nil Isolat 323	Passage 3, 2dpi (25.07.2008)	Isoliert und lyoph. 1985 von J. Pilaski, Univ. Düsseldorf

2.1.10 Antikörper

Tabelle 2.10: Antikörper

Name	Bezugsquelle/ Hersteller
R-PE-conjugated Affini Pure Goat Anti-Human IgG, Fc ₁ Fragment Specific	Dianova GmbH, Hamburg, DE
R-PE-conjugated Affini Pure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Human IgM Fc5 _μ Fragment specific	Dianova GmbH, Hamburg, DE
R-PE-conjugated Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (subclasses 1+2a+2b+3), Fc _γ Fragment Specific	Dianova GmbH, Hamburg, DE
R-PE-conjugated Affini Pure F(ab') ₂ Fragment Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Dianova GmbH, Hamburg, DE
Cy TM 3 - conjugated Affini Pure Goat Anti-Human IgA, IgG, IgM (H+L)	Dianova GmbH, Hamburg, DE
Cy TM 3-conjugated Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Dianova GmbH, Hamburg, DE
Anti- <i>Escherichia coli</i> Polyclonal Rabbit	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Anti-Rabbit IgG, HRP conjugate (Western Blot)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
Strep-Tactin-R-PE (Kopplungsbeweis)	IBA GmbH, Göttingen, DE
Strep MAB - Classic, HRP conjugate [Anti-Strep-tag [®] II-HRP] (Western Blot)	IBA GmbH, Göttingen, DE

2.1.11 Ausgangs-DNA

Tabelle 2.11: Vorhandene cDNA bzw. rekombinante Plasmide mit Zielsequenz

Name	Name und Länge der Zielregion^(*)
Batai-S-in pCRII Klon 2	Nukleokapsid Protein Gen (N): 696bp
BhanjaV cDNA	Nukleokapsid Protein Gen (N): 738bp
Erve-pCRII-Mini-Klon 14	Nukleokapsid Protein Gen (N): 1887bp
EyachV cDNA 1B	Virales Protein Gen (VP6): 2094bp
Inkoo-S-in pCRII Klon 66	Nukleokapsid Protein Gen (N): 702bp
PalmaV cDNA	Nukleokapsid Protein Gen (N): 738bp
SFN-S-Segment in pCRII	Nukleokapsid Protein Gen (N): 756bp
SFS-Nr.52	Nukleokapsid Protein Gen (N): 735bp
SFT-pCRII-170610-9	Nukleokapsid Protein Gen (N): 735bp
Tahyna-S-pCRII	Nukleokapsid Protein Gen (N): 702bp
TBEV-NS1-pCRII-Klon 14	Nichtstruktur Protein Gen (NS1):1056bp
Toscana-240699	Nukleokapsid Protein Gen (N): 756bp
Tribec-p7-Adapter-RHR cDNA-B	Virales Protein Gen (VP7): 1068bp
DNA-Uuk-Klon6	Nukleokapsid Protein Gen (N): 759bp
WNV-NS1-pCRII Klon3	Nichtstruktur Protein Gen (NS1):1032bp

^(*) Länge der Zielregion ohne Start- und Stopp-Kodon.

Die verwendete cDNA wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Manfred Weidmann, Institut für Virologie Göttingen. Nach Virenanzucht und Virenernte wurde die cDNA mittels Transcriptor Kit von Roche nach Protokoll des Herstellers generiert und teilweise in den pCRII-Vektor (Invitrogen) kloniert.

2.1.12 Plasmide

Tabelle 2.12: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle/ Hersteller
pCRII	3900bp Klonierungsvektor	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
pENTRY-IBA51	1860bp Donorvektor	IBA GmbH, Göttingen, DE
pASG-IBA5	3202bp Expressionsvektor N-terminaler Strep-Tag [®] II	IBA GmbH, Göttingen, DE

2.1.13 Oligonukleotide

Tabelle 2.13: Oligonukleotide

Name	Sequenz
BATV-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG ATTGAGTTGGAATTCAATGATGT-3'
BATV-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCCC ATACTGATAACCAAACCTTTGCT-3'
BhanjaV-N-SG-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GTTGCATACACTGACATCCTT-3'
BhanjaV-N-SG-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCCT TCCAATTTTCCCAAGCTGC-3'
ERVE-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GAGAACCTAATTGACTTTTCGG-3'
ERVE-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCC CTTGAAGAGATTTATAGTAGTGT-3'
EYA-VP6-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GCAGCCCGACTTCCAATCG-3'
EYA-VP6-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCCG CCTGTTAAAATATCTATAACCG-3'
INKV-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GGAGATTTGGTTTTCTATGATG-3'
INKV-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCC CAGGCAGCTTTACACCAAATTTG-3'
PalmaV-N-SG-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GTTGCATACACTGATATCCTTA-3'
PalmaV-N-SG-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCCT TCCAATTTTCCAGGCTGC-3'
SFN-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG TCTGAGGAGA ACTATCGTGAG-3'
SFN-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCCC GTGCCACCTTAGAGCAG-3'
SFS-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GACGAGTACCAGAAAATTGCT-3'
SFS-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCC CTCTAGTTTCTGTAAACTTCT-3'
SFTV-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GACGAGTACCAGAAAATTGCT-3'
SFTV-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCC CTCCAGTTTCTATAAGCTTC-3'
TAHV-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG TCTGATTTGGTTTTTTATGATGTC-3'
TAHV-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCCT GAGTCTGATTCCAAATTTTC-3'
TBE-NS1-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GATGTTGGTTGCGCTGTGG-3'
TBE-NS1-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCCC CGCAACCACCTTGAGCGA-3'
TOSV-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG TCAGACGAGAATTATCGCGAT-3'
TOSV-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCC CTTGCCAACCTTGGCGCG-3'
TRBV-VP7-Star-F	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GACGCGTACACTGCACGAG-3'
TRBV-VP7-Star-R	5'-AGCGGCTCTTC TCCC CTGACCCAGCCTGAAGGC-3'
UUKV-N-Star-FP	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GCTATGCCGGAGAATTGGG-3'
UUKV-N-Star-RP	5'-AGCGGCTCTTC TCCC GATCAATGATCTGAGGACAGT-3'
WNV-NS1-Star-F2	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GACACTGGGTGTGCCATAG-3'
WNV-NS1-Star-R2	5'-AGCGGCTCTTC TCCCT GTCTTTTCATCATGTCTCTGT-3'
WNV-NS1-Star-F4	5'-AGCGGCTCTTC AAATG GACACTGGATGTGCCATAGA-3'
WNV-NS1-Star-R4	5'-AGCGGCTCTTC TCCC CAGCATTCACTTGTGACTGCAC-3'
ENTRY-Primer-for2	5'-GCGAAACGATCCTCGAAG-3'
ENTRY-Primer-rev	5'-CCCCTGATTCTGTGGATAACCG-3'
ASG-Primer-for	5'-GAGTTATTTTACCACTCCCT-3'
ASG-Primer-rev	5'-CGCAGTAGCGGTAAACG-3'
ERVE-N-internal	5'-ATGATTGCCAGAAGAGGAGG-3'

Orange hervorgehobene Bereiche kennzeichnen die StarCombinase1TM Erkennungssequenz. **FETT** hervorgehobene Bereiche kennzeichnen die Kombinatorische Sequenz.

Unterstrichene kursive Bereiche innerhalb der Sequenzen zeigen das Start-Kodon (ATG).

2.1.14 Seren

Tabelle 2.14: Positivseren

Name ,Virus (Ursprung)	Freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von:
Anti-Calovo, Batai Virus (Maus)	RNDR. Daniel Růžek PhD, Department of Molecular Ecology of Parasites, Ceske Budejovice, Czech Republic
Anti-Bhanja, Bhanja Virus (Maus)	Dr. Boris Klempa, Institute of Virology Slovak Academy of Science (IVSAS), Bratislava , Slovakia
Anti-Erve, Erve Virus (Maus)	OFA Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland
Anti-Eyach, Eyach Virus (Maus)	RNDR. Daniel Růžek PhD, Department of Molecular Ecology of Parasites, Ceske Budejovice, Czech Republic
Inkoo Virus	Kein Positivserum vorhanden, Nutzung von Anti-Tahyna 181 wegen bekannter Kreuzreaktivität
Anti-Palma M4746, Palma Virus (Maus)	Maria João Alves, Center for Vectors and Infectious Diseases Research, National Institute of Health, Águas de Moura, Portugal
Nap1, SFN Virus (Human)	Koray Ergunay MD. PhD Assistant Prof, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey
S18, SFS Virus (Human)	Koray Ergunay MD. PhD Assistant Prof, Hacettepe University Faculty of Medicine, Turkey
SC1, SFT Virus (Human)	Koray Ergunay MD. PhD Assistant Prof, Hacettepe University Faculty of Medicine, Turkey
Anti-Tahyna 181, Tahyna Virus (Maus)	RNDR. Daniel Růžek PhD, Department of Molecular Ecology of Parasites, Ceske Budejovice, Czech Republic
RSSE-AK IgG, TBE Virus (Maus)	OFA Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland
T6, Toscana Virus (Human)	Koray Ergunay MD. PhD Assistant Prof, Hacettepe University Faculty of Medicine, Turkey

Anti-Tribec, Tribec Virus (Maus)	Dr. Boris Klempa, Institute of Virology Slovak Academy of Science (IVSAS), Bratislava , Slovakia
Anti Uuk, Uukuniemi Virus (Maus)	RNDr. Daniel Růžek PhD, Department of Molecular Ecology of Parasites, Ceske Budejovice, Czech Republic
West Nil MIAF MG61369, West Nil Virus (Maus)	OFA Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

2.1.15 Software

Tabelle 2.15: Computerprogramme zur Datenauswertung und Erstellung der Dissertation

Name	Hersteller	Anwendung
Adobe-Illustrator	Adobe Systems Inc.	Bildbearbeitung
Adobe-Photoshop	Adobe Systems Inc.	Bildbearbeitung
EndNote X7	Thomson Reuters	Literaturverwaltung
GraphPad Prism 6	GraphPadSoftware Inc.	Graphische Datenauswertung
Lasergene™	DNASTAR Inc.	DNA-Sequenzanalyse, Plasmidkonstruktion und phylogen. Analysen
Microsoft Office 2007	Microsoft Inc.	Text- und Datenverarbeitung
StarPrimer D´Signer 3.0.0.3	IBA GmbH	Berechnung der Oligonukleotidsequenzen, Erstellung Klonierungsprotokolle zur optimalen pENTRY Klonierung
xPONENT 4.2	Luminex Corporation	Steuerung der Messungen des Fluoreszenz-Detektions-Systems basierend auf xMAP® Technologie (MAGPIX™)

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Zellkulturen

2.2.1.1 Anzucht von Viren in Zellkultur

Für die Anzucht der Viren aus vorhandenem Virusüberstand (siehe Tabelle 2.9) wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet, Vero-E6- Zellen und Vero-B4-Zellen. Es handelt sich hierbei um zwei etablierte Zelllinien, die beide aus Nierengewebe der grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) stammen (Macfarlane & Sommerville, 1969). Beide Zelllinien weisen eine fibroblastenähnliche Morphologie auf und wachsen adhärent.

Die Vero-E6 Zellen wurden in 12ml Wachstumsmedium mit DMEM, die Vero-B4 Zellen in 12ml Wachstumsmedium mit MEM unter 5% CO₂ bei 37°C in T75 Zellkulturflaschen kultiviert.

Die Virusinfektion erfolgte nach Erreichen einer etwa 75%igen Konfluenz der Zellen der jeweiligen empfohlenen Zelllinie (siehe Tabelle 2.16) für optimale Vermehrungs- und Wachstumsbedingungen je Virus.

Tabelle 2.16: Empfohlene Zelllinie je Virus

Zelllinie	Virus
Vero-B4	UUK, SFN, TRB, SFT, TAH, BAT, SFS, TOS
Vero-E6	ERVE, WNV, BHA, PAL, TBE, INK, EYA

Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz der Zellen wurde das Wachstumsmedium entfernt, die Zellen mit 5ml PBS [1X] gewaschen und je Virus zwei T75 Zellkulturflaschen mit 1ml Virusüberstand infiziert. Die Zellen wurden 1h bei 37°C unter 5% CO₂ inkubiert, anschließend wurden jeweils 11ml Infektionsmedium (Vero-E6 Zellen mit DMEM, Vero-B4 Zellen mit MEM) zugegeben und bis zum Erreichen des gewünschten cytopathischen Effektes (CPE) von 20-50% unter 5% CO₂ bei 37°C inkubiert. Dieser CPE trat je nach Virus zwischen 1 – 14 Tagen nach Infektion auf. Zusätzlich wurde zu jeder Virusinfektion zeitgleich eine weitere T75 Zellkulturflasche ohne Zugabe von Virus, als Negativkontrolle, mitgeführt (Ergebnisse siehe Kap. 2.2.5.1).

2.2.1.2 Fixierung infizierter Zellen auf Objektträger

Zur Überprüfung der vorhandenen Positivseren wurde ein Immunfluoreszenztest (IFT) (siehe Kap. 2.2.5.1) entwickelt. Hierzu wurden die mit Virus infizierten Zellen zuvor auf Objektträger mit zwölf voneinander getrennten Feldern fixiert. Die Viren wurden zur ungefährlichen Austestung inaktiviert.

Nach Erreichen eines CPEs von 20-50% der infizierten Zellen wurde der Zellüberstand abgenommen und verworfen. Die verbliebenen intakten Zellen wurden je Zellkulturflasche mit PBS [1X] gewaschen, hierzu wurden 5ml PBS [1X] zugegeben, die Zellkulturflasche geschwenkt und der Überstand anschließend vollständig entfernt. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erfolgte durch Zugabe von 2ml Trypsin-Lösung. Nach kurzem Schwenken wurde die Trypsin-Lösung vorsichtig abgenommen und verworfen, erneut 2ml Trypsin auf die Zellen gegeben, 2min bei 37°C stehen gelassen und die Trypsin-Lösung wieder vorsichtig entfernt. Die Zellkulturflaschen wurden sanft mit der Hand angeschlagen, so dass sich die Trypsin-behandelten Zellen vom Boden lösten.

Je Virus wurde entsprechend mit zwei T75 Zellkulturflaschen mit infizierten Zellen und der zugehörigen T75 Zellkulturflasche mit nicht infizierten Zellen (Negativkontrolle) verfahren und anschließend durch Zugabe von 3ml Medium (Vero-E6 Zellen mit DMDM, Vero-B4 Zellen mit MEM) ohne FKS der Inhalt aller drei Zellkulturflaschen in 3ml Endvolumen vereinigt.

Das so entstandene 2:1 Gemisch (zwei Teile mit Virus infizierten Zellen zu einem Teil nicht infizierter Zellen) wurde auf zuvor mit Isopropanol gereinigten und vollständig getrockneten Objektträger pipettiert. Je Feld wurden 10µl Zellgemisch getropft und bei RT getrocknet. Je Virus wurden 15 Objektträger mit je 12 Feldern vorbereitet.

Nach vollständiger Trocknung wurden die Objektträger in PBS [1X] gewaschen und zur Fixierung und gleichzeitigen Inaktivierung der Viren in ein -20°C kaltes Methanol-Aceton Gemisch (im Verhältnis 1 Teil Methanol zu 2 Teilen Aceton) gegeben und 30min bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

Abschließend wurden die Objektträger mit PBS [1X] gewaschen, bei RT vollständig getrocknet und bis zur Durchführung des Immunfluoreszenztestes (IFT) bei -20°C gelagert.

2.2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.2.1 Spektrophotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen

Die Konzentration wässriger DNA- und RNA-Lösungen kann durch Messung der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge von 260nm (Absorptionsmaximum von Nukleotiden) mittels eines Spektralphotometers (Nano Drop[®] ND-100) bestimmt werden. Verunreinigungen wie aromatische Aminosäuren oder Phenole absorbieren Lichtwellen bei 280nm, so dass durch die Messung der OD₂₈₀ eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäurelösung möglich ist. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ sollte für relativ proteinfreie DNA- bzw. RNA-Präparationen zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Sambrook, 1989).

Für die Messung wurden 1,5µl Probenvolumen eingesetzt und das Gerät gegen den entsprechenden Probenpuffer (ddH₂O) geeicht.

2.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, kurz PCR) (Mullis & Faloona, 1987) gehört zu den Standardmethoden der Molekularbiologie und dient zur *in vitro* Amplifikation großer Mengen einer spezifischen DNA-Sequenz (Template). Diese Vervielfältigung der DNA-Sequenz wird erreicht durch einen dreistufigen zyklischen Prozess:

I. Die Denaturierung:

Der erste Schritt ist die thermische Denaturierung der DNA-Probe durch Temperaturerhöhung auf 95°C, die DNA-Doppelstränge werden in zwei Einzelstränge geteilt. Das Reaktionsgemisch enthält neben dem entstandenen DNA-Template zusätzlich zwei Oligonukleotidprimer, die thermostabile DNA-Polymerase *Pfu*-Ultra[™] II Fusion und die vier Desoxyribonukleotide (dNTPs).

Bei der *Pfu*-DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* handelt es sich um eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion (englisch: *proof-reading*) zur Optimierung der Amplifikationsgenauigkeit.

II. Die Renaturierung (englisch: *Annealing*)

Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf ungefähr 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur (T_M), der Temperatur, bei der unter den Pufferbedingungen 50% der Oligonukleotide dissoziieren, gesenkt. Während der Temperatursenkung paaren die Primer mit den komplementären Sequenzen des DNA-Templates. Je höher diese *Annealing*-Temperatur ist, desto spezifischer erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer mit dem DNA-Template.

III. Die Synthese oder Elongation

Im dritten Schritt wird die Temperatur auf 72°C, dem optimalen Bereich für die katalytische Funktion der *Pfu*-UltraTM II Fusion DNA-Polymerase, erhöht.

Die DNA-Synthese beginnt an den 3'-OH-Enden der Primer. Die Polymerase verlängert (elongiert) in Gegenwart von dNTPs die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize. Es entstehen neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zum Template ist. Die Elongationszeiten wurden je nach Länge und Art des Templates entsprechend der vom Hersteller der verwendeten *Pfu*-UltraTM-II Fusion DNA-Polymerase (etwa 1kb pro 15sec für Plasmid-DNA Templates und 1kb pro 30sec für cDNA-Templates) angegebenen Zeiten berechnet. Jede zusätzliche Strangsynthese bedeutet eine neue Vermehrungsrunde, wobei auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrize dienen. Mit jedem neuen Zyklus steigt die Konzentration der amplifizierten Zielsequenzen exponentiell an.

Die PCR-Methode wurde in dieser Arbeit für die Amplifikation von Oberflächenproteinogenen bestimmter von Zecken, Stechmücken und Sandmücken übertragenen Viren (siehe Tabelle 1.1), sowie für die Sequenzierungsreaktion (siehe Kap. 2.2.2.4) verwendet.

Die PCR-Reaktion erfolgte in einem automatischen Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Die Amplifikationsprodukte wurden durch Präparative-Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.2.2.3.1) analysiert und extrahiert (siehe Kap. 2.2.2.3.2).

Beispiel: PCR-Ansatz (50µl- Ansatz in 0,5ml Reaktionsgefäßen)

- x µl Template (5-30ng)
- 1,0 µl Primer A (10pmol/µl)
- 1,0 µl Primer B (10pmol/µl)
- y µl ddH₂O
- 1,25µl dNTPs (10mM each)
- 5,0 µl 10X Pfu Ultra Buffer
- 1,0 µl *Pfu*-UltraTM II Fusion DNA-Polymerase
- ∑ 50,0 µl

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Reinigung, Trennung und Analyse von zirkulärer Plasmid-DNA und linearen DNA-Fragmenten verwendet. Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur Anode. Wird die angelegte Spannung gering gehalten, so ist die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer, doppelsträngiger DNA in einem Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Helling, Goodman & Boyer, 1974). Die Banden wurden durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht (302nm) am Chemidoc XRS sichtbar, da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch Vergleich mit dem DNA- Längenstandard (1kbp, 100kbp) abgeschätzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nano Drop[®] ND-100 (siehe Kap. 2.2.2.1).

2.2.2.3.1 Analytische und präparative Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration von 1,0% (w/v) Agarose verwendet und Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml zugegeben.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und in eine entsprechende Gelkammer mit bis zu 20 Taschen gegossen.

Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Orange Loading Dye [6X] versetzt und in die Taschen des mit TAE-Laufpuffer bedeckten Agarosegels pipettiert. Zusätzlich wurden je nach Größe der aufgetragenen DNA-Proben ein DNA-Längenstandard (1kbp oder 100kbp) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer [1X] bei einer konstanten Spannung von 80V für präparative Agarosegele und 110V für analytische Agarosegele.

Präparative Agarosegele wurden für möglichst kurze Zeit dem UV-Licht ausgesetzt, um Schäden in der DNA-Struktur zu vermeiden. In dieser Zeit wurden die Banden ausgeschnitten und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gelextraktion erfolgte mittels Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (siehe Kap.2.2.2.3.2). Die Nachweisgrenze Ethidiumbromid-gefärbter Gele liegt bei ca. 10ng DNA pro Bande. Das Agarosegel wurde auf dem Chemidoc XRS System mit Hilfe eines Kamerasystems dokumentiert.

2.2.2.3.2 DNA Extraktion mittels Zymoclean™

Für die Extraktion von DNA aus präparativen Agarosegelen wurde der Reagenziensatz Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymoclean Research Corporation) verwendet.

Die zuvor am Chemidoc XRS unter UV-Licht (302nm) mit einem Skalpell ausgeschnittenen DNA-Fragmente wurden gewogen und pro 100mg Gewicht mit 300µl ADB Buffer™ versetzt. Die Ansätze wurden auf 55°C maximal 10min erhitzt, bis das Gel und die darin enthaltenen DNA-Fragmente vollständig gelöst vorlagen. Anschließend wurde der gesamte Ansatz vollständig auf eine Zymo-Spin I™ Säule gegeben und 1min bei RT mit 10000UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 200µl Waschpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 30sec bei RT mit 10000UpM wurde der Durchfluss verworfen und der Waschschrift wiederholt. Anschließend wurde die Säule, um alle Reste des Waschpuffers zu entfernen, ohne Zugabe von Flüssigkeit, leer zentrifugiert. Um die DNA-Fragmente von der Säule zu lösen wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die isolierten DNA-Fragmente durch Zugabe von 10µl ddH₂O von der Säule eluiert. Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung siehe Kap. 2.2.2.1.

2.2.2.4 Sequenzanalyse

Die lineare Sequenzanalyse von DNA-Fragmenten erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977) mit fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden und wurde im Auftrag an die Firma Seqlab vergeben.

Alle pENTRY- und pASG-Konstrukte, in welchen die zu analysierende virale DNA als Insert vorliegt, wurden zuvor per peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (siehe Kap. 2.2.3.5) gereinigt. Je Konstrukt wurden 600ng DNA, 2µl Primer (10pmol/µl) und ggf. ddH₂O in einem Endvolumen von 8µl zur weiteren Bearbeitung vorgelegt. Für die Sequenzierung der pENTRY-Konstrukte wurden die pENTRY-Primer (ENTRY-Primer-for2 bzw. ENTRY-Primer-rev) verwendet, für die pASG-Konstrukte entsprechend die pASG Primer (ASG-Primer-for bzw. ASG-Primer-rev). Die Primersequenzen wurden vom Hersteller empfohlen und verwendet, es handelt sich hierbei um Sequenzabschnitte auf den jeweiligen Vektoren, die in der Nähe der Insertionsstelle vor bzw. hinter der kombinatorischen Sequenz liegen (siehe Tabelle 2.13).

2.2.3 Rekombinante Molekularbiologie

2.2.3.1 Donorvektor Herstellung mittels StarGate[®] Technologie

Nachdem die viralen DNA-Fragmente („GOI“ englisch: *gene of interest*) mittels PCR amplifiziert und an beiden Enden mit kombinatorischen Überhängen (AATG bzw. GGGG) und der StarCombinase1TM Erkennungssequenz (5'-AGCGGCTCTTC) verlängert wurden (siehe Kap. 2.2.2.2 und Tabelle 2.13), wurden sie mit Hilfe des StarGate[®] Combi Entry Reagent Set (IBA GmbH) in den Donorvektor pENTRY-IBA51 eingefügt. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte „Ein-Schritt-Reaktion“ in der durch Zugabe des GOIs, des pENTRY Vektors und der StarCombinase1TM in einem Schritt durch rekombinatorischen Austausch der gewünschte GOI-tragende Kanamycin resistente Donorvektor erzeugt wird (siehe Abb. 2.1).

Die Ansätze wurden für jeden Virus jeweils nach Angaben des Herstellers pipettiert und 1h bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation des Donorvektors in *E. coli* Top 10 chemisch kompetente Zellen (siehe Kap.2.2.3.3).

Beispiel: Ansatz nach Angaben des Herstellers (IBA GmbH) in 1,5ml Reaktionsgefäßen12,0 µl PCR-Fragment (auf 2nM verdünnt mit ddH₂O)

1,0 µl StarSolution M1

1,0 µl StarSolution M2

1,0 µl StarSolution M3 (zuvor Zugabe des M3-Verdünnungsmittels)

10,0 µl pENTRY-IBA 51

Σ 25,0 µl

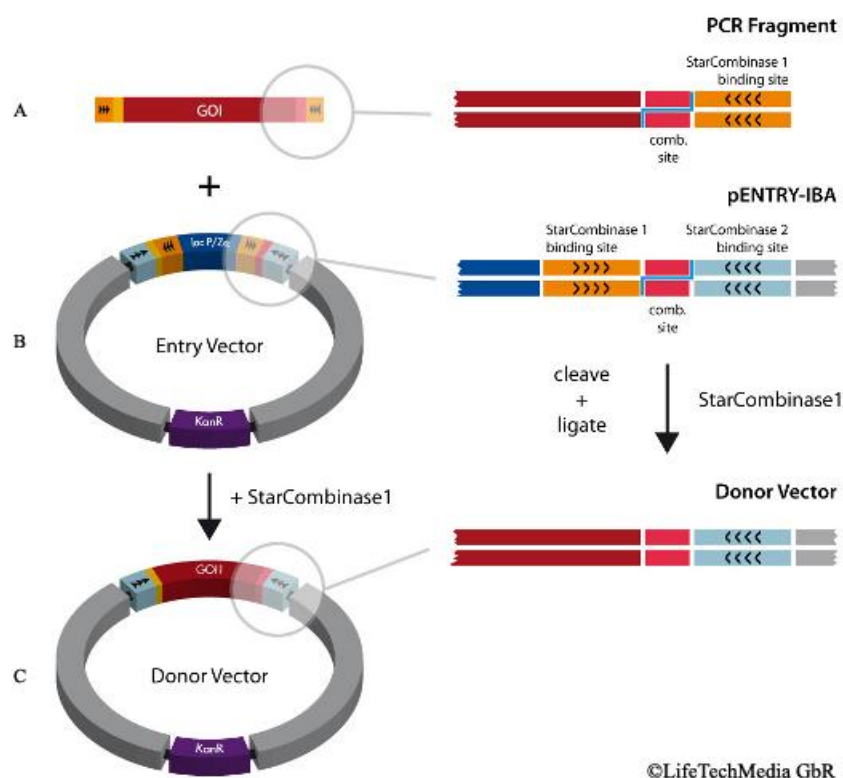


Abb. 2.1: Schematische Darstellung: Donorvektorherstellung mittels StarGate® Technologie (Quelle: IBA GmbH). Durch Zugabe von StarCombinase1TM wird das PCR-Fragment (GOI) **A** und der pENTRY Vektor **B** an den kombinatorischen Sequenzen geschnitten, dabei gehen die StarCombinase1TM Erkennungssequenzen (dargestellt in orange) verloren. Es entstehen Überhänge, die eine gerichtete Ligation von PCR-Produkt und Vektor ermöglichen. Der Donorvektor **C** besitzt die gleichen kombinatorischen Sequenzen, gefolgt von StarCombinase2TM Erkennungssequenzen (dargestellt in hellblau).

Zur Kontrolle wurde ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI empfohlen. Diese werden von verschiedenen Bakterienstämmen synthetisiert und katalysieren die spezifische hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen der DNA innerhalb ihrer palindromischen Erkennungssequenzen. Je nach Enzym entstehen dabei Fragmente mit glatten Enden (englisch: *blunt ends*), oder mit 3'- bzw. 5'- überhängenden, kohäsiven Enden (englisch: *sticky ends*). Dabei ist immer das

3'-Hydroxylende frei, während das 5'-Ende die verbleibende Phosphatgruppe trägt. Aktivität und Spezifität der Restriktionsendonukleasen werden durch Salzkonzentration, Temperatur, pH-Wert und den Gehalt an zweiwertigen Kationen (besonders Mg^{2+}) beeinflusst. Entsprechende Puffer wurden jeweils nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle Restriktionsendonukleasen inklusive der Puffer wurden von der Firma Fermentas GmbH bezogen. Es handelt sich hierbei um FastDigest[®] Enzyme und Puffer.

Beispiel: Analytischer Doppelverdau von rekombinanten Plasmiden

x	µl	Rekombinantes Protein (ca. 300ng)
y	µl	ddH ₂ O
0,5	µl	FastDigest [®] Enzym Hind III
0,5	µl	FastDigest [®] Enzym Xba I
<u>1,0</u>	<u>µl</u>	<u>10X FastDigest[®] Buffer</u>
Σ	10,0	µl

Der 10µl-Ansatz wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und 20min bei 37°C auf einem Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden je Restriktionsansatz 2µl Orange Loading Dye [6X] zugegeben und vollständig auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Die nach dem Restriktionsverdau erhaltenen Fragmente ließen sich durch eine Gelelektrophorese auftrennen, wodurch ihre Längen näherungsweise bestimmt werden konnten (siehe Kap. 2.2.2.3)

An Hand des Restriktionsmusters konnten die hergestellten rekombinanten Plasmide analysiert und durch eine folgende Sequenzanalyse (siehe Kap. 2.2.2.4) bestätigt werden.

2.2.3.2 Herstellung des Expressionsvektors mittels StarGate[®] Technologie

Das StarGate[®]-System stellt ein Klonierungssystem zur schnellen und effizienten Subklonierung eines Gens von einem Donorvektor in einen Akzeptorvektor dar. Ausgehend von einem Donorvektor (siehe Kap. 2.2.3.1) ermöglicht das System durch Mischen von StarCombinase2[™], Donor- und Akzeptorvektor die Subklonierung durch eine kombinierte Restriktions- und Ligationsreaktion. Die Wahl des Akzeptorvektors richtet sich nach dem gewünschten Expressionssystem (Säugerzellen, Bakterienzellen (*E. coli*),

Insektenzellen, Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)), in die das GOI transformiert werden soll. In dieser Arbeit wurde mit dem Akzeptorvektor pASG-IBA5 gearbeitet. Dieser pASG-IBA Vektor ist dem pASK-IBA Vektor sehr ähnlich und trägt ebenfalls eine Promotor/Operator Region mit *tetA* Resistenzgen und eignet sich optimal für die Anhydrotetracyclin induzierte Proteinexpression in *E. coli* Zellen (Skerra, 1994). Durch Verwendung des pASG-IBA5 Vektors wird dem exprimierten Protein N-terminal ein acht Aminosäuren langer Strep-tag[®] II angefügt.

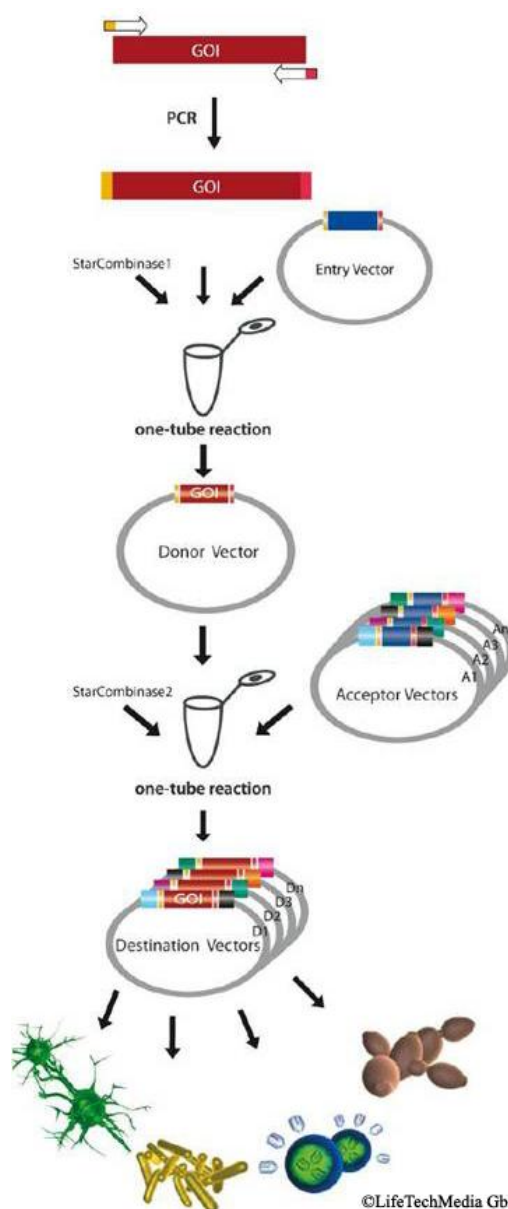


Abb. 2.2: Schematische Darstellung: Expressionsvektorherstellung mittels StarGate[®] Technologie (Quelle: IBA GmbH). Mischen von Donorvektor, Akzeptorvektor und StarCombinase2TM führen zu einer kombinierten Restriktions- und Ligationsreaktion. Je nach gewünschtem Expressionssystem (von links: Säugerzellen, Bakterienzellen (*E. coli*), Insektenzellen, Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*)), Promotor und Reinigungs-TAG kann zwischen verschiedenen Akzeptorvektoren gewählt werden.

Die Ansätze wurden für jeden Virus jeweils nach Angaben des Herstellers pipettiert und 1h bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation des Donorvektors in *E. coli* Top 10 chemisch kompetente Zellen (siehe Kap.2.2.3.3).

Beispiel: Ansatz nach Angaben des Herstellers (IBA GmbH) in 1,5ml Reaktionsgefäßen

12,0 µl Donorvektor (auf 2ng /µl verdünnt mit ddH₂O)
1,0 µl StarSolution A1
1,0 µl StarSolution A2
1,0 µl StarSolution A3 (zuvor Zugabe des A3-Verdünnungsmittels)
10,0 µl pASG-IBA 5
∑ 25,0 µl

2.2.3.3 Transformation rekombinanter DNA in *E. coli* top 10 bzw. BL21(DE3) Zellen

Die Zugabe von DNA zu chemisch kompetenten *E. coli* Zellen ist eine effiziente Methode zum Transfer von DNA (z.B. ein bei einer Ligation entstandenes rekombinantes, zirkuläres Plasmid) in gram-negative und gram-positive Bakterienzellen. Diese Methode basiert darauf, dass exogene DNA von den kompetenten Zellen aufgenommen wird und dient zur Vermehrung des rekombinanten Plasmids bzw. seiner Proteine.

Für die Transformation in *E. coli* top 10 Zellen (IBA GmbH) wurde je ein Aliquot der „One Shot“ Reaktionen der chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut.

Für die Transformation von pENTRY-Konstrukten in *E. coli* top 10 Zellen wurden die Zellen mit 10µl Reaktionsansatz versetzt und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde erst 30min auf Eis gestellt, dann 5min auf 37°C erhitzt und erneut 5min auf Eis gestellt. Für die Ausbildung der Kanamycin-Resistenz wurden dem Reaktionsansatz 900µl LB-Medium zugegeben und 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz zwei LB_{Kana}-Agarplatten mit 40µl X-Gal [40mg/ml] überzogen. Ausplattiert wurden 100µl Reaktionsansatz bzw. der komplette Rest (nach vorheriger Zentrifugation und resuspendieren in 100µl LB-Medium). Inkubation erfolgte ü.N. bei 37°C.

Für die Transformation von pASG-Konstrukten in *E. coli* top 10 Zellen wurden die Zellen mit 10µl Reaktionsansatz versetzt und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde erst 30min auf Eis gestellt, dann 5min auf 37°C erhitzt und erneut 5min auf Eis gestellt. Zwei

mit 40µl X-Gal [40mg/ml] überzogene LB_{Amp}-Agarplatten wurden vorbereitet und 10µl Reaktionsansatz bzw. der komplette Rest ausplattiert. Inkubation erfolgte ü.N. bei 37°C. Die Blau-Weiß-Selektion durch Zugabe von X-Gal zu den Transformationsplatten ermöglichte zusätzlich zur Selektion durch Antibiotikazugabe (pENTRY-Vektor = Kanamycin-Resistenzgen, pASG-Vektor = Ampicillin-Resistenzgen) ein leichtes Erkennen positiver, Insert-tragender Klone. Bei der Ligation wird das vorhandene *lacZ*-Gen des ursprünglichen Vektors durch das Insert ersetzt, die Transkription des *lacZ*-Gens wird dadurch unterbrochen und das Enzym β-Galactosidase wird nicht mehr gebildet. Die Folge: X-Gal wird nicht durch β-Galactosidase enzymatisch zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl gespalten. Bei 5-Brom-4-chlor-indoxyl handelt es sich um einen Farbstoff, der nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichloro-indigo bildet. Kolonien mit positiven Klonen bilden auf der Transformationsplatte weiße Kolonien.

Nach Selektion der Transformanten wurden Übernachtskulturen (siehe Kap. 2.2.3.4) mit Einzelkolonien inokuliert, die Plasmide durch Plasmid-DNA-Minipräparation (siehe Kap. 2.2.3.5) isoliert und rekombinante Plasmide durch einen analytischen Restriktionsverdau (siehe Kap. 2.2.3.1) bzw. Sequenzanalyse (siehe Kap. 2.2.2.4) identifiziert.

Für die Transformation in *E. coli* BL21(DE3) chemisch kompetente Zellen (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Meik Dilcher, UMG Virologie, Göttingen) wurde je ein Aliquot zu 100µl auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von β-Mercaptoethanol [Endkonz. 25mM] erneut 10min auf Eis inkubiert. Das β-Mercaptoethanol dient der höheren Transformationseffizienz, kleine Löcher erleichtern das Eindringen der rekombinanten DNA in die Zelle. Den Zellen wurden 40-50ng Plasmid-DNA zugegeben und 30min auf Eis inkubiert, dann erfolgte ein Hitzeschock für 45sec bei 42°C und ein erneutes Abkühlen auf Eis für 2min. Abschließend wurde dem Reaktionsansatz 900µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und 60min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz zwei LB_{AMP}-Agarplatten zum Ausplattieren von 100µl Reaktionsansatz bzw. dem kompletten Rest (nach vorheriger Zentrifugation und resuspendieren in 100µl SOC-Medium) verwendet. Inkubation erfolgte ü.N. bei 37°C. Für jede Proteinexpression wurde eine neue Transformation in BL21(DE3) Zellen durchgeführt, da diese die Expressionsplasmide mit der Zeit wieder verlieren. Nach Selektion der Transformanten erfolgte die *in vivo* Expression rekombinanter viraler Proteine (siehe Kap. 2.2.4.1).

2.2.3.4 Anzucht von Bakterienkulturen

Die Übernachtskultur diente als Ausgangsmaterial für eine DNA-Präparation (siehe Kap. 2.2.3.5) oder als Vorkultur für eine Proteinexpression (siehe Kap. 2.2.4.1). Hierzu wurde je Virus eine rekombinante Einzelkolonie einer Transformationsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in einem 15ml Falconröhrchen mit 5ml LB-Medium inokuliert. Den Medien wurde zur Selektion der Transformanten ein Antibiotikum z.B. Ampicillin [Endkonz. 100µg/ml] oder Kanamycin [Endkonz. 50µg/ml] hinzugesetzt. Die Flüssigkulturen wurden mit ca. 150UpM ü.N. bei 37°C geschüttelt.

Die Hauptkultur wurde für die Proteinexpression verwendet. 100ml LB_{AMP}-Medium wurden mit 2ml einer frischen Übernachtskultur in einem 1000ml Schikanekolben inokuliert und bei 37°C mit 110UpM bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,5-0,6 geschüttelt. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (siehe Kap. 2.2.4.1).

2.2.3.5 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von rekombinanter Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde der Reagenziensatz peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (peQlab Biotechnologie GmbH) verwendet. Bei der Präparation wird chromosomale DNA durch Alkalibehandlung denaturiert und nach anschließender Neutralisation ausgefällt, zirkuläre Plasmid-DNA renaturiert durch Erhöhung der Salzkonzentrationen wieder vollständig und bleibt gelöst. Durch Zentrifugation werden die chromosomale DNA, ein großer Teil der RNA und Proteine sedimentiert. Die gelöste Plasmid-DNA verbleibt im Überstand und wird daraufhin auf eine Säule gegeben, gewaschen und in einem letzten Schritt von der Säule eluiert. Verbliebene RNA wird durch RNase A-Behandlung gespalten.

Zur Präparation aller rekombinanten Plasmide wurden je 3,0ml einer Bakterien-Übernachtskultur (siehe Kap. 2.2.3.4) in zwei Schritten in ein 2,0ml Reaktionsgefäß überführt und 1min bei RT mit 11000UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 250µl RNase A Lösung resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 250µl Lösung II zugegeben und durch vier- bis sechsmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes das Lysat gemischt. Das aufgeklärte Lysat wurde mit 350µl Lösung III versetzt und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Es folgte eine Zentrifugation von 1min bei RT mit

11000UpM. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in eine HiBind[®]-Mini-prep-Zentrifugensäule überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 1min bei RT mit 11000UpM, hierbei bindet die Plasmid-DNA an die Membran der Säule. Zwei anschließende Waschschriffe mit 500µl und 750µl HB-Puffer, denen jeweils ein Zentrifugationsschritt von 1min bei RT mit 11000UpM folgte, befreiten die auf der Membran gebundene DNA von Verunreinigungen. Zum Trocknen der Membran wurde die Säule einmal ohne weitere Zugabe von Lösungen 1min bei RT mit 5000UpM zentrifugiert. In einem letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 55µl ddH₂O von der Säule eluiert und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Anschließende Lagerung bei -20° C.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Proteinexpression in *E. coli* BL21(DE3) Zellen

Durch die Verwendung des StarGate[®]-Klonierungssystems mit dem Expressionsvektor pASG-IBA5 wurden bei sekretierten Proteinen C-terminal zwei Aminosäuren (Glycin, Serin) und N-terminal drei Aminosäuren (Serin, Glycin, Methionin) und der acht Aminosäuren umfassende Strep-tag[®]II (Tryptophan-Serin-Histidin-Prolin-Glutamin-Phenylalanin-Glutaminsäure-Lysin) angehängt.

Die Hauptkulturen wurden wie in Kap. 2.2.3.4 beschrieben angelegt, nach Erreichen einer OD von 0,5–0,6 wurde die Proteinexpression in den verwendeten *E. coli* BL21(DE3) Zellen durch Zugabe von 10µl Anhydrotetracyclin [Stock. 2mg/ml in DMF, Endkonz. 200ng/ml] induziert. Die Kulturen wurden 3h bei 28°C und 110UpM geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation in 50ml Falconröhrchen bei 6000UpM für 20min geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet ü.N. bei -20°C eingefroren.

Das Aufschließen der Zellen erfolgte mechanisch durch Ultraschall-Behandlung, die gelösten Proteine befanden sich hinterher im Überstand, alle unlöslichen Bestandteile im verbliebenen Pellet nach Zentrifugation (6000UpM, 20min, 5°C), Pellet und Überstand wurden separiert und bei 5°C gelagert.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Die elektrophoretische Beweglichkeit von Proteinen in einer Polyacrylamid-Gelmatrix ist von Größe und Form abhängig und wird durch die Nettoladung des Proteins bestimmt. Das anionische Detergenz Natriumlaurylsulfat (englisch: *sodium dodecyl sulfate (SDS)*) wird von Proteinen quantitativ gebunden und bewirkt in Gegenwart von Thiolreagenzien wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT) zumeist eine vollständige Denaturierung der Proteine. Die Sulfatgruppen des SDS verleihen den Proteinen eine stark negative Gesamtladung, die der Masse des jeweiligen komplexierten Proteins proportional ist. Die durch das gebunden SDS erworbene negative Ladung ist meist wesentlich größer als die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins, die damit vernachlässigbar wird.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine wird somit hauptsächlich durch den Molekularsiebeffekt der Gelmatrix und die angelegte Stromstärke bestimmt. Generell lässt sich sagen, dass für die Trennung von Proteinen im Bereich von 10kDA bis 200kDA Gelkonzentrationen zwischen 8 % und 12.5 % Acrylamid eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde mit 12%igen Gelen, bestehend aus Trenn- und Sammelgel unterschiedlicher pH-Werte gearbeitet.

Die Gele wurden in einer Gelelektrophoresekammer fixiert und diese vollständig mit Laufpuffer (SDS-PAGE) gefüllt. 950 μ l Laemmli Sample Buffer wurden mit 50 μ l β -Mercaptoethanol versetzt und im Verhältnis 1:1 mit den Proteinproben gemischt. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Ansätze für 5min bei 95°C im Heizblock erhitzt, kurz auf Eis gestellt und mit einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Sammelgels eingefüllt. Als Molekulargewichtsmarker wurden 5 μ l SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Fermentas) aufgetragen.

Die Gelelektrophorese erfolgte 30min bei 60V bis die Proben vollständig in das Sammelgel eingelaufen waren, danach weitere 60min bei 100V, bis der im Probenpuffer enthaltene Farbmarker die untere Kante des Gels erreichte. Für den spezifischen Nachweis der exprimierten Proteine wurden anschließend Western Blot (siehe Kap. 2.2.4.3) und Immunoblot-Analyse (siehe Kap.2.2.4.4) durchgeführt.

2.2.4.3 Transfer von Proteinen auf Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran („Western Blot“)

Für den nachfolgenden immunologischen Nachweis wurden die Proteine nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (siehe Kap. 2.2.4.2) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) transferiert (Towbin, Staehlin & Gordon, 1979). Hierzu wurden die PVDF-Membran und zwei Filterpapiere entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten und zusammen mit dem ungefärbten Gel luftblasenfrei in einer speziellen Blotkammer wie folgt zusammen gebaut:

Kathodenseite

Schwamm

Filterpapier

Gel

PVDF-Membran

Filterpapier

Schwamm

Anodenseite

Die Kammer wurde vollständig mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte bei 350mA, 1h unter Rühren und Kühlen.

2.2.4.4 Spezifischer Nachweis exprimierter Proteine mittels Strep-tag[®] II Antikörper („Immunoblot-Analyse“)

Auf PVDF-Membranen immobilisierte rekombinante Proteine können auf Grund ihres N-terminal angehängten Strep-tag[®] II mit sehr hoher Sensitivität durch monoklonale Anti-Strep-tag[®] II Antikörper nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde mit dem Strep MAB – Classic (IBA) gearbeitet, der zuvor mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (englisch: *horseradish-peroxidase*, HRP) konjugiert wurde [Anti-Strep-tag[®] II-HRP]. Unter alkalischen Bedingungen katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol, was zu einer Lichtemission bei 425nm führt (Prichard & Cormier, 1968). Eine bestehende Chemilumineszenz weist das Vorhandensein des an den

Strep-tag[®]II spezifisch bindenden Antikörpers nach und beweist somit eine erfolgreiche Proteinexpression, bei der das Strep-tag[®]II angehängte rekombinante Protein exprimiert wurde. Die Intensität der gemessenen Chemilumineszenz ist dabei proportional zur Menge des exprimierten Proteins.

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran zuvor 30min bei RT auf einer Wippe und anschließend ü.N. bei 4°C in Blockierungspuffer (Western Blot) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran mit Waschpuffer (Western Blot) gewaschen, anschließend mit dem in 50% Blockierungspuffer (Western Blot) und 50% Waschpuffer (Western Blot) verdünnten Anti-Strep-tag[®]II-HRP Antikörper (Verdünnung 1:32000) 1h bei RT schwenkend inkubiert und erneut mit Waschpuffer (Western Blot) gewaschen.

Abschließend wurde die Membran mit einem Gemisch der beiden Amersham[™] ECL[™] Prime Western Blotting Detection System Lösungen [1ml Lösung A (enthält Luminol) und 1ml Lösung B (enthält Peroxid)] für ca. 5min inkubiert und die Enzymreaktion durch Dokumentation der Chemilumineszenz am Chemidoc XRS ermittelt.

2.2.4.5 Solubilisierung unlöslicher Proteine

Für die Solubilisierung der Proteine, sofern diese nicht ausreichend in gelöster Form nach Proteinexpression und Zellaufschluss (siehe Kap. 2.2.4.1) vorlagen, wurde eine Sarkosyl enthaltende Lösung verwendet. Hierbei ist es wichtig, dass die Proteine nach der Solubilisierung wieder ihre natürliche Sekundärstruktur einnehmen und somit biologisch aktiv bleiben. Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Solubilisierung mit 1,5% Sarkosyl zwar den größten Teil der Proteine in eine lösliche Form überführen, ihre Aktivität hingegen stark herabgesetzt wird (Zhuo et al., 2005) mit 0,3% Sarkosyl hingegen ausreichend ist für die Überführung von Proteinen in eine lösliche Form bei der die Aktivität erhalten bleibt (R.R. Burgess, 1996).

Eine Sarkosylbehandlung wurde mit den Pellets nach Ultraschallbehandlung (siehe Kap. 2.2.4.1) der Proteinexpressionen der Viren BATV-N, ERVEV-N, TRBV-VP7, TBEV-NS1, WNV-NS1 durchgeführt, da diese in zu geringer Konzentration zum Koppeln an Beads (siehe Kap. 2.2.5.2.1) in gelöstem Zustand vorlagen.

Die bei -20°C gelagerten Pellets wurden in 3ml PBS [1X] resuspendiert, in 15ml Falconröhrchen überführt und 15min bei 4°C mit 6000UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 3ml Sarkosyl-Lösung [0,4% Sarkosyl, 0,1M Tris, pH12,0] aufgenommen und 3h bei 4°C auf einem Rotator gemischt.

Abschließend wurden alle nicht gelösten Bestandteile durch Zentrifugation (15min, 4°C , 6000UpM) entfernt und die verbleibenden 3ml Überstand, die das nun gelöste Protein enthielten, in Dialysekassetten gegen PBS [1X] dialysiert (siehe Kap. 2.2.4.7)

2.2.4.6 Reinigung von Proteinen mittels Strep-tag[®]/ Strep-Tactin[®] Technologie

Durch Verwendung der pASG-IBA5 Vektoren wurden den rekombinanten viralen Proteinen bei der Expression N-terminal eine Strep-tag[®]II Affinitätssequenz angehängt, was eine Reinigung durch Säulenchromatographie ermöglichte (Schmidt & Skerra, 2007). Der 8 Aminosäuren lange Strep-tag[®]II (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) beeinflusst dabei weder die Proteinstruktur noch die biologische Aktivität des Proteins als Antigen.

Die hohe selektive Reinigung basiert auf der starken Affinität der Bindung von Strep-tag[®]II an *Strep-Tactin*[®], einem von IBA entwickelten Streptavidin-Derivat mit 100fach höherer Bindungsaffinität (Voss & Skerra, 1997).

Wie in Abb. 2.3 schematisch dargestellt wurde das gesamte Probenvolumen, nach Equilibrierung der Säule durch Zugabe von 2ml Waschpuffer (Säule), auf die Säule gegeben. Nach fünf Waschschritten von je 1ml Waschpuffer (Säule) folgten sieben Elutionsschritte von je 500 μl Elutionspuffer (Säule) [enthält 2,5mM Desthiobiotin]. Der Durchfluss, die Waschschrritte und die Eluate wurden in Fraktionen getrennt in 1,5ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und mittels SDS-PAGE, Westernblot und ggf. BCA-Test auf Proteingehalt und Reinheit überprüft. Eluate mit genügend hoher Konzentration an viralen Proteinen für eine Kopplung an Beads (siehe Kap. 2.2.5.2.1) wurden vereinigt und gegen PBS [1X] dialysiert (siehe Kap. 2.2.4.7), um störende Substanzen wie z.B. Desthiobiotin aus den Eluaten zu entfernen.

Für die Regeneration der Säule wurden 15ml Regenerationspuffer (Säule) in drei Schritten auf die Säule gegeben, hierbei wurde das Desthiobiotin des Elutionspuffers von der Säule verdrängt, was durch eine rötliche Färbung der Säule sichtbar wurde. Durch Zugabe von Waschpuffer (Säule) wurde die im Regenerationspuffer enthaltene

2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure kurz HABA, verantwortlich für die Rotfärbung, vollständig von der Säule entfernt, die Säulen konnten anschließend erneut zur Reinigung des gleichen Proteins verwendet werden. Um Kontaminationen mit anderen exprimierten Proteinen zu vermeiden wurde für jedes rekombinante Protein eine Säule verwendet.

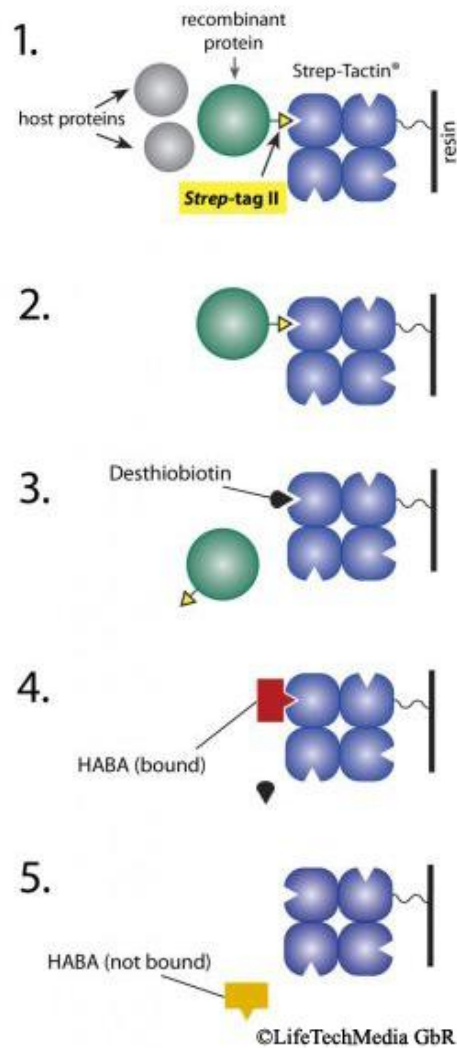


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Reinigung von Strep-tag[®]II-Fusionsproteinen über eine Strep-Tactin[®] Sepharose Säule (Quelle: IBA GmbH). **1+2:** Strep-tag[®]II-Fusionsproteine binden spezifisch an Strep-Tactin[®] Matrix, Verunreinigungen werden in folgenden Waschschritten entfernt. **3:** Die gebundenen Strep-tag[®]II-Fusionsproteine werden durch Zugabe von Elutionspuffer [2,5mM Desthiobiotin] von der Säule verdrängt und eluiert. **4:** Regeneration der Säule durch Zugabe von Regenerationspuffer [2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure kurz HABA] und Verdrängung des Desthiobiotins, sichtbar durch die Rotfärbung der Säule. **5:** Durch Zugabe von Waschlösung wird HABA vollständig von der Säule entfernt.

2.2.4.7 Dialyse von Proteinen mittels Slide-A-Lyzer™ G2 Dialyse Kassetten

Um störende Substanzen wie Sarkosyl nach Solubilisierung (siehe Kap. 2.2.4.5) oder Desthiobiotin nach Reinigung durch Strep-tag®/Strep-Tactin® Säulen (siehe Kap. 2.2.4.6) aus den Protein-enthaltenden Lösungen zu entfernen wurden die Ansätze gegen PBS [1X] dialysiert. Es handelt sich bei der Dialyse um einen konzentrationsgetriebenen Membranprozess, bei dem nur Moleküle unterhalb der gewählten Porengröße (englisch: *Molecular Weight Cut Off, MWCO*) der Membran diese passieren können. Größere Moleküle, wie die exprimierten Proteine, werden innerhalb der Membran zurückgehalten.

In dieser Arbeit wurden Slide-A-Lyzer™ G2 Dialyse Kassetten verwendet, diese besitzen eine semipermeable Membran mit einer Porengröße von 3500Da. und ein Fassungsvermögen von 0,5 – 3ml.

Die Probe wurde in die Dialysekassette pipettiert und in ein Becherglas mit PBS [1X] gegeben. Das Volumen an Dialysepuffer richtete sich dabei nach dem eingesetzten Probenvolumen: In der Regel wird das 350-fache Volumen des Probenvolumens verwendet, bei 3ml Probe wurde entsprechend jeweils gegen 1050ml PBS [1X] dialysiert.

Auf Grund des osmotischen Drucks stellt sich mit der Zeit ein Konzentrationsgleichgewicht ein, der Puffer wurde mehrfach (nach 2h, nach 4h, nach 6h) gewechselt, um den osmotischen Druck weiter aufrecht zu erhalten. Auf diese Weise konnte die Konzentration der ursprünglich vorhandenen unerwünschten Substanzen auf ein vernachlässigbares Maß reduziert werden. Zusätzliches Rühren des Puffers beschleunigt den Prozess (Kunitz & Simms, 1928).

Am folgenden Tag wurden die Proben mit einer Spritze aus der Dialysekassette gezogen und in 1,5ml Protein-lo-bind Reaktionsgefäße überführt und bis zur Konzentrationsbestimmung (siehe Kap. 2.2.4.8) bzw. Kopplung (siehe Kap. 2.2.5.2.1) bei 4°C gelagert.

2.2.4.8 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Zur quantitativen Proteinkonzentrationsmessung wurde der Reagenziensatz „BCA Protein Assay Kit“ von Pierce® nach Angaben des Herstellers verwendet.

Hierbei handelt es sich um einen zwei Schritte beinhaltenden colorimetrischen Nachweis. Die gut untersuchte aber unspezifische Methode Cu^{2+} zu Cu^+ zu reduzieren, indem in alkalischem Milieu Cu^{2+} -Ionen quantitativ mit Protein einen Komplex bilden, bei dem

Cu⁺- Ionen entstehen (Biuret Reaktion) (Gornall, Bardawill & David, 1949) wird mit der hoch sensitiven BCA-Methode kombiniert. Die Cu⁺- Ionen reagieren im zweiten Schritt mit Bicinchoninsäure (BCA), welche in wässriger Lösung ein sensitives, stabiles und hochspezifisches Reagenz für Cu⁺-Ionen darstellt (Smith et al., 1985). Durch die Komplexbildung zweier BCA-Moleküle mit einem Cu⁺-Ion entsteht ein violettees wasserlösliches Reaktionsprodukt mit starker Absorption bei einer Wellenlänge von 562nm.

Die Konzentration wurde durch Vergleich der Probe mit einer unter gleichen Bedingungen erstellten Eichkurve eines Proteins bekannter Konzentration (BSA Stock: 2mg/ml, Eichkurve: 2000µg/ml, 1500µg/ml, 1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 25µg/ml) photometrisch am Fluostar (Einstellung: 4 Parameter Fit) bestimmt. Bei der BCA-Quantifizierungsmethode wurde die Konzentration des Gesamtproteins nach evtl. nötiger Solubilisierung (2.2.4.5), Reinigung (2.2.4.6) und Dialyse (2.2.4.7) aller exprimierten Proteine gemessen. Dieser Schritt war für die Entwicklung des Multiplex-Cytometric-Bead-Arrays (CBA) essentiell, um sicherzustellen, dass jeweils die gleiche Menge Protein an Beads gekoppelt wurde (2.2.5.2.1).

2.2.5 Detektionsmethoden für Antikörper aus Serum

2.2.5.1 Immunfluoreszenz Test (IFT) zur Kontrolle der Positivseren

Für die Entwicklung neuer diagnostischer Nachweise sind Kontrollen für die Bestimmung der Sensitivität und Spezifität eines Testes unverzichtbar. Für diese Arbeit wurden die in Tabelle 2.14 aufgeführten Seren als Kontrollen verwendet. Um diese Seren eindeutig als Positivseren zu bestimmen wurde zusätzlich ein Immunfluoreszenztest (IFT) entwickelt. Die in den Seren befindlichen viralen Antikörper binden an die mit Virus infizierten Zellen, die Antikörper werden anschließend durch fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper, welche spezifisch an den F_c-Teil des Serumantikörpers binden, mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Wegen seiner starken Emission bei 570nm nach Absorption von Licht der Wellenlänge von 550nm wurde Cyanin-Typ III (Cy3) als Fluoreszenzfarbstoff gewählt. Für den IFT wurden die mit Virus infizierten Zellen zuvor auf Objektträger mit zwölf voneinander getrennten Feldern fixiert, bei -20°C gelagert (siehe Kap. 2.2.1.2)

und nach Bedarf verwendet. Die Objektträger wurden nach leichtem Antauen bei Raumtemperatur 5min in einer Glasschale mit PBS [1X] gewaschen und die Flüssigkeit anschließend vollständig zwischen den Feldern entfernt.

Zur Ermittlung der Sensitivität wurden je Serum Verdünnungsreihen (1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120) in PBS [1X] angelegt und zusammen mit immer der gleichen Negativkontrolle (1:100) auf die entsprechenden virusspezifischen Objektträger aufgetropft. Pro Feld wurden 20µl Volumen eingesetzt und für 2h in einer mit Wasser gefüllten Färbekammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in PBS [1X] gewaschen und die Flüssigkeit wieder vollständig zwischen den Feldern entfernt. Zum Nachweis der Antikörper wurden je nach Herkunft des Serums (Maus oder Mensch) Anti-Maus- oder Anti-Human-IgG mit Cyanin Typ III (kurz: Cy3: Absorption 550nm, Emission 570nm) gekoppelte Zweitantikörper in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung (1:500) verwendet. Pro Feld wurden 20µl Volumen eingesetzt, Inkubation erfolgte in einer Färbekammer 1h, 37°C im Brutschrank, auf Grund des eingesetzten lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffs, dunkel abgedeckt. Zum Abschluss wurden die Objektträger erneut zweimal in PBS [1X] gewaschen, getrocknet und mit Fluosafe-Reagenz (Calbiochem) und Deckglas bis zur vollständigen Aushärtung über Nacht bei 4°C gelagert. Die unter dem Fluoreszenzmikroskop rot erscheinenden positiven Seren wurden mit einer Kamera dokumentiert (siehe Abb. 3.8) und tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 3.5).

2.2.5.2 Cytometric-Bead-Array (CBA)

2.2.5.2.1 Kopplung von viralen Oberflächenproteinen an magnetische carboxylierte Mikrokugeln (Beads)

Wie in Kap. 1.2.3 beschrieben wurden zum Nachweis viraler Antikörper virale Oberflächenproteine hergestellt und diese an magnetische carboxylierte Mikrokugeln (Beads) gekoppelt (siehe Abb. 2.4). Die Beads sind mit unterschiedlichen Verhältnissen zweier Fluoreszenzfarbstoffe (rot und infrarot) gefüllt, was eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Beadpopulationen bei Auftragung beider Fluoreszenzsignale gegeneinander ermöglicht (siehe Einleitung Kap. 1.2.2)

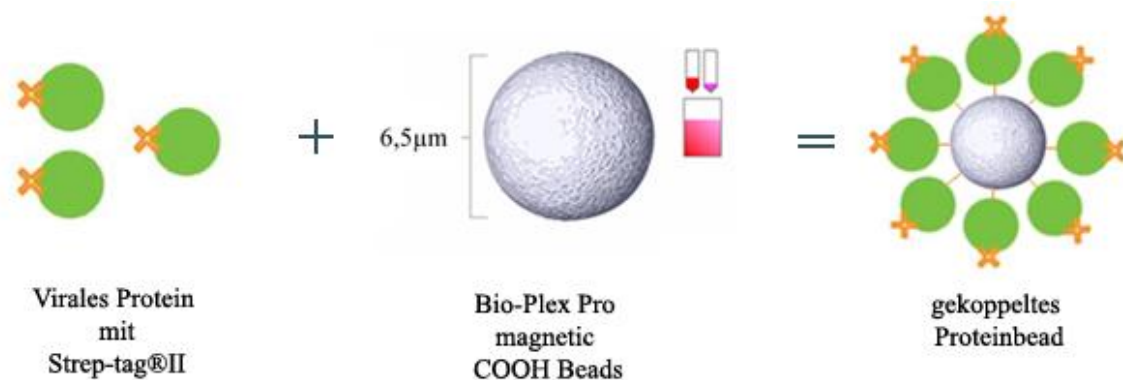


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Kopplung von viralen Proteinen mit magnetischen carboxylierten Beads. Durch eine zweischritt carboxydiimid-Reaktion von primärer Amino-Gruppe des Proteins und der funktionellen Carboxyl-Gruppe auf der Beadoberfläche wurden Proteinbeads hergestellt, die Proteine wurden dabei kovalent an die Beadoberfläche gebunden.

In dieser Arbeit wurde mit Bio-Plex Pro magnetic COOH Beads der Regionen #26, #27, #29, #34, #35, #36, #37, #42, #44, #46, #52, #53, #54, #55, #62, #63, #65 gearbeitet. Zur Kopplung wurde jede Beadpopulation mit einem anderen viralen Protein gekoppelt, dabei wurden die Beadpopulationen so gewählt, dass potentiell kreuzreagierende oder nah verwandte Viren möglichst weit voneinander entfernt lagen (siehe Abb. 2.5). Als Kontrollen wurde eine Beadpopulation mit reinem BSA (42), die andere mit *E. coli* Proteinen (65) einer reinen BL21(DE3)-Expressionskultur gekoppelt.

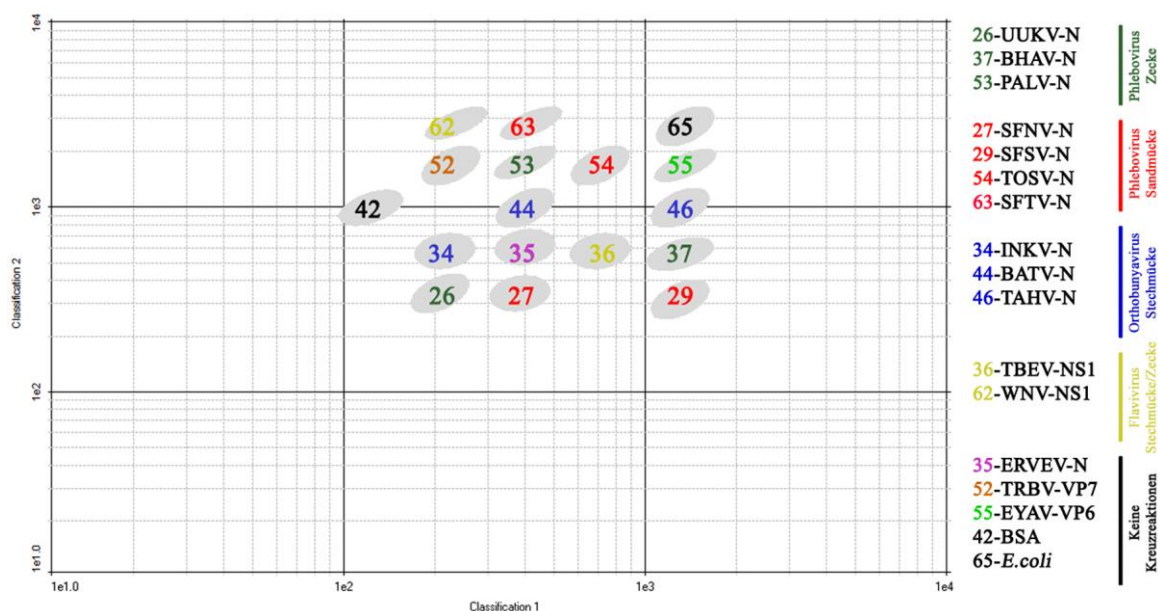


Abb. 2.5: Dot-Plot Darstellung der gekoppelten, nummerierten Bio-Plex Pro magnetic COOH Beads und ihre Lage bei logarithmischer Auftragung der Signale beider internen Fluoreszenzfarbstoffe gegeneinander. Nah verwandte und möglicherweise kreuzreagierende Viren wurden in maximalem Abstand zueinander gewählt. **Grün:** von Zecken übertragene Phleboviren, **Rot:** von Sandmücken übertragene Phleboviren, **Blau:** von Stechmücken übertragene Orthobunyaviren, **Gelb:** Flaviviren.

Die Kopplung erfolgte mit dem Bio-Plex Amine Coupling Kit, jeweils 100µl gut gemischter ungekoppelter Bio-Plex Pro magnetic COOH Beads wurden in 1,5ml Protein-bind Gefäße gegeben, 3min bei 12000UpM, RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Beadpellet in 100µl Bead-Wash-Buffer resuspendiert. Nach 10sec mischen mittels Vortexer und 10sec Ultraschallbad wurden der Zentrifugationsschritt wiederholt und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 80µl Bead-Activation-Buffer, der Ansatz wurde zuerst 30sec mittels Vortexer, dann 30sec mittels Ultraschallbads gemischt. Parallel wurden 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC) [50mg/ml] und N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHSS) [50mg/ml] eingewogen, in entsprechender Menge Bead-Activation-Buffer gelöst und jeweils 10µl zu dem 80µl Ansatz gegeben. Zur Aktivierung der COOH-Beads wurde der Ansatz 20min bei RT auf einem Rotator gemischt. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Ansätze in Alufolie gehüllt, um direktes Licht auf die aktvierten Beads zu vermeiden.

Nach 20min Aktivierung erfolgten zwei aufeinander folgende Waschschrte mit je 150µl PBS [1X], Zentrifugation 3min bei 12000UpM, Überstand wurde verworfen. Die Beads wurden in 100µl resuspendiert, 30sec mittels Vortexer gemischt und 15sec in ein Ultraschallbad gegeben.

Für die Kopplung wurden jeweils 10µg virales Protein (Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test siehe Kap.2.2.4.8) durch Zugabe von entsprechender Menge PBS [1X] auf ein Volumen von 200µl gebracht und zu dem Gemisch aktivierter Beads gegeben. Die Kopplung, bei der die Proteine in einer zweischritt carboxydiimid Reaktion zwischen primärer Amino-Gruppe des Proteins und funktioneller Carboxyl-Gruppe auf der Beadoberfläche kovalent gebunden werden, erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Rotator.

Nach der Kopplung wurde der Ansatz zentrifugiert, der Überstand verworfen und die gekoppelten Beads in 500µl PBS [1X] gewaschen. Nach vorsichtigem Mischen mit geringer Geschwindigkeit wurde der Ansatz zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Blockierung evtl. noch freier Kopplungsstellen wurden den gekoppelten Beads 250µl Blocking-Buffer zugegeben, der Ansatz 15sec vorsichtig gemischt und weitere 30min bei RT auf einen Rotator gestellt.

Der Ansatz wurde zentrifugiert (12000UpM, 3min,dunkel), der Überstand verworfen und die Beads in 500µl Storage-Buffer vorsichtig resuspendiert, erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und zum Abschluss wurden die nun fertig gekoppelten Beads in 150µl Storage-Buffer aufgenommen. Laut Hersteller sind die gekoppelten Beads bei 4°C Lagerung 1 Jahr haltbar, so dass in allen folgenden Versuchen auf die vorhandenen gekoppelten Stocks zurückgegriffen wurde.

2.2.5.2.2 Nachweis der Kopplung mittels Strep-tag®II spezifischem fluoreszenzmarkiertem Antikörper

Zur Überprüfung der Kopplung viraler Antigene an carboxylierte Beads (Bio-Plex Pro magnetic COOH Beads) wurden 5µl des jeweiligen Stocks (siehe Kap. 2.2.5.2.1) und 95µl Waschpuffer (Beads-MAGPIX) in ein well einer 96-well Platte gegeben und 100µl verdünntes Konjugat (5µl Strep-Tactin-R-PE (bei Proteinen mit Strep-tag®II) + 95µl Drive Fluid) zugegeben. Der Ansatz wurde 15min, dunkel abgedeckt auf einer Wippe inkubiert und alle 5min zusätzlich auf niedrigster Stufe mit einem Plattenvortexer gemixt. Da es sich bei den verwendeten Beads um Bio-Plex Pro magnetic COOH Beads handelte und diese somit magnetische Eigenschaften aufwiesen konnten alle Waschschrte auf einem starken Magneten, dem 96-Well Microtiter Plate Magnetic Separation Rack (New England Biolabs GmbH) durchgeführt werden. Hierzu wurde die Mikrotiterplatte 5min auf den Magneten gestellt und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Der Ansatz wurde in 200µl Drive Fluid resuspendiert, kurz gemischt und erneut 5min auf den Magneten gestellt, der Überstand abgenommen und verworfen.

Für die Messung wurden dem Ansatz 100µl Drive Fluid zugegeben und 100 Beads pro Beadpopulation zur Ermittlung der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) am MAG-PIX™-System gemessen. Bei jeder Messung wurde eine Kontrolle in Form von BSA-gekoppelten Beads mitgeführt. Eine Kopplung wurde als erfolgreich gewertet, wenn die Beadpopulation ein Fluoreszenzsignal zeigte, die Kontrolle jedoch nicht. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 2.6 zu sehen.

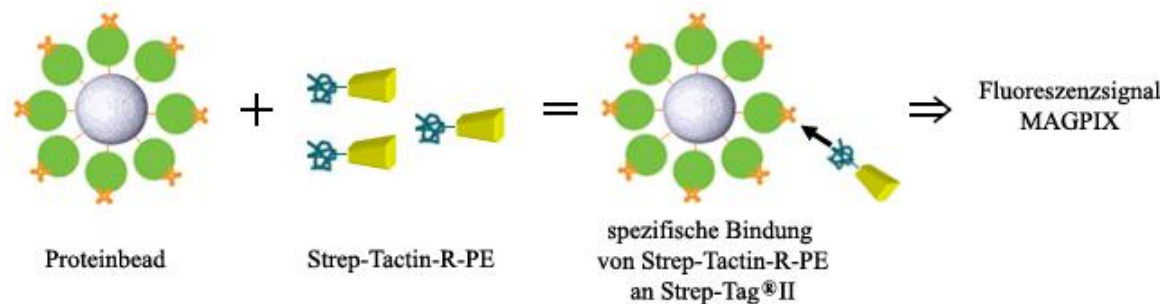


Abb. 2.6: Schematische Darstellung des Kopplungsbeweises. Ausschließlich erfolgreich gekoppelte Proteinbeads ermöglichen durch den zugänglichen Strep-tag®II eine spezifische Bindung des Strep-Tactin-Antikörpers (konjugiert mit Phycoerythrin) an den Strep-tag®II des rekombinanten viralen Proteins. Nach Bindung kann mittels Messung am MAGPIX™-System ein Fluoreszenzsignal (PE-Median) detektiert werden.

2.2.5.2.3 Ermittlung der CBA Sensitivität mittels Positivseren

Zur Ermittlung der Sensitivität aller in dieser Arbeit hergestellten, mit unterschiedlichen viralen Proteinen gekoppelten Beadpopulationen (siehe Abb. 2.5) wurden die im Immunfluoreszenztest (siehe Kap. 2.2.5.1) getesteten Positivseren als Kontrollen verwendet. Wie in Kap. 1.2.3 beschrieben handelt es sich beim CBA um einen serologischen Antikörpernachweis, bei dem aufeinander folgend Antigen, Erstantikörper und Zweitantikörper eine Bindung eingehen und es letztlich zur Detektion eines Fluoreszenzsignals (PE-Median) kommt.

Da eine Proteinreinigung nicht alle exprimierten, nicht mit Tag versehene Proteine rückstandslos entfernt, wurden die Proteinbeads auf *E. coli* Proteine überprüft. Wie im Ergebnisteil (Kap. 3.5.2, Tabelle 3.7, Abb. 3.9 und Abb. 3.10) dargestellt konnte eine geringe Menge *E. coli* Protein (auf Grund der Expressionskultur) nachgewiesen werden, die nach der Kopplung (siehe Kap. 2.2.5.2.1) neben dem eigentlichen viralen Antigen ebenfalls auf der Beadoberfläche gebunden wurden. So könnten Seren mit intrinsisch hohem Titer von *E. coli* Antikörpern (*E. coli* gehört zu den gramnegativen Bakterien und ist Bestandteil der tierischen und menschlichen Darmflora, es gibt pathogene und nicht pathogene Stämme, die durch Zufuhr von Wasser und Lebensmitteln aufgenommen werden) zu einem Fluoreszenzsignal führen.

Um falsch positive Signale zu vermeiden, wurde jedes untersuchte Serum mit dem *E. coli* Lysat einer reinen BL21(DE3) Expressionskultur 1h, 37°C inkubiert. Durch diese Präadsorption wurden die *E. coli* Antikörper noch vor Kontakt mit den Proteinbeads abgefangen.

Pro Ansatz wurde je ein Serum (siehe Tabelle 2.14) zusammen mit *E. coli* Lysat (1:60) und PBS [1X] auf ein Verhältnis von 1:8 verdünnt, die Präadsorption erfolgte für 1h bei 37°C, anschließend wurden alle löslichen von unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (5min, 10000UpM, RT) getrennt.

Der Überstand wurde jeweils in Zweierreihen in PBS [1X] verdünnt, beginnend mit der Verdünnung von 1:8, bis zu einer Verdünnung von 1:65536. Der Sensitivitätstest erfolgte in 96-well Platten, pro Verdünnung wurden 50µl Ansatz eingesetzt. Je well wurde 1µl Proteinbead-Stock siehe Kap. 2.2.5.2.1 (immer zum entsprechenden Positivserum passend, siehe Beispiel unten) und 1µl *E. coli*-Proteinbead-Stock (Kontrolle) zugegeben. 1µl Stock entspricht etwa 8000 Beads.

Beispiel: Ansatz zur CBA Sensitivitätsermittlung von BATV

- 50,0µl mit *E. coli* Lysat präadsorbiertes Positivserum (BATV)
- 1,0µl Stock Beadpopulation Nr. 44 gekoppelt mit BATV-N Protein
- 1,0µl Stock Beadpopulation Nr. 65 gekoppelt mit *E. coli* Protein (Kontrolle)

Der Test wurde dunkel abgedeckt und 1,5h bei RT auf einer Wippe inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte (wie in Kap.2.2.5.2.2) auf dem 96-Well Microtiter Plate Magnetic Separation Rack (je 5min auf dem Magneten, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen, Waschvolumen jeweils 100µl PBS [1X]).

Je nach Ursprung des Serums (siehe Tabelle 2.14) wurden 50µl Anti-mouse-PE IgG bzw. Anti-human-PE IgG (siehe Tabelle 2.10) je well verdünnt in PBS [1X] als fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper eingesetzt. Die Inkubation erfolgte dunkel abgedeckt, 1,5h bei RT auf einer Wippe. Es folgten erneut zwei Waschschrte, wie zuvor beschrieben.

Für die Messung wurden je well dem Ansatz 80µl Drive Fluid zugegeben, sanft gemischt und jeweils 100 Beads pro Beadpopulation zur Ermittlung der medianen Fluoreszenzintensität [MFI] am MAGPIX™-System gemessen. Je Serum wurden drei voneinander unabhängige Tests durchgeführt.

Anhand der Sensitivitäten aller untersuchten Proteinbeads wurde eine gemeinsame Verdünnung zum Einsatz im Multiplex-Test ermittelt.

2.2.5.2.4 Ermittlung der Kreuzreaktivität und Entwicklung des CBA als Multiplex-Ansatz

Kreuzreaktionen nah verwandter Viren sind bekannt. Dennoch wurde in dieser Arbeit der Versuch der Entwicklung eines Multiplex-Testes unternommen, der den Nachweis mehrerer viraler Antikörper parallel in nur einem Ansatz ermöglichen soll.

Zur Ermittlung der Kreuzreaktivität wurden die in Kap. 2.2.5.2.3 bereits charakterisierten Positivseren verwendet. Anhand der bisherigen Ergebnisse (Ermittlung des dynamischen Bereichs siehe Kap. 2.2.5.2.3) wurde mit einer Serenverdünnung von 1:200 bei dem Multiplex-CBA Test gearbeitet.

Jedes Positivserum (siehe Tabelle 2.14) wurde mit *E. coli* Lysat (1:60), Roti-Block (1:10) und PBS [1X] auf ein Verhältnis von Serum zu Rest auf 1:200 verdünnt. Die Präadsorption erfolgte für 1h bei 37°C, anschließend wurden die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (5min, 10000UpM, RT) getrennt.

Der Multiplex-Test wurde in einer 96-well Mikrotiter Platte durchgeführt, pro Ansatz wurden 100µl präadsorbiertes Serum in einem well vorgelegt und jeweils 0,25µl (entspricht etwa 2000 Beads) je Beadpopulation und well zugegeben.

Um eine optimale Verteilung der Proteinbeads inklusive Kontrollen auf die Ansätze zu erreichen, wurden die Beads vorher in einem Mastermix aus den einzelnen Proteinbead-Stocks pipettiert, gut gemischt und auf die wells verteilt.

Beispiel: Mastermix-Ansatz (in 0,5ml Protein-lo bind Reaktionsgefäß)

Es wurden alle 14 Positivseren und 2 Negativseren als Kontrollen eingesetzt, demnach wurde ein Mastermix für 17 (14 + 2 + 1) Ansätze als Ausgang vorgelegt. Es wurden alle vorhandenen Proteinbeads (15) und Kontrollen (2) eingesetzt.

Je Beadpopulation wurden demnach 4,25µl (0,25 x 17) eingesetzt, was zu einem Gesamtvolumen von 72,25µl führte. Je well wurden 4,25µl Mastermix eingesetzt.

Die erste Inkubation des Testes erfolgte 1,5h bei Raumtemperatur, leicht gemischt durch schwenken auf einer Wippe, dunkel abgedeckt.

Anschließend wurde, wie bereits in Kap. 2.2.5.2.3 ausführlich beschrieben, die Mikrotiterplatte auf einen Magneten gestellt, der Überstand verworfen und jeder Ansatz in 100µl PBS [1X] gewaschen und der Überstand verworfen.

Je nach Ursprung des Serums (siehe Tabelle 2.14) wurden 100µl Anti-mouse-PE IgG bzw. Anti-human-PE IgG (siehe Tabelle 2.10) verdünnt in PBS [1X] als fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper eingesetzt. Die Inkubation erfolgte dunkel abgedeckt, 1,5h bei Raumtemperatur, gefolgt von zwei Waschschrritten mit je 100µl PBS [1X].

Für die Messung wurden je well dem Ansatz 80µl Drive Fluid zugegeben, sanft gemischt und jeweils 100 Beads pro Beadpopulation zur Ermittlung der medianen Fluoreszenzintensität am MAGPIX™-System gemessen. Je Serum wurden drei voneinander unabhängige Tests durchgeführt.

2.2.5.2.5 Multiplex-CBA – Nachweis von Antikörpern gegen europäische Arboviren in Patientenproben

Wie schon zuvor in Kap. 2.2.5.2.3 und 2.2.5.2.4 beschrieben wurde mit dem Multiplex-CBA ein neuer serologischer Antikörpernachweis entwickelt (Schematische Darstellung siehe Abb. 2.7).

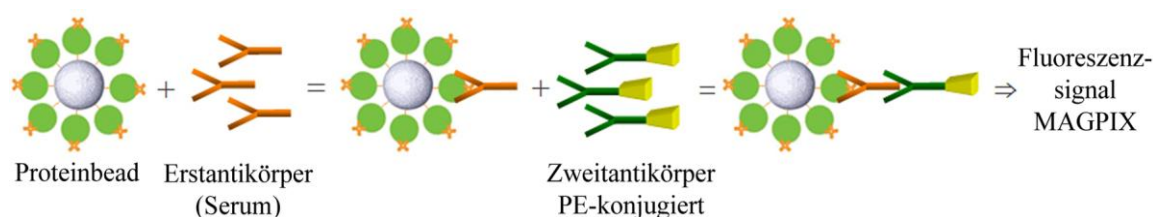


Abb. 2.7: Schematische Darstellung: Prinzip Cytometric Bead Array (CBA). Im ersten Inkubationsschritt binden die anti-viralen Antikörper des Serums spezifisch an die viralen Antigene auf den Proteinbeads. Im zweiten Inkubationsschritt bindet der fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper spezifisch an den Fc-Teil des Erstantikörpers. Die Fluoreszenzmessung erfolgt am MAGPIX™-System.

Zur Evaluation des Testverfahrens wurden die Seren von 111 Patienten mit der klinischen Diagnose der unklaren aseptischen Meningitis oder Meningoenzephalitis mittels Multiplex-CBA getestet, um Rückschlüsse auf eine vorliegende virale Infektionen ziehen zu können und eine Aussage über die Verbreitung dieser bislang vernachlässigten Viren zu erhalten. Alle Seren stammten aus einem TBEV-Endemiegebiet (Oberrheingraben) und wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Meyer-König, Universitätsklinikum Freiburg zur Verfügung gestellt. Durch Voranalysen in Freiburg konnten Herpes Simplex Virus Typ 1 und Typ 2 (HSV-1, HSV-2), Varicella Zoster Virus (VZV), Enteroviren, TBEV und Bakterien wie *Borrelia burgdorferi* als Auslöser der Erkrankung ausgeschlossen

werden (Meyer-König et al., 2014 in preparation; Weidmann, Armbruster & Hufert, 2008a; Weidmann, Meyer-König & Hufert, 2003a).

Um das Infektionsstadium (akute oder zurückliegende Infektion) festzulegen, wurden alle Seren auf IgM- und IgG-Antikörper untersucht. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte anti-IgM- und anti-IgG-Zweitantikörper verwendet.

2.2.5.2.6 Grenzwert-Berechnungen und Auswertung des Multiplex-CBA

Der Grenzwert (englisch: *cut off*) beschreibt den Wert, der das Mindestfluoreszenzsignal eines gekoppelten Proteinbeads angibt, das sicher von einer negativen Probe unterschieden werden konnte.

Ein Standardverfahren bei der Entwicklung serologischer Nachweismethoden ist das Messen gut charakterisierter Positivseren gleichen Ursprungs, an Hand derer ein Grenzwert errechnet wird und dessen Überschreitung zu einem positiven Ergebnis führt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde an einem Test zur Detektion von humanen Antikörpern aus menschlichem Serum gearbeitet.

Wie bereits in Kap. 1.1.2 erwähnt, handelt es sich bei den hier untersuchten Arboviren um bislang vernachlässigte Viren. Gut charakterisierte humane Positivseren für alle 15 Viren standen deswegen nicht zur Verfügung. Demnach musste zur Berechnung des Grenzwertes eine andere Methode gewählt werden.

Statt von Positivseren auszugehen, wurden 45 gut charakterisierte humane Negativseren verwendet und alle Grenzwertberechnungen aus Daten der gemessenen Negativseren durchgeführt.

Verglichen wurden 2 Methoden: Die aus Erfahrungsberichten stammende Standardformel (A): Mittelwert addiert mit der sechsfachen Standardabweichung und die nach (Frey, Di Canzio & Zurakowski, 1998) statistisch definierten Endpunkt Titer Bestimmung für Immuntests (B): Mittelwert addiert mit dem Produkt aus Standardabweichung und Multiplikator f .

Methode (A) zur Grenzwertberechnung:

Mittelwert (MW) der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) aller Negativseren addiert mit der sechsfachen Standardabweichung (SD) aller Negativseren. Jeweils pro Beadpopulation (BP). Es ergeben sich demnach für den Multiplex-CBA 17 einzelne Grenzwerte, pro gekoppelter Beadpopulation ein Wert.

$$\text{Grenzwert (A)} = \text{MW (MFI)} + 6 \times \text{SD}$$

Methode (B) zur Grenzwertberechnung:

Nach (Frey et al., 1998) gehen wir davon aus, dass unbekanntes Patientenmaterial nicht weniger Antikörper, als die hier verwendeten 45 Negativseren aufweisen. Daher wird zur Berechnung des Grenzwertes nur der obere (einseitige) Vertrauensbereich der t -Verteilung herangezogen. Der Grenzwert gibt damit eine Prognose zum oberen Limit bezogen auf die Negativkontrollen. Die Berechnungen beziehen sich jeweils auf eine Beadpopulation (BP). Es ergeben sich demnach für den Multiplex-CBA wieder 17 einzelne Grenzwerte, pro gekoppelter Beadpopulation ein Wert.

$$\text{Grenzwert (B)} = \text{MW (MFI)} + \text{SD} \times f$$

Mittelwert (MW) der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) aller 45 Negativseren addiert mit dem Produkt aus Standardabweichung (SD) aller Negativseren mal Multiplikator f .

$$f = t \times \sqrt{(1+1/n)}$$

In dieser Arbeit sei n die Anzahl an Negativseren, t der t -Wert einer einseitigen t -Verteilung mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9999% ($P=0,999999$) und einem Freiheitsgrad $v = n - 1$.

Um von einem signifikanten Serumtiternanstieg um zwei Titerstufen (vergleiche austitrierbare Testverfahren wie IFT, ELISA Kap. 1.2.1) sprechen zu können, sind zwei Blutproben eines Patienten innerhalb von zwei Wochen notwendig. Ist dies der Fall, ergeben sich folgende Möglichkeiten:

Fall 1: Erste Probe IgM und IgG negativ.

- ★ Keine virale Infektion, eine zweite Probe würde die Diagnose bestätigen.

Fall 2: Erste Probe IgM negativ und IgG positiv.

- ★ Hinweis auf eine virale Infektion, die Wochen bis Monate zurückliegt, eine zweite Probe mit gleichem Ergebnis schließt akute Infektion aus.

Fall 3: Erste Probe IgM positiv und IgG negativ.

- ★ Hinweis auf eine akute virale Infektion, eine zweite Probe müsste eine Serokonversion zeigen und IgG positiv ausfallen. In dem Fall wäre die Diagnose der akuten Infektion bestätigt.
- ★ Fällt das Ergebnis der zweiten Probe jedoch identisch aus (IgM positiv, IgG negativ) deutet eine ausbleibende Serokonversion auf ein falsch positives IgM Ergebnis hin oder auf eine polyklonale Stimmulierung, die z.B. bei Infektionen mit B-Zell-tropen Viren auftreten kann.

Fall 4: Erste Probe IgM und IgG positiv.

- ★ Hinweis auf akute virale Infektion. Sicherung der Diagnose durch zweite Probe mit IgG positivem Ergebnis und Titeranstieg. Ist dies der Fall handelt es sich um eine akute Infektion in der späten Phase, in der bereits weitgehend ein Titer ausgebildet ist. Begründeter Verdacht auf eine kurz zurückliegende Infektion.

Doppelproben lagen nur bei 6 von 111 Patienten vor. Bei allen Einzelproben kann demnach kein signifikanter Serumtiternanstieg ermittelt werden, dennoch kann der CBA durch Vergleich der Patientenprobe mit den definierten Negativseren auf eine vorliegende Infektion hinweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Amplifikation arboviraler Oberflächenproteingene

3.1.1 Primer-Generierung

Zur Amplifikation der viralen Oberflächenproteingene wurden Primer generiert, die an beiden Enden die kombinatorischen Überhänge (AATG bzw. GGGA) sowie die StarCombinase1TM Erkennungssequenz (5'-AGCGGCTCTTC) einfügten, über die eine Ligation in spezielle StarGate[®]-Vektoren (siehe Kap. 2.2.3.1) ermöglicht wurde.

Ausgehend von den Sequenzen der viralen Oberflächenproteingene ohne Start- und Stopp-Kodon (siehe Tabelle 3.1) wurden alle Primer mit der StarPrimer D'Signer Software (IBA) berechnet (siehe Tabelle 2.13). Die theoretischen Bandenlängen der PCR-Produkte (siehe Tabelle 3.1) stimmten mit den Bandengrößen nach PCR überein.

Tabelle 3.1: Übersicht Arboviren

Virus	Genabschnitt:	Länge nach PCR
Batai Virus (BATV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	726bp
Bhanja Virus (BHAV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	768bp
Erve Virus (ERVEV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	1917bp
Eyach Virus (EYAV)	Virales Protein Gen (VP6):	2124bp
Inkoo Virus (INKV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	732bp
Palma Virus (PALV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	768bp
Sandfly Fever Naples Virus (SFNV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	786bp
Sandfly Fever Sicilian Virus (SFSV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	765bp
Sandfly Fever Turkey Virus (SFTV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	765bp
Tahyna Virus (TAHV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	732bp
Tick Borne Encephalitis Virus (TBEV)	Nichtstruktur Protein Gen (NS1):	1086bp
Toscana Virus (TOSV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	786bp
Tribec Virus (TRBV)	Virales Protein Gen (VP7):	1098bp
Uukuniemi Virus (UUKV)	Nukleokapsid Protein Gen (N):	789bp
West Nil Virus (WNV)	Nichtstruktur Protein Gen (NS1):	1062bp

3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der erste Schritt zur Entwicklung des Cytometric-Bead-Arrays (CBA) bestand in der Amplifikation arboviraler Proteingene (siehe Tabelle 3.1), welche für Proteine mit antigenen Eigenschaften kodieren.

Für die Amplifikation der in Abb. 3.1 gezeigten PCR-Produkte wurde jeweils die Ausgangs-DNA mit den zugehörigen Vorwärts- und Rückwärts-Primern (siehe Tabelle 2.13) in die PCR-Reaktion (siehe Kap. 2.2.2.2) eingesetzt.

Die Ausgangs-DNA (Tabelle 2.11) trug jeweils den offenen Leserahmen (englisch: „*open reading frame ORF*“) für das Nukleokapsid-Protein (N) der Bunyaviren, das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) der Flaviviren bzw. ein auf der Oberfläche lokalisiertes virales Protein (VP) der Reoviren.

Alle amplifizierte DNA-Fragmente zeigten die erwarteten Größen und wurden wie in Kap. 2.2.2.3 beschrieben ausgeschnitten, isoliert und zur Ligation eingesetzt.

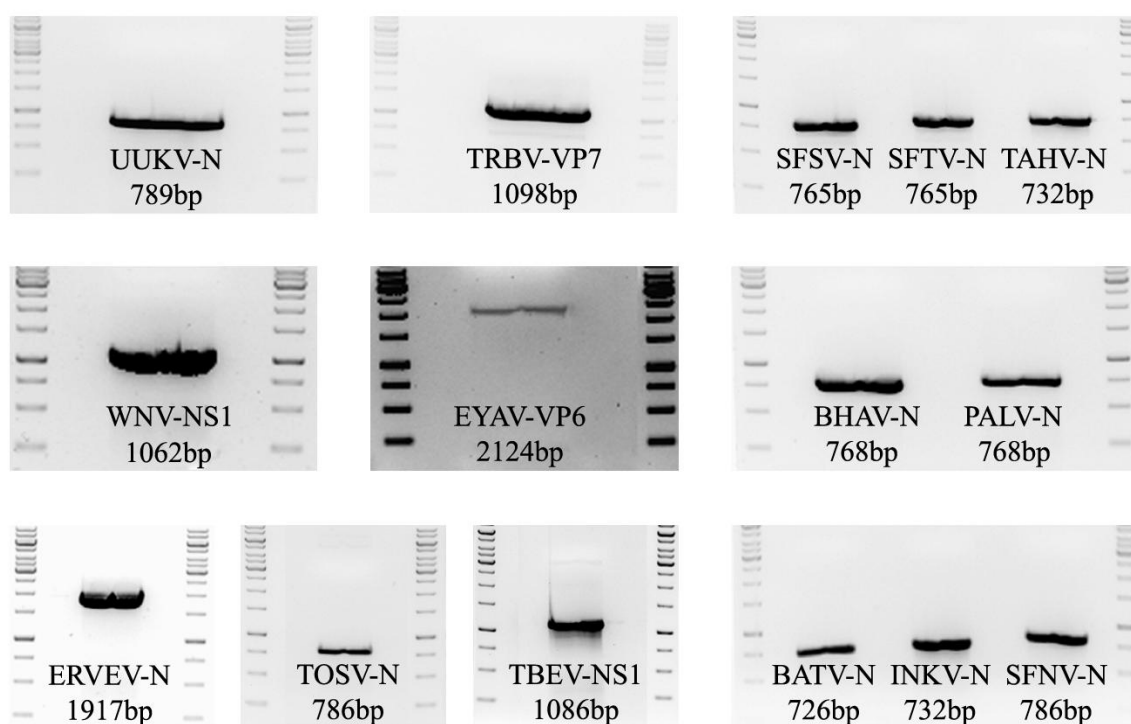


Abb. 3.1: Arbovirale DNA-Fragmente nach Amplifikation und Agarosegelelektrophorese. Es wurden pro Agarosegel [1%ig] jeweils rechts und links 2,5µl DNA-Längenstandard (1kb) und mittig 50µl PCR-Ansatz aufgetragen. Jedes Bild wurde mit Namen des Virus, des Proteingens und der erwarteter Bandenlänge versehen. Alle amplifizierte DNA-Fragmente zeigten die erwarteten Bandengrößen. DNA-Längenstandard von unten nach oben: 250bp, 500bp, 750bp, **1000bp**, 1500bp, 2000bp, 2500bp, **3000bp**, 3500bp, 4000bp, 5000bp, **6000bp**, 8000bp, 10000bp.

3.2 Ligation, Transformation und Sequenzierung

3.2.1 Ligation der amplifizierten DNA-Fragmente in den Donorvektor pENTRY-IBA51 und Transfer in den Expressionsvektor pASG-IBA5

Das verwendete StarGate®-System erforderte im ersten Schritt die Ligation des Amplikons in den Donorvektor pENTRY-IBA51 (siehe Kap. 2.2.3.1). Dies erfolgte für alle 15 Viren mittels StarGate®Combi-Entry-Cloning-Set. Zur Überprüfung der Konstrukte wurde zuerst ein Kontrollverdau mit den Enzymen HindIII und XbaI durchgeführt (siehe Kap.3.2.2), bei korrektem Bandenmuster wurde anschließend jeweils ein Klon zur Sequenzierung (siehe Kap. 2.2.2.4, bzw. Abb. 3.3) gegeben und an Hand der erhaltenen Daten eine Sequenzanalyse (Lasergene™) mit Datenbanksequenzen durchgeführt (siehe Kap.3.2.2: Abb. 3.4) und alle Konstrukte auf mögliche Mutationen überprüft.

Alle Konstrukte konnten hergestellt werden und wurden je nach Virus, Proteingen und Vektor benannt, so steht beispielsweise BATV-N-pENTRY-IBA51 für die Ligation des DNA-Fragmentes für das Nukleokapsid-Protein des Batai-Virus in den Donorvektor pENTRY-IBA51. Nach Überprüfung der hergestellten Donorplasmide auf Richtigkeit der Sequenz wurde das StarGate®Transfer-Reagent-Set zur schnellen Subklonierung der Gene vom Donorvektor pENTRY-IBA51 in das Akzeptorplasmid pASG-IBA5 verwendet. Eine schematische Darstellung des Vektors ist in Abb. 3.2 dargestellt (Quelle: IBA GmbH Datenblatt 5-4005-000).

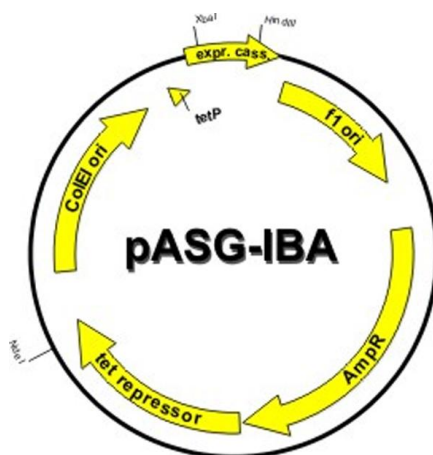


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pASG-IBA (Quelle: <http://www.iba-lifesciences.com/details/product/5-4005-005.html>). Der pASG-Vektor ermöglichte die Expression von Strep-tag®-Fusionsproteinen in *E. coli*. Der Vektor trägt den induzierbaren *tet*-Promotor/Operator (Anhydrotetracyclin, kurz AHT), sowie ein Ampicillin-Resistenzgen und ermöglicht die Expression von Proteinen mit N-terminal angefügtem Strep-tag®II.

3.2.2 Kontrollverdau und Sequenzierung der rekombinanten Donorvektoren

In Abb. 3.3 ist der Kontrollverdau mit den Enzymen HindIII und XbaI aller hergestellten rekombinanten Donorvektoren (pENRTY-IBA51) abgebildet. Die Ansätze wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese (siehe Kap. 2.2.2.3) aufgetrennt. Alle Ansätze zeigten die erwarteten Bandenmuster, die Bande bei 1819bp entspricht dabei der Größe des linearisierten, geschnittenen pENTRY-IBA51 Vektors, die anderen Banden zeigen die Inserts. Sind mehrere Banden zu sehen, liegt mindestens eine weitere Schnittstelle der eingesetzten Restriktionsendonukleasen innerhalb der Insertsequenz. Die Inserts sind durch die Lage der Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsendonukleasen insgesamt 40bp länger als die ursprünglichen viralen Proteingene (siehe Tabelle 2.11).

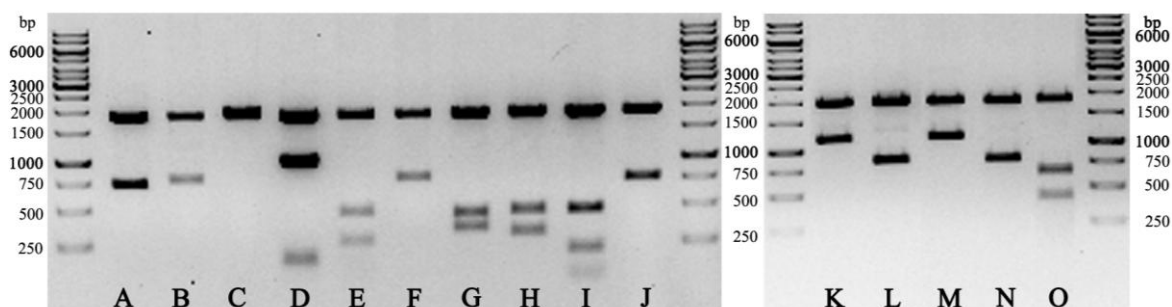


Abb. 3.3: Agarosegel nach Kontrollverdau aller hergestellten rekombinanten Donorplasmide. Es wurden pro Agarosegel [1%ig] jeweils rechts und links 2,5µl DNA-Längenstandard (1kb) aufgetragen. In Spur A-O wurden jeweils 10µl Restriktionsverdau aufgetragen, die in allen Spuren zu sehende Bande bei 1819bp entspricht der Größe des geschnittenen Vektors pENTRY-IBA51 [HindIII und XbaI]. **Spur A:** BATV-N-pENTRY-IBA51#1 Insertbande 736bp, **Spur B:** BHAV-N-pENTRY-IBA51#2 Insertbande 778bp, **Spur C:** ERVEV-N-pENTRY-IBA51#4b Insertbande 1927bp (auf Höhe der Vektorbande), **Spur D:** EYAV-VP6-pENTRY-IBA51#8 Insertbande 2134bp [Wegen interner XbaI und HindIII Schnittstellen ergeben sich 3 Banden bei 169bp, 989bp und 976bp], **Spur E:** INKV-N-pENTRY-IBA51#2 Insertbande 742bp [Wegen interner XbaI Schnittstelle ergeben sich 2 Banden bei 475bp und 267bp], **Spur F:** PALV-N-pENTRY-IBA51#3 Insertbande 778bp, **Spur G:** SFNV-N-pENTRY-IBA51#2 Insertbande 796bp [Wegen interner XbaI Schnittstelle ergeben sich 2 Banden bei 347bp und 449bp], **Spur H:** SFSV-N-pENTRY-IBA51#1 Insertbande 775bp [Wegen interner HindIII Schnittstelle ergeben sich 2 Banden bei 463bp und 312bp], **Spur I:** SFTV-N-pENTRY-IBA51#1 Insertbande 775bp [Wegen drei interner HindIII Schnittstellen ergeben sich 4 Banden bei 463bp, 67bp, 208bp und 37bp, letztere ist im Agarosegel nicht mehr zu sehen], **Spur J:** TAHV-N-pENTRY-IBA51#1 Insertbande 742bp, **Spur K:** TBEV-NS1-pENTRY-IBA51#2 Insertbande 1096bp, **Spur L:** TOSV-N-pENTRY-IBA51#1 Insertbande 796bp, **Spur M:** TRBV-VP7-pENTRY-IBA51#2 Insertbande 1108bp, **Spur N:** UUKV-N-pENTRY-IBA51#3 Insertbande 799bp, **Spur O:** WNV-NS1-pENTRY-IBA51#2 Insertbande 1072bp [Wegen interner HindIII Schnittstelle ergeben sich 2 Banden bei 653bp und 419bp].

Alle hergestellten rekombinanten Donorplasmide (siehe Tabelle 3.2) wurden wie in Kap. 2.2.2.4 beschrieben zur Sequenzierung gegeben. Die Sequenzanalysen wurden wie im Beispiel für BATV-N (siehe Abb. 3.4) durchgeführt und als sogenannte „Strategy View“

bildlich dargestellt. Eine Zusammenfassung aller Sequenzanalysen wurde in Kurzform ohne flankierende pENTRY-Sequenzen in Abb. 6.1 und ebenso beispielhaft die Sequenzanalyse von BATV-N als komplettes Alignment in Abb. 6.2 dem Anhang hinzugefügt.

Die Sequenzanalysen ergaben, dass fast alle Inserts fehlerfrei und in positiver Orientierung vorlagen. Alle Sequenzanalysen (Anhang Abb. 6.1 A-H) zeigten jeweils die Referenzsequenz und die sequenzierte DNA (einmal mit Vorwärts-Primer und einmal mit Rückwärts-Primer beginnend). Sofern die Länge der Sequenzen nicht ausreichte, um das komplette DNA-Fragment zu erfassen, wurde eine weitere Sequenzierung mit internem Primer hinzugefügt (siehe Anhang Abb. 6.1 C). Zusätzlich wurden die Konfliktbalken eingeblendet, schwarz bedeutet keine Mutation vorhanden.

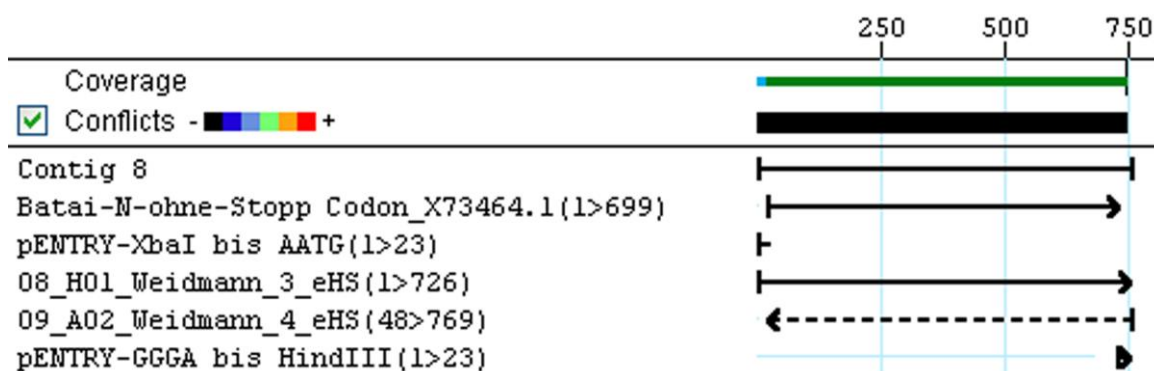


Abb. 3.4: Sequenzanalyse rekombinantes Donorplasmid Beispiel BATV. BATV-N-pENTRY-IBA51#1. Dargestellt ist der Vergleich der hergestellten DNA-Sequenz nach Ligation in den Donorvektor und Sequenzierung (08 mit Vorwärts-Primer und 09 mit Rückwärtsprimer) mit der Referenzsequenz Batai-N-ohne-Stopp Codon_X73464.1 und den flankierenden pENTRY-Sequenzen (Software:LasergeneTM).

Durch die Sequenzanalysen zeigten sich in zwei Konstrukten jeweils eine Punktmutation (siehe Anhang Abb. 6.1 C und E), erkennbar an der Unterbrechung des schwarzen Konfliktbalkens. Im Fall von ERVEV-N, mit einer Punktmutation von CCC (Prolin) zu TCC (Serin), führte dies bei der Proteinexpression zum Austausch der hydrophoben (unpolaren) Aminosäure Prolin durch die hydrophil neutrale (polare) Aminosäure Serin. Im Fall von INKV-N kodierte sowohl das ursprüngliche Basentriplett AAC (Asparagin) als auch das nach Punktmutation entstandene AGC (Serin) für eine hydrophil neutrale (polare) Aminosäure. Mit beiden Konstrukten wurde weitergearbeitet und die bei der Expression entstandenen Proteine wurden entsprechend auf antikörperbindende Eigenschaften hin untersucht (siehe Kap. 3.5.4).

3.2.3 Transformation in kompetente *E. coli* Zellen

Nach der Ligation erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* top 10 Zellen. Die positiven rekombinanten Bakterienklone wurden durch Blau-Weiß-Selektion (siehe Kap.2.2.3.3) identifiziert.

Anschließend wurden die Plasmide nach Minipräparation einzelner Klone (siehe Kap. 2.2.3.5) mittels spektrophotometrischer Messung auf Reinheit und Konzentration überprüft. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3 zusammengefasst. Alle Konstrukte enthielten ausreichende Konzentrationen, um damit weiter zu arbeiten. Eine Ankonzentration war nicht erforderlich. Der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ lag bei allen Proben zwischen 1,8 und 2,0 - ein Indiz für relativ proteinfreie DNA- bzw. RNA-Präparationen.

Tabelle 3.2: Übersicht aller hergestellten rekombinanten Donorplasmide

Rekombinantes Plasmid	Klon Nr.	OD₂₆₀/OD₂₈₀	Konzentration [ng/μl]
BATV-N-pENTRY-IBA51	1	2,0	64,58
BHAV-N-pENTRY-IBA51	2	1,9	43,54
ERVEV-N-pENTRY-IBA51	4b	1,9	115,19
EYAV-VP6-pENTRY-IBA51	8	2,0	158,01
INKV-N-pENTRY-IBA51	2	2,0	29,72
PALV-N-pENTRY-IBA51	3	1,8	23,11
SFNV-N-pENTRY-IBA51	2	1,9	62,71
SFSV-N-pENTRY-IBA51	1	1,9	65,43
SFTV-N-pENTRY-IBA51	1	1,9	77,67
TAHV-N-pENTRY-IBA51	1	1,9	56,25
TBEV-NS1-pENTRY-IBA51	2	1,9	53,61
TOSV-N-pENTRY-IBA51	1	2,0	65,72
TRBV-VP7-pENTRY-IBA51	2	1,8	123,46
UUKV-N-pENTRY-IBA51	3	1,8	106,72
WNV-NS1-pENTRY-IBA51	2	1,9	97,03

Tabelle 3.3: Übersicht aller hergestellten rekombinanten Expressionsplasmide

Rekombinantes Plasmid	Klon Nr.	OD₂₆₀/OD₂₈₀	Konzentration [ng/μl]
BATV-N-pASG-IBA5	1b	2,0	43,47
BHAV-N-pASG-IBA5	5	2,0	56,42
ERVEV-N-pASG-IBA5	1b	2,0	54,99
EYAV-VP6-pASG-IBA5	8-1	1,9	124,94
INKV-N-pASG-IBA5	3	1,8	50,46
PALV-N-pASG-IBA5	3	2,0	26,06
SFNV-N-pASG-IBA5	12	1,9	89,90
SFSV-N-pASG-IBA5	3	1,8	58,50
SFTV-N-pASG-IBA5	11	1,9	57,65
TAHV-N-pASG-IBA5	12	2,0	83,93
TBEV-NS1-pASG-IBA5	2b	1,9	54,00
TOSV-N-pASG-IBA5	4b	1,9	99,86
TRBV-VP7-pASG-IBA5	2	1,9	96,97
UUKV-N-pASG-IBA5	2	1,9	81,52
WNV-NS1-pASG-IBA5	1b	1,8	57,15

3.3 Expression arboviraler Proteine

3.3.1 *In vivo* Proteinexpression in *E. coli* Bakterienkulturen

Nach der Herstellung aller Expressionsplasmide (siehe Tabelle 3.3) erfolgte die Expression der viralen Proteine. Hierzu wurde jedes Konstrukt durch Transformation in BL21(DE3) *E. coli* Zellen gebracht (siehe Kap. 2.2.3.3), anschließend wurden die Proteine, wie in Abb. 3.5 dargestellt, exprimiert und zentrifugiert, um die löslichen von den unlöslichen Proteinen zu trennen. Die Proteine wurden entsprechend des viralen Ursprungs und des Proteingens benannt: BATV-N, BHAV-N, ERVEV-N, EYAV-VP6, INKV-N, PALV-N, SFNV-N, SFSV-N, SFTV-N, TAHV-N, TBEV-NS1, TOSV-N, TRBV-VP7, UUKV-N, WNV-NS1. Alle Transformationsplatten zeigten positive weiße Klone und führten zum Anwachsen der Vor- und Hauptkultur. Nach Zentrifugation enthielt das Pellet die intakten *E. coli* Zellen inklusive der exprimierten viralen Proteine.

Um an die enthaltenen exprimierten rekombinanten Proteine zu gelangen, wurde das Zellpellet zuerst über Nacht bei -20°C eingefroren und dann mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Zuletzt wurden alle Ansätze zentrifugiert, die löslichen Proteine (im Überstand) wurden von den unlöslichen Proteinen und Zellresten (im Pellet) getrennt und separat gelagert.

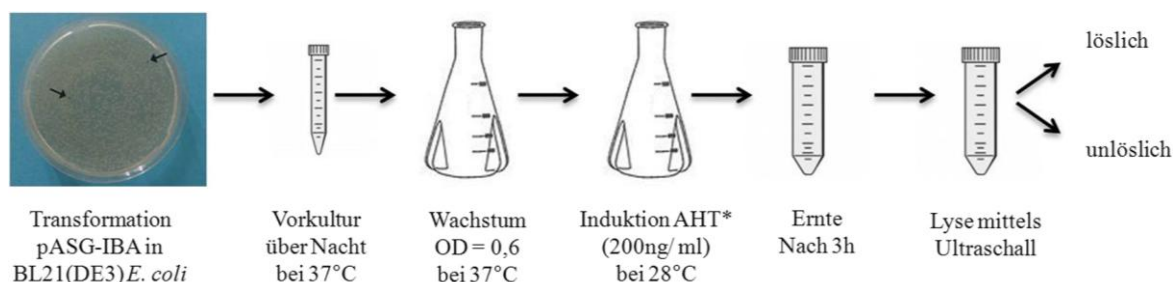


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Proteinexpression mit Expressionsvektor pASG-IBA. Nach der Transformation der rekombinanten Expressionsplasmide in BL21(DE3) *E. coli* Zellen wurde eine Vorkultur angelegt, damit eine Hauptkultur inokuliert und die Proteinexpression nach Erreichen einer optischen Dichte (OD) von etwa 0,6 durch Zugaben von Anhydrotetracyclin* (AHT) induziert. Nach drei Stunden wurden die Zellen geerntet, mittels Ultraschall lysiert und durch Zentrifugation die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen getrennt.

Die Proben nach Lyse wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 2.2.4.2) der Größe nach aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (Western Blot) (siehe Kap. 2.2.4.3). Der Nachweis der Gesamtproteinmenge erfolgte durch Färbung der PVDF-Membran mit Amidoschwarz. Das Ergebnis wurde in Abb. 3.6 für alle exprimierten Proteine (BATV-N, ERVEV-N, TAHV-N, TBEV-NS1, TRBV-VP7, TOSV-N, UUKV-N, WNV-NS1, SFSV-N, SFNV-N, INKV-N, SFTV-N, BHAV-N, PALV-N, EYAV-VP6) zusammengefasst.

Sofern eine ausreichende Proteinkonzentration im Überstand enthalten war, wurde direkt mit dem Überstand weiter gearbeitet (siehe Kap. 3.3.2), ansonsten wurde das Pellet zuvor solubilisiert (siehe Kap. 2.2.4.5). Eine Solubilisierung erfolgte bei den Reoviren (TRBV-VP7, EYAV-VP6), den Flaviviren (TBEV-NS1, WNV-NS1) und dem Nairovirus ERVEV-N.

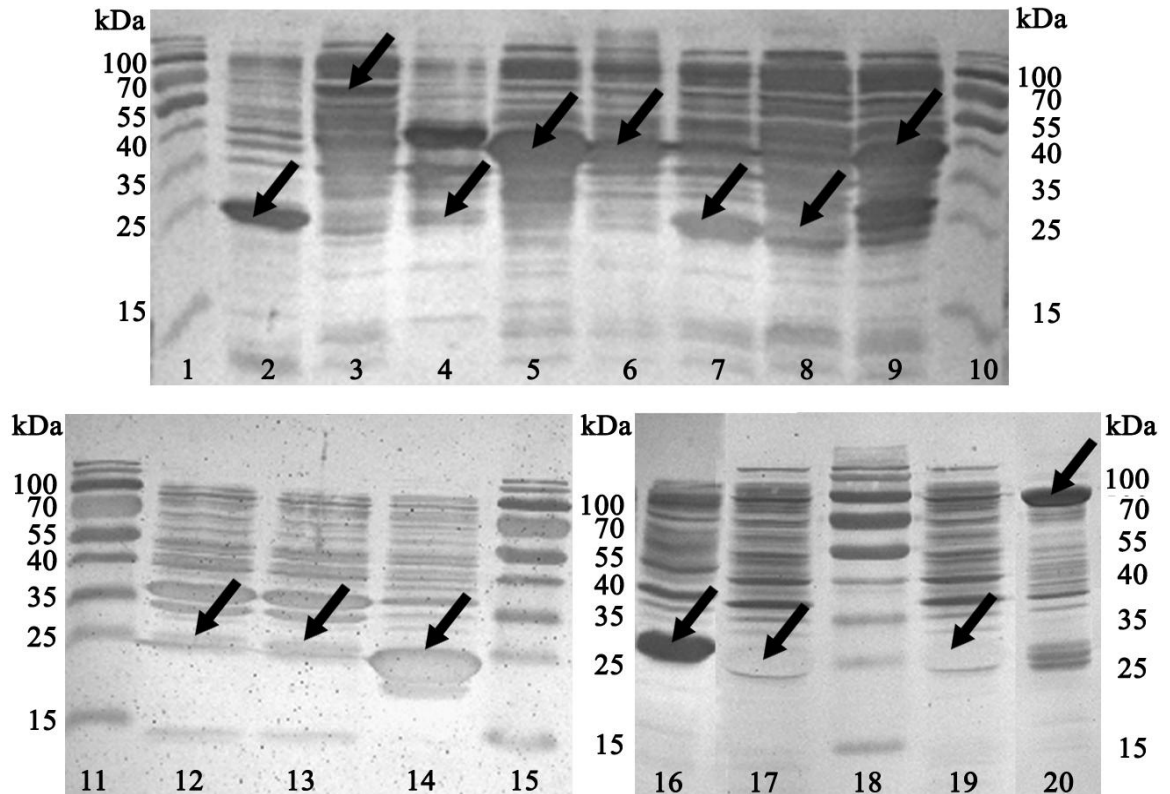


Abb. 3.6: Western Blot (Amidoschwarz) der exprimierten Proteine in BL21(DE3) *E. coli* Zellen. Dargestellt sind PVDF-Membranen gefärbt mit Amidoschwarz. Es wurden pro Spur jeweils 5 μ l Molekulargewichtsmarker (15-170kDa) bzw. 10 μ l Probe nach Lyse aufgetragen. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: BATV-N (28,2kDa), Spur 3: ERVEV-N (71,6kDa), Spur 4: TAHV-N (28,4kDa), Spur 5: TBEV-NS1 (41,0kDa), Spur 6: TRBV-VP7 (41,7kDa), Spur 7: TOSV-N (29,4kDa), Spur 8: UUKV-N (30,2kDa), Spur 9: WNV-NS1 (40,7kDa), Spur 10: Molekulargewichtsmarker, Spur 11: Molekulargewichtsmarker, Spur 12: SFSV-N (29,2kDa), Spur 13: SFNV-N (29,6kDa), Spur 14: INKV-N (28,2kDa), Spur 15: Molekulargewichtsmarker, Spur 16: SFTV-N (29,2kDa), Spur 17: BHAV-N (29,1kDa), Spur 18: Molekulargewichtsmarker, Spur 19: PALV-N (29,2kDa), Spur 20: EYAV-VP6 (80,0kDa).

3.3.2 Reinigung, Dialyse und Quantifizierung aller exprimierten Proteine

Nachdem die Expression der rekombinanten Proteine (siehe Abb. 3.6) bestätigt wurde, wurde (wie in Kap. 2.2.4.6 beschrieben) die Reinigung durch Säulenchromatographie durchgeführt, die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen ermittelt, positive Fraktionen vereint und anschließend in PBS [1X] dialysiert (Kap. 2.2.4.7).

In Tabelle 3.4 wurden alle Ergebnisse der Reinigung, Dialyse der Proteine und Quantifizierung der Fraktionen zusammengefasst. D steht für Durchfluss, W für Waschschrift, E für Eluatfraktion, grau unterlegte Eluatfraktionen wurden vereint, anschließend dialysiert und quantifiziert. Bei den in den Fraktionen D-W4 enthaltenen Proteinen, handelt es sich um Proteine ohne spezifischen Tag.

Diese bei der Expression entstandenen Nebenprodukte (z.B. *E. coli* Proteine der Kultur) passierten die Säulenmatrix ohne an diese zu binden. In Fraktion W5 konnten in keinem Ansatz Proteine nachgewiesen werden, somit enthielten die Eluatfraktionen E größtenteils die exprimierten rekombinanten viralen Proteine mit Tag.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung nach Reinigung und Konzentrationsermittlung

Protein	D	W1	W2	W3	W4	W5	E1	E2	E3	E4	E5	E6
BATV-N	+	+	+	(+)	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-
BHAV-N	+	+	(+)	-	-	-	(+)	+	+	+	(+)	(+)
ERVEV-N [S]	+	+	+	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-
EYAV-VP6 [S]	+	+	(+)	-	-	-	-	+	+	(+)	(+)	-
INKV-N	+	+	(+)	-	-	-	-	+	+	(+)	(+)	-
PALV-N	+	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)
SFNV-N	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	(+)	(+)	-
SFSV-N	+	+	(+)	-	-	-	(+)	+	+	+	(+)	-
SFTV-N	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
TAHV-N	+	+	(+)	-	-	-	+	+	+	+	+	(+)
TBEV-NS1 [S]	+	+	+	(+)	-	-	(+)	+	(+)	(+)	-	-
TOSV-N	+	+	+	(+)	(+)	-	+	+	+	+	+	(+)
TRBV-VP7 [S]	+	+	+	(+)	-	-	-	+	(+)	-	-	-
UUKV-N	+	+	+	(+)	(+)	-	+	+	+	+	+	+
WNV-NS1 [S]	+	+	(+)	-	-	-	-	+	(+)	-	-	-

[S]: solubilisiertes Protein : dialysiert - : 0-19µg/ml (+) : 20-99µg/ml + : ab 100µg/ml

3.3.3 Spezifischer Protein-Nachweis mittels Western-Blot

Nach Reinigung und Dialyse wurden alle Proben auf SDS-Gele aufgetragen, mittels SDS-PAGE (Kap.2.2.4.2) aufgetrennt und durch Western-Blot auf PVDF-Membranen transferiert (Kap.2.2.4.3). Die Membranen wurden, wie in Kap. 2.2.4.4 beschrieben, gewaschen, unspezifische Bindungsstellen geblockt und mit Anti-Strep-tag®II-HRP Antikörper inkubiert, welcher spezifisch an den Strep-tag®II der exprimierten Proteine bindet. Der Strep-tag®II-Nachweis der exprimierten Proteine erfolgte durch Aufnahme der

Chemilumineszenz nach ECL-Reaktion am Chemidoc XRS. Das Ergebnis wurde in Abb. 3.7 für alle Proben zusammengefasst. Alle Spuren zeigten die erwarteten Bandengrößen. Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen aller vereinten und dialysierten Proteinproben sind aus der Tabelle 3.5 in Kapitel 3.5.1 abzulesen.

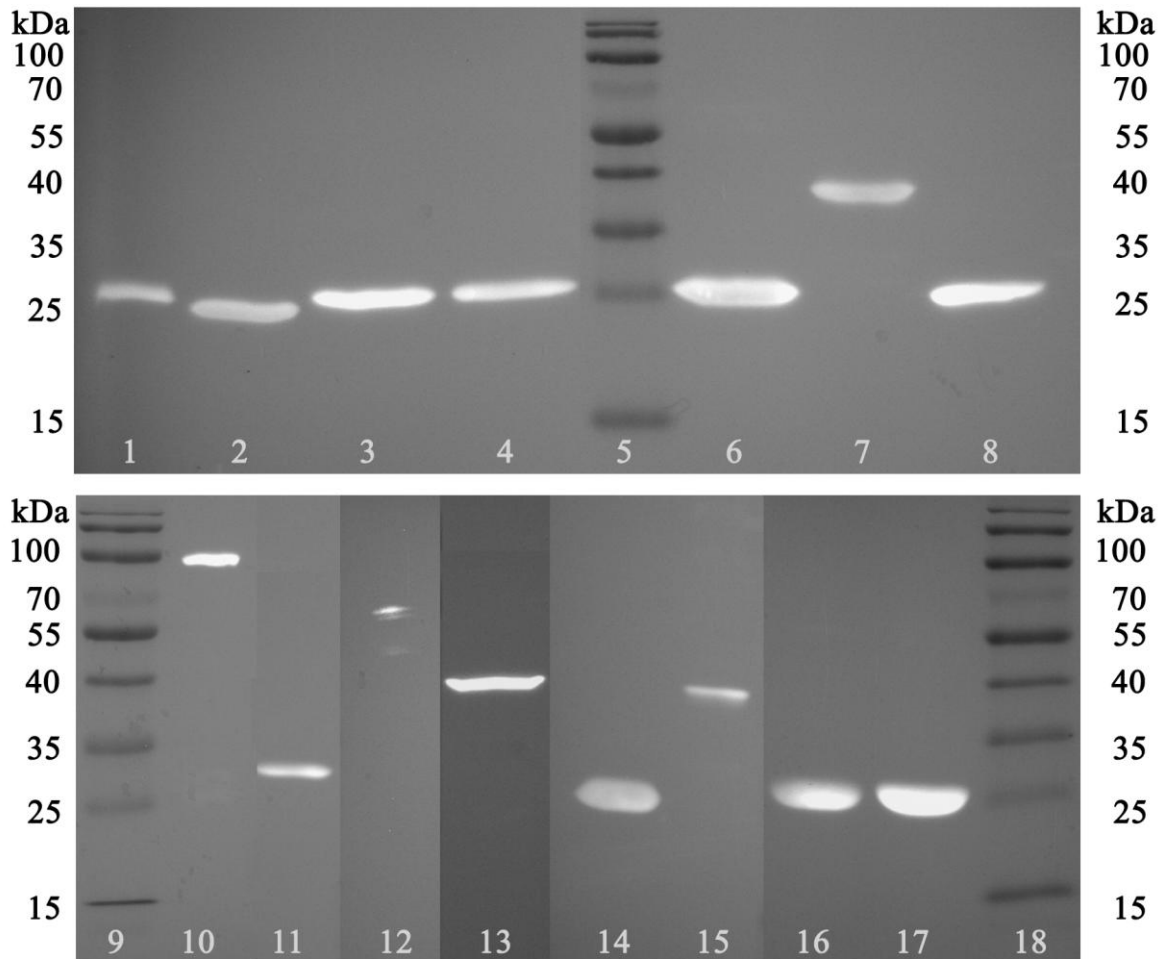


Abb. 3.7: Nachweis der exprimierten Proteine mit Strep-tag[®]II durch Anti-Strep-tag[®]II-HRP (ECL). Dargestellt sind Chemilumineszenz-Aufnahmen von PVDF-Membranen nach Western-Blot und Inkubation mit Anti-Strep-tag[®]II-HRP. Es wurden pro Spur jeweils 5 µl Molekulargewichtsmarker (15-170 kDa) bzw. 20 µl Probe nach Reinigung und Dialyse aufgetragen. Spur 1: BATV-N (28,2 kDa), Spur 2: INKV-N (28,2 kDa), Spur 3: SFNV-N (29,6 kDa), Spur 4: SFSV-N (29,2 kDa), Spur 5: Molekulargewichtsmarker, Spur 6: TOSV-N (29,4 kDa), Spur 7: TRBV-VP7 (41,7 kDa), Spur 8: UUKV-N (30,2 kDa), Spur 9: Molekulargewichtsmarker, Spur 10: EYAV-VP6 (80,0 kDa), Spur 11: SFTV-N (29,2 kDa), Spur 12: ERVEV-N (71,6 kDa), Spur 13: WNV-NS1 (40,7 kDa), Spur 14: TAHV-N (28,4 kDa), Spur 15: TBEV-NS1 (41,0 kDa), Spur 16: PALV-N (29,2 kDa), Spur 17: BHAV-N (29,1 kDa), Spur 18: Molekulargewichtsmarker.

3.4 Bestätigung verwendeter Positivseren durch Immunfluoreszenztest (IFT)

Für die Entwicklung neuer Nachweismethoden sind Positivkontrollen unverzichtbar. Um sicherzustellen, dass es sich bei den zur Verfügung gestellten Seren (siehe Tabelle 2.14) tatsächlich um Seren mit viralem Antikörpertiter handelte, wurde jedes Serum in einem eigens entwickelten Immunfluoreszenztest (siehe Kap. 2.2.5.1) überprüft. Je Objektträger wurde ein Feld mit Negativserum inkubiert, weitere Felder des Objektträgers mit dem jeweiligen Positivserum in den Verdünnungen 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120. In Abb. 3.8 wurden Fluoreszenzmikroskopaufnahmen (600fache Vergrößerung) der infizierten Zellen nach Inkubation mit dem jeweiligen Positivserum und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper zusammengefasst.

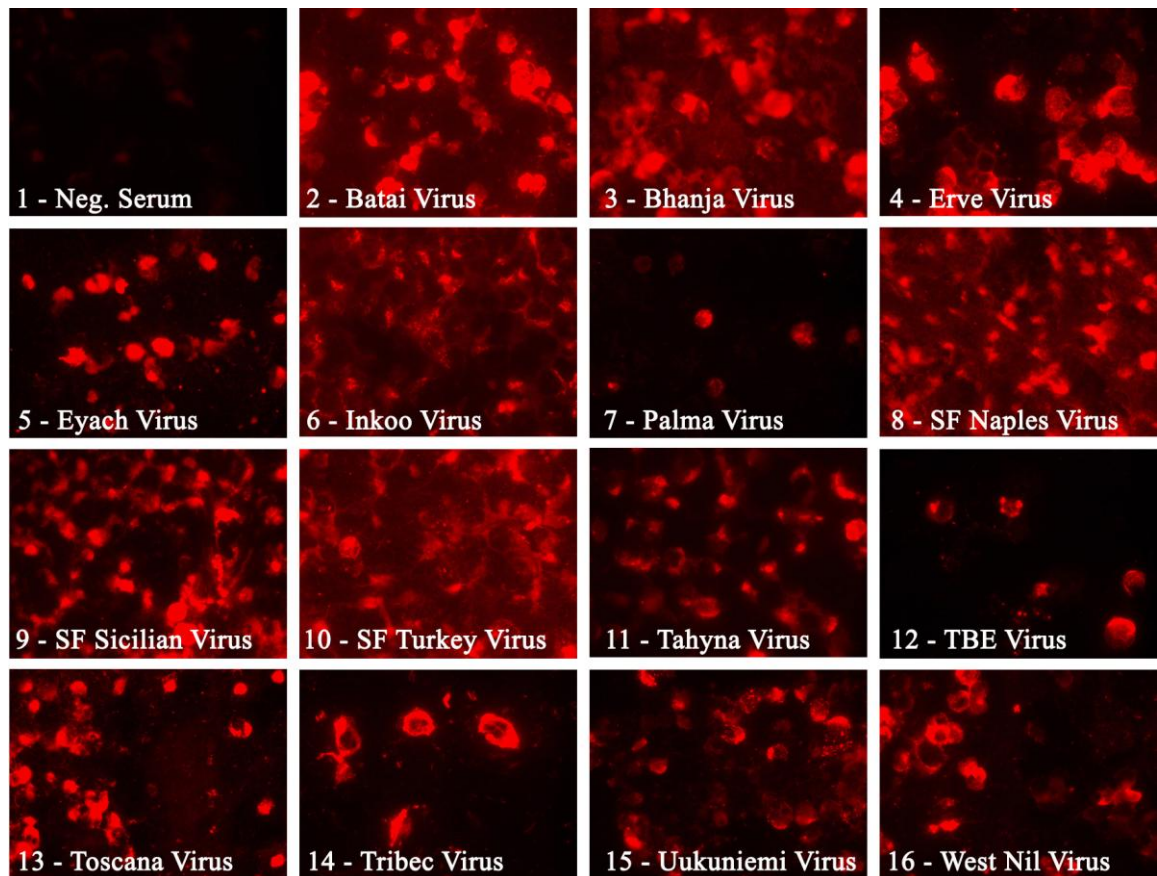


Abb. 3.8: Kontrolle der Positivseren durch Immunfluoreszenztest (IFT). Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopaufnahmen von infizierten Vero E6 bzw. Vero B4 Zellen nach Inkubation mit dem jeweiligen Positivserum und fluoreszenzmarkiertem (Cy3) Zweitantikörper in 600facher Vergrößerung. Die Bildbeschriftungen nennen jeweils das Virus, das zum Infizieren der Zellen verwendet wurde. Da für Inkoo Virus kein Positivserum vorhanden war, wurde wegen bekannter Kreuzreaktionen von Inkoo Virus und Tahyna Virus, für die Kontrolle das Tahyna Virus Serum mit Inkoo Virus infizierten Zellen verwendet.

Alle Positivseren zeigten eine deutliche Reaktion mit den jeweiligen mit Virus infizierten Zellen. Die eingesetzte Negativkontrolle (siehe Abb. 3.8 – 1) zeigte jeweils eine deutlich schwächere bis gar keine Fluoreszenz und wurde nur einmalig in Abb. 3.8 dargestellt. In Tabelle 3.5 wurden die Ergebnisse der Fluoreszenzauswertung zusammengefasst. Bei den Positivseren handelte es sich eindeutig um Seren mit entsprechendem viralen Antikörper-titer. In der Tabelle wurde jeweils die maximale Nachweisgrenze, also die höchste positive Verdünnung des Serums aufgeführt. Alle Positivseren konnten zur Ermittlung der Sensitivität des CBA und zur Multiplex-CBA Entwicklung (siehe Kap.3.5.4) verwendet werden.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der IFT Ergebnisse

Positivserum	IFT - Virus	Ursprung	IFT - Nachweisgrenze
Anti-Calovo	Batai Virus	Maus	1:1280
Anti-Bhanja	Bhanja Virus	Maus	1:320
Anti-Erve	Erve Virus	Maus	1:2560
Anti-Eyach	Eyach Virus	Maus	1:160
Anti-Palma M4756	Palma Virus	Maus	1:1280
Nap1	SFN Virus	Human	1:80
S18	SFS Virus	Human	1:80
SC1	SFT Virus	Human	1:1280
Anti-Tahyna 181	Inkoo Virus*	Maus	1:320
Anti-Tahyna 181	Tahyna Virus	Maus	1:640
RSSE-AK IgG	TBE Virus	Maus	1:1280
T6	Toscana Virus	Human	1:80
Anti-Tribec	Tribec Virus	Maus	1:1280
Anti Uuk	Uukuniemi Virus	Maus	1:2560
West Nil MIAF	West Nil Virus	Maus	1:1280

*: Wegen bekannter Kreuzreaktionen konnte das Anti-Tahyna Virus Serum auch zum Inkoo Virus Nachweis verwendet werden. Ein Positivserum für das Inkoo Virus stand nicht zur Verfügung.

3.5 Entwicklung des CBA als Multiplex-Test

3.5.1 Beweis der Kopplung spezifischer arboviraler Proteine an farbkodierte Populationen magnetischer carboxylierter Beads

Nach erfolgreichem Abschluss der Expression, Reinigung, Dialyse und Quantifizierung aller arboviralen Proteine erfolgte die Kopplung an magnetische carboxylierte Beads (siehe Kap. 2.2.5.2.1). Jeweils 10µg Protein wurde zur Kopplung eingesetzt. Pro Expression wurde eine andere farbkodierte Beadpopulation verwendet (siehe Abb. 2.5). Die Ergebnisse der Konzentrationsermittlung, das zur Kopplung eingesetzte Volumen, die Beadpopulation und die Ergebnisse der Kopplungsüberprüfung wurden in Tabelle 3.6 für alle Viren zusammengefasst. Durch zu geringe Proteinkonzentrationen wurde das empfohlene Kopplungsvolumen von 200µl bei ERVEV-N, EYAV-VP6 und SFSV-N überschritten, die anschließende Kopplungsüberprüfung mit Strep-Tactin-R-PE (siehe Kap. 2.2.5.2.2) zeigte für alle Kopplungen deutliche Fluoreszenzsignale (MFI).

Tabelle 3.6: Zusammenfassung Kopplung der Proteine mit Beads und Kopplungsbeweis

Protein	Konzentration [µg/ ml]	Volumen [µl]	Beadpopulation [Nummer]	Kopplungsbeweis [MFI] n=2
BATV-N	95,09	105,16	44	13854 + 12031
BHAV-N	758,15	13,19	37	51911 + 50172
ERVEV-N	24,86	402,25	35	12972 + 11283
EYAV-VP6	44,25	225,99	55	23901 + 23187
INKV-N	89,31	111,97	34	22426 + 22386
PALV-N	423,83	23,59	53	47316 + 45001
SFNV-N	1499,10	6,67	27	43390 + 41002
SFSV-N	43,03	232,40	29	26041 + 25054
SFTV-N	538,70	18,56	63	39161 + 35335
TAHV-N	1382,57	7,23	46	28621 + 27024
TBEV-NS1	156,21	64,02	36	19608 + 17664
TOSV-N	912,03	10,96	54	43414 + 42486
TRBV-VP7	211,51	47,28	52	89678 + 92433
UUKV-N	563,09	17,76	26	59747 + 58663
WNV-NS1	52,74	189,61	62	8047 + 8622

3.5.2 Vermeidung falsch positiver Ergebnisse durch verbliebene *E. coli* Proteine

Um falsch positive Signale zu vermeiden wurde von einer nicht absoluten Reinheit der Fusionsproteine nach Säulenchromatographie (siehe Kap.2.2.4.6) ausgegangen. Diese Annahme wurde durch zwei Versuche unterschiedlichen Ansatzes überprüft:

Erste Methode Immunoblot: Jeweils 1µg Proteinprobe, wie schon in Kap. 3.3.3 (nach Säulenchromatographie vereint und gegen PBS dialysiert) wurde mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 2.2.4.2) und Western-Blot (siehe Kap. 2.2.4.3) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Proben wurden zum Nachweis von verbliebenen *E. coli* Proteinen zuerst mit einem polyklonalen Kaninchenserum mit hohem Anti-*E. coli* Antikörpertiter [Anti-*Escherichia coli* Polyclonal Rabbit 1:750] und anschließend mit Anti-Kaninchen-HRP Antikörper [Anti-Rabbit IgG 1:16000] inkubiert. Zusätzlich wurden zwei Positivkontrollen des *E. coli* Lysats (RTS100 und BL21DE3 Reinkultur) mitgeführt.

Die in Abb. 3.9 beispielhaft dargestellte Chemilumineszenz, nach ECL-Reaktion und Signalaufnahme am Chemidoc XRS der Proteinproben von INKV-N, SFNV-N, SFSV-N, TBEV-NS1, TOSV-N, TRBV-VP7, UUKV-N zeigte eine leichte Reaktion auf *E. coli* Antikörper. In allen untersuchten Proteinproben zeigte sich eine schwache *E. coli* spezifische Bande < 15kDa.

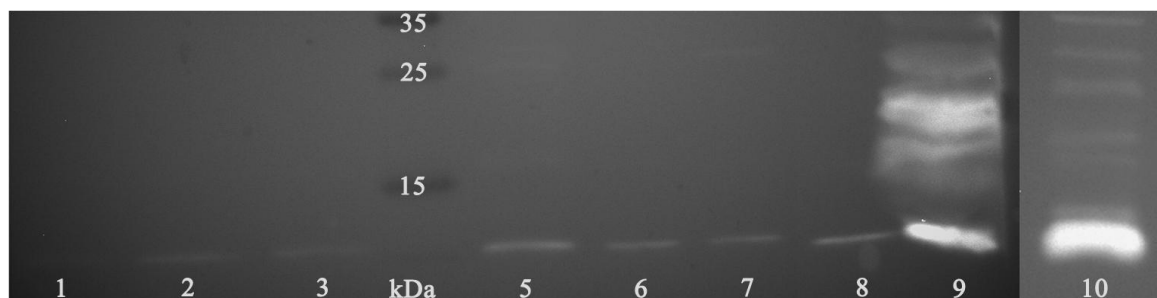


Abb. 3.9: Ausschnitt einer Chemilumineszenz-Aufnahme zum Nachweis verbliebener *E. coli* Proteine. Dargestellt sind Chemilumineszenz-Aufnahmen einer PVDF-Membran nach Western-Blot und Inkubation mit Anti-*Escherichia coli* Polyclonal Rabbit und Anti-Rabbit IgG-HRP Antikörper. Spur 1: INKV-N (11,2µl), Spur 2: SFNV-N (0,7µl), Spur 3: SFSV-N (23,3µl), Spur 4: Molekulargewichtsmarker 15-170kDa (5µl), Spur 5: TBEV-NS1 (6,4µl), Spur 6: TOSV-N (1,1µl), Spur 7: TRBV-VP7 (4,7µl), Spur 8: UUKV-N (1,8µl), Spur 9: *E. coli* Lysat RTS 100 (2µl), Spur 10: BL21(DE3) *E. coli* Lysat (2µl). Die Proben in Spur 1-3 + 5-8 entsprechen einer Proteinkonzentration von ca. 1µg Gesamtprotein.

Zweite Methode CBA: Überprüfung der bereits gekoppelten farbkodierten magnetischen Beads (siehe Kap. 2.2.5.2.1) durch eine aufeinander folgende Doppelinkubation mit polyklonalem Kaninchenserum mit hohem Anti-*E.coli* Antikörpertiter [Anti-*E.coli* Polyclonal Rabbit 1:750] und Anti-Rabbit IgG-R-PE Zweitantikörper [1:50]. Je 50µl Ansatz wurden 1µl Proteinbead-Stock zugegeben. 1µl Stock entsprechen etwa 8000 Beads.

Die Ergebnisse wurden in Tabelle 3.7 zusammengefasst, pro Messung wurden mind. 100 Beads am MAGPIX™-System gemessen und daraus die MFI berechnet.

Tabelle 3.7: Nachweis auf verbliebene *E. coli* Proteine durch CBA

Protein	Beadpopulation [Nummer]	Anti- <i>E. coli</i> [MFI] n=1
BATV-N	44	17072
BHAV-N	37	1244
ERVEV-N	35	11013
EYAV-VP6	55	15284
INKV-N	34	4907
PALV-N	53	989
SFNV-N	27	8574
SFSV-N	29	9270
SFTV-N	63	3908
TAHV-N	46	8748
TBEV-NS1	36	13636
TOSV-N	54	2003
TRBV-VP7	52	11223
UUKV-N	26	913
WNV-NS1	62	21898

Sowohl Immunoblot, wie auch CBA-Methode belegen, dass eine geringe Menge verbliebener *E. coli* Proteine der Expressionskultur nach Reinigung mittels Säulenchromatographie und Dialyse in den Proteinproben vorlagen und somit ebenfalls an der Beadoberfläche der Proteinbeads gekoppelt wurden.

Die in Abb. 3.10 zusammengefassten Ergebnisse zeigen die mediane Fluoreszenzintensität [MFI] für den spezifischen Protein-TAG (Strep-tag®II) Nachweis (siehe Kap. 3.5.1) je Beadpopulation, sowie die MFI für den *E. coli* Antikörper Nachweis, als Indiz für verbliebene *E. coli* Proteine.

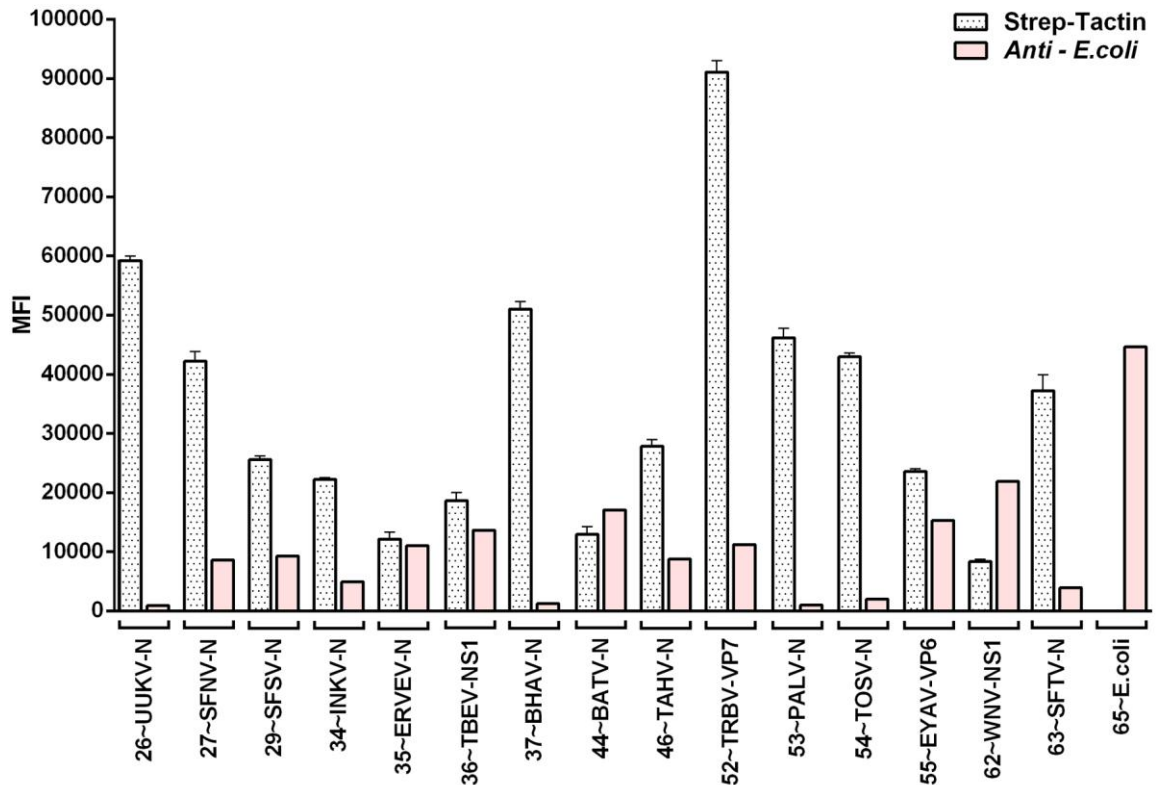


Abb. 3.10: Vergleich von MFI (Anti-*E. coli*) und MFI (Strep-Tactin-R-PE). Alle Proteinbeads (von links: UUKV-N, SFNV-N, SFSV-N, INKV-N, ERVEV-N, TBEV-NS1, BHAV-N, BATV-N, TAHV-N, TRBV-VP7, PALV-N, TOSV-N, EYAV-VP6, WNV-NS1, SFTV-N) zeigen ein deutliches Signal beim Nachweis des spezifischen Protein-TAGs (Strep-tag®II), ebenfalls zeigen alle Proteinbeads eine Reaktion auf *E. coli* Antikörper (Software: GraphPad Prism 6).

Seren mit einem hohen *E. coli*-Antikörpertiter könnten demnach zu einem Fluoreszenzsignal der Proteinbeads führen, obwohl keine viralen Antikörper im Serum vorhanden sind. Um diese falsch positiven Signale auszuschließen, wurde die Entwicklung einer internen Kontrolle des CBA auf *E. coli* Antikörper notwendig (in Abb. 3.10 als Beadpopulation 65 vorweggenommen dargestellt). Des Weiteren wurde eine Methode zum Abfangen der störenden *E. coli*-Antikörper aus Patientenmaterial und somit eine Reduktion der Reaktion aller Proteinbeads auf *E. coli*-Antikörper erarbeitet, welche im folgenden Kapitel behandelt wird.

3.5.3 Entwicklung interner Kontrollen und Notwendigkeit der Präadsorption

3.5.3.1 Entwicklung interner CBA Kontrollen

Für die interne Kontrolle des CBAs wurde eine reine BL21(DE3) *E. coli* Expressionskultur (ohne Plasmidtransformation) verwendet. Hierzu wurde der Versuch der Proteinexpression und Lyse (siehe Kap.2.2.4.1) mit einer Reinkultur durchgeführt, die Gesamtmenge aller exprimierten *E. coli* Proteine nach Zellaufschluss ermittelt (BCA-Test: 8817,5µg/ml) und 10µg Gesamtprotein (1,13µl) an Beadpopulation #65 gekoppelt. Eine weitere interne Kontrolle des CBAs stellte die Kopplung von 10µg BSA (Stock: 2mg/ml) an Beadpopulation #42 dar. Beide Kontrollen wurden, wie in Kap. 2.2.5.2.2 beschrieben, mit Strep-Tactin-R-PE inkubiert. Wie erwartet konnte kein Fluoreszenzsignal gemessen werden, da die Kontrollen und Strep-Tactin-R-PE nicht miteinander Kreuzreagieren und sich somit wie eine ungekoppelte Rohbeadpopulation verhalten.

Die aufeinander folgende Doppelinkubation mit polyklonalem Kaninchenserum mit hohem Anti- *E. coli* Antikörpertiter [Anti- *E. coli* Polyclonal Rabbit 1:750] und Anti-Rabbit IgG-R-PE Zweitantikörper [1:50] (siehe Kap.3.5.2) wurde ebenfalls mit beiden Kontrollen durchgeführt. Dies diente zur Kopplungsüberprüfung der internen *E. coli* Kontrolle (*E. coli*-Proteine an Beadpopulation # 65 gekoppelt, siehe auch Abb. 3.10). Die Ergebnisse wurden in Tabelle 3.8 zusammengefasst, pro Messung wurden mind. 100 Beads am MAGPIX™-System gemessen und daraus die MFI berechnet.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der MFI der internen Kontrollen des CBA

Protein	Beadpopulation	Strep-Tactin-R-PE	Anti- <i>E. coli</i>
	[Nummer]	[MFI] n=1	[MFI] n=1
Kontrolle: BSA	42	1	44
Kontrolle: <i>E. coli</i>	65	4	44624

Starke Reaktionen der Kontrollen bei der Serentestung deuten auf einen erhöhten Hintergrund der Probe hin und könnten die Sensitivität des CBA beeinflussen.

3.5.3.2 Präadsorption der Seren zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse

Um falsch positive Signale auf möglicherweise im Serum enthaltene *E. coli*-Antikörper von vorn herein auszuschließen, wurde eine vorangestellte Inkubation (Präadsorption) der Patientenprobe mit *E. coli* Lysat durchgeführt (siehe Kap.2.2.5.2.3).

Zur Ermittlung der optimalen *E. coli* Lysat-Verdünnung zur Präadsorption aller im Multiplex-CBA gemessenen Seren, wurde ein Negativserum eines gesunden Menschen mit intrinsisch hohem *E. coli* Antikörpertiter in den Verdünnungen 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128 je einmal ohne Präadsorption und mit Präadsorption (mit den Lysatverdünnung 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 und 1:320) auf Fluoreszenzsignale beider Kontroll-Beads (*E.coli* und BSA) überprüft. Nach Inkubation der Ansätze mit der jeweiligen Verdünnung des Serums folgte eine zweite Inkubation mit Anti-Human-IgG-(R)-PE (siehe 2.1.10), wie in Kap. 2.2.5.2.4 beschrieben. Pro Messung wurden mind. 100 Beads am MAGPIX™-System gemessen und daraus die MFI berechnet. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10 zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Fluoreszenzsignal (MFI) des Präadsorptions-Tests für *E. coli*-Kontrolle

	ohne Präadsorption		mit Präadsorption				
		(1:10)	(1:20)	(1:40)	(1:80)	(1:160)	(1:320)
Neg. S. (1:16)	12226	633	1093	1172	891	1026	1387
Neg. S. (1:32)	6378	325	437	451	802	691	717
Neg. S. (1:64)	3101	222	234	286	317	363	460
Neg.S. (1:128)	2230	110	143	158	271	239	273

Tabelle 3.10: Fluoreszenzsignal (MFI) des Präadsorptions-Tests für BSA- Kontrolle

	ohne Präadsorption		mit Präadsorption				
		(1:10)	(1:20)	(1:40)	(1:80)	(1:160)	(1:320)
Neg. S. (1:16)	965	369	650	604	495	620	649
Neg. S. (1:32)	585	212	247	258	469	439	341
Neg. S. (1:64)	509	121	126	144	166	182	228
Neg.S. (1:128)	238	57	82	82	130	117	150

In Abb. 3.11 ist das Beispiel für die Serenverdünnung von 1:128 mit und ohne Präadsorption gezeigt. Im Anhang in Abb. 6.3 wurden die Graphen aller Präadsorptions-Tests (Serenverdünnung 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128) angefügt.

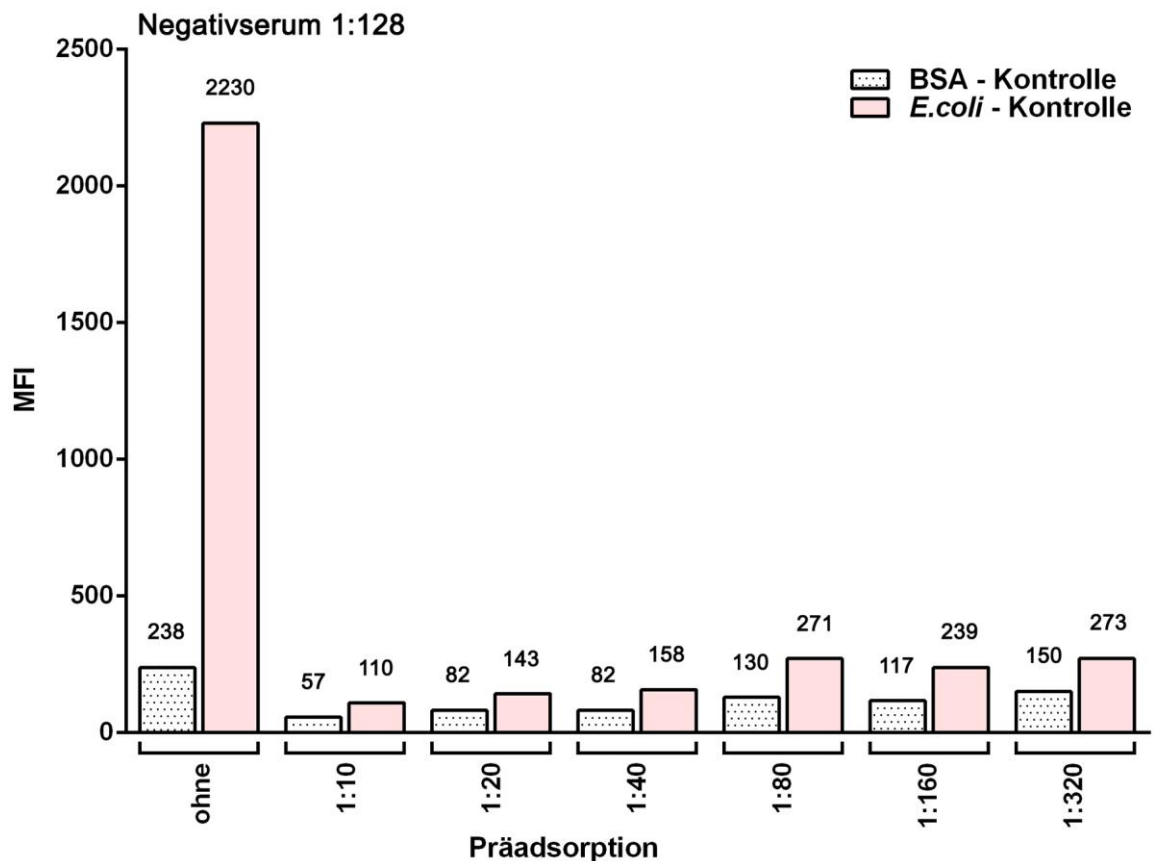


Abb. 3.11: Graphische Darstellung des Präadsorptions-Tests ohne und mit Präadsorption. Beispiel für das Negativserum mit der Verdünnung von 1:128 mit und ohne Präadsorption mit *E. coli* Lysat verschiedener Verdünnungsstufen (Software: GraphPad Prism 6).

Alle Versuche mit den Serenverdünnung 1:16, 1:32, 1:64 oder 1:128 zeigten ein starkes Fluoreszenzsignal der *E. coli*-Kontrolle und ein schwaches Hintergrundsignal der BSA-Kontrolle auf das Serum ohne Präadsorption.

Bei den Seren mit vorangestellter Inkubation mit *E. coli* Lysat zeigte sich eine deutliche Reduktion des Fluoreszenzsignals der *E. coli*-Kontrolle, die Fluoreszenzsignale der BSA-Kontrolle blieben im Vergleich durchgehend niedrig.

Als optimale *E. coli* Lysat-Verdünnung wurde eine Verdünnung zwischen 1:40 und 1:80 auf Grund der Reduktion des Fluoreszenzsignals der *E. coli*-Kontrolle auf ein zu vernachlässigendes Maß angesehen. Für den Multiplex-CBA-Test wurden alle Patientenproben daher zuerst einer vorangestellten Inkubation mit einem 1:60 verdünnten *E. coli* Lysat (1h, 37°C) unterzogen.

3.5.4 Sensitivität der gekoppelten Beadpopulationen und optimale Serenverdünnung für Multiplex-Ansätze

Zur Ermittlung einer für den Multiplex-CBA optimalen Serenverdünnung zur Messung von Patientenproben wurde für jede gekoppelte Beadpopulation eine Sensitivitätsmessung (Kap. 2.2.5.2.3) mit dem zugehörigen Positivserum (siehe Tabelle 2.14) durchgeführt.

Pro Messung wurden mind. 100 Beads am MAGPIX™-System gemessen und daraus die MFI berechnet. Die Daten und eine Einzeldarstellung aller gemessenen Positivseren wurden im Anhang (Tabelle 6.1 und Abb. 6.4) angefügt. Abb. 3.12 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse der Sensitivitätstests aller Positivseren.

Es zeigten sich dabei zwei Typen von Kurven: Die Messreihen mit hoher Sensitivität zeigten einen sigmoiden Kurvenverlauf, die Messreihen mit geringerer Sensitivität einen linearen Kurvenverlauf. Was auf unterschiedlich sensitiv bindende Proteinbeads und unterschiedlich hohe virale Antikörpertiter der Positivseren hindeutet.

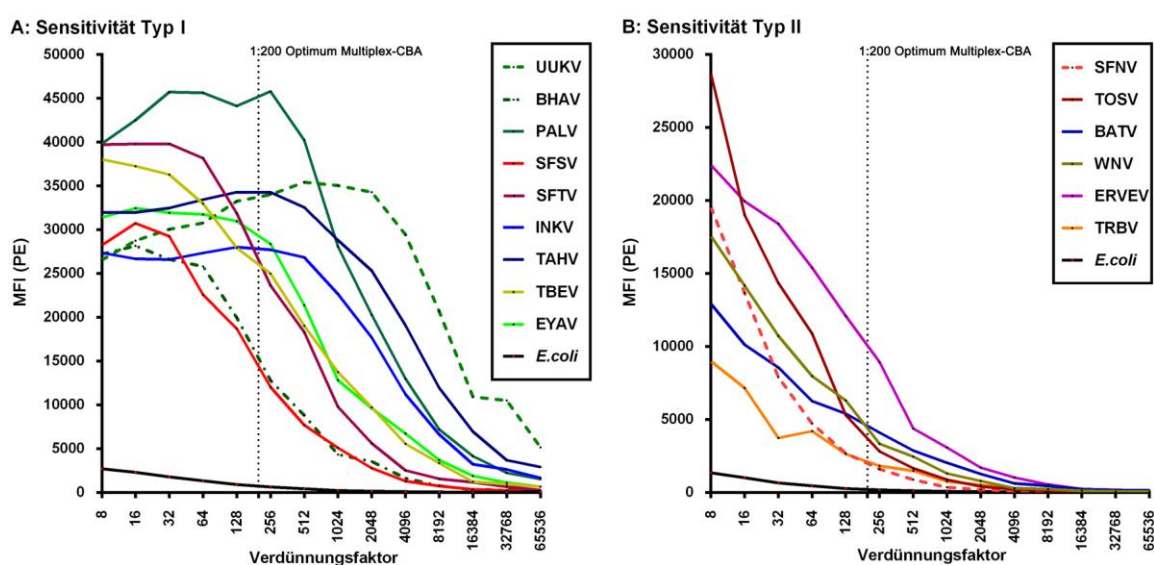


Abb. 3.12: Graphische Darstellung der Sensitivitätstests aller Positivseren als Zusammenfassung.

Jedes Positivserum wurde in 14 Verdünnungsstufen beginnend mit 1:8 in zweier Schritten bis 1:65536 verdünnt und mit den zugehörigen gekoppelten Proteinbeads auf MFI überprüft. Zusätzlich wurde die CBA interne *E. coli*-Kontrolle mitgeführt. Die Zusammenfassung zeigt jeweils die Mittelwerte je Messpunkt aus drei voneinander unabhängigen Sensitivitätsmessungen. Fehlerbalken sind in den Einzeldarstellungen im Anhang dargestellt und wurden hier aus Gründen der Übersicht weggelassen. **A:** Zeigt die Zusammenfassung aller Seren mit sigmoidem Kurvenverlauf. **B:** Zeigt die Zusammenfassung aller Seren mit linearem Kurvenverlauf. Die gepunktete Linie deutet die optimale Serenverdünnung für einen Multiplex-CBA mit allen gekoppelten Proteinbeads an (Software: GraphPad Prism 6).

Für den Multiplex-CBA wurde eine Serenverdünnung benötigt, in der möglichst viele Messreihen der Sensitivitätstests innerhalb ihres dynamischen Bereichs (linearer Kurvenverlauf) lagen und entsprechend wenig störende Wechselwirkungen der vorliegenden Antikörper miteinander vorlagen. Für die Typ I Proteinbeads zeigte sich eine hohe Sensitivität, der dynamische Bereich lag zwischen den Verdünnungen 1:128 und 1:2048. Für die Typ II Proteinbeads zeigte sich eine geringere Sensitivität, der dynamische Bereich lag zwischen den Verdünnungen 1:16 und 1:256. Somit ergab sich eine optimale Serenverdünnung für einen alle Proteinbeads enthaltenden Multiplex-CBA von 1:200.

Ein Vergleich der Nachweisgrenzen der Positivseren, die mittels CBA und IFT ermittelt wurden (siehe Tabelle 3.11) zeigte, dass der entwickelte CBA mindestens die doppelte Sensitivität im Vergleich zum IFT aufweist, teilweise sogar 100-fach sensitiver ist (siehe Tabelle 3.11 TAHV).

Tabelle 3.11: Vergleich der Nachweisgrenze von IFT und CBA

Positivserum	Virus	IFT - Nachweisgrenze	CBA - Nachweisgrenze
Anti-Calovo	Batai Virus	1:1280	1:2048
Anti-Bhanja	Bhanja Virus	1:320	1:8192
Anti-Erve	Erve Virus	1:2560	1:4096
Anti-Eyach	Eyach Virus	1:160	1:8192
Anti-Palma M4756	Palma Virus	1:1280	1:8192
Nap1	SFN Virus	1:80	1:128
S18	SFS Virus	1:80	1:1024
SC1	SFT Virus	1:1280	1:2048
Anti-Tahyna 181	Inkoo Virus	1:320	1:8192
Anti-Tahyna 181	Tahyna Virus	1:640	1:65536
RSSE-AK IgG	TBE Virus	1:1280	1:65536
T6	Toscana Virus	1:80	1:128
Anti-Tribec	Tribec Virus	1:1280	1:2048
Anti Uuk	Uukuniemi Virus	1:2560	1:32768
West Nil MIAF	West Nil Virus	1:1280	1:2048

3.5.5 Ermittlung der Kreuzreaktivität nah verwandter Arboviren

Zu Ermittlung der Kreuzreaktivität der gekoppelten Proteinbeads auf andere virale Antikörper, wurden wie in Kap. 2.2.5.2.4 beschrieben alle Proteinbeads als Multiplex-Test vereint und je Ansatz mit einem der bereits mehrfach untersuchten Positivseren (siehe Tabelle 2.14) in einer Verdünnung von 1:200 (die ermittelte optimale Serenverdünnung für Multiplex-CBA siehe Kap. 3.5.4) gemessen. Pro Messung wurden mind. 100 Beads am MAGPIX™-System gemessen und daraus die MFI berechnet.

In Abb. 3.13 wurden als Beispiel zwei Kreuzreaktivitätstests graphisch dargestellt. Einmal ein Positivserum ohne Kreuzreaktion (A) und einmal ein Positivserum mit erwarteten Kreuzreaktionen von TAHV und INKV (B). Die gemessenen Daten (MFI) und alle weiteren graphisch dargestellten Ergebnisse der Kreuzreaktivitätstests aller getesteten Positivseren wurden im Anhang (Kap.6.4, Tabelle 6.2 und Abb. 6.5 - Abb. 6.8) angefügt.

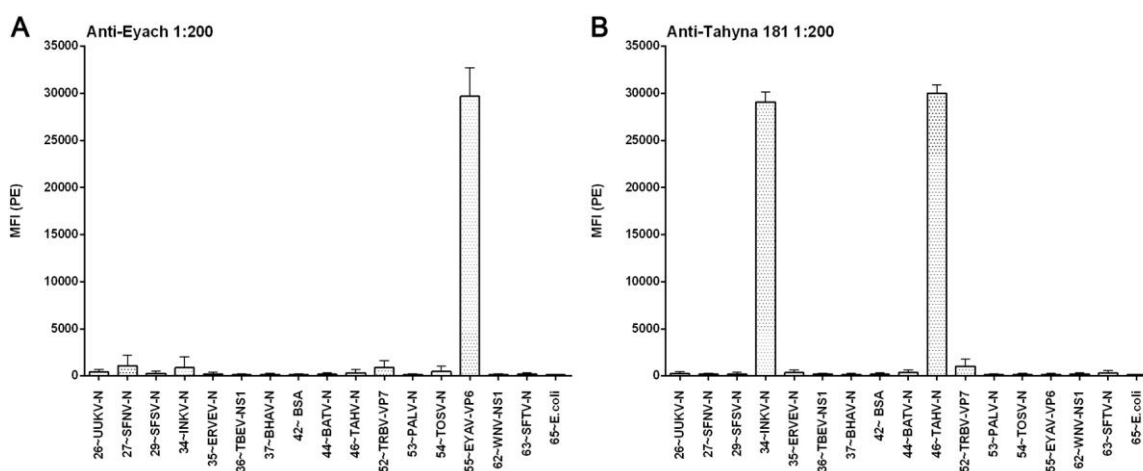


Abb. 3.13: Kreuzreaktivitätstests Multiplex-CBA für EYAV-Positivserum sowie TAHV- und INKV-Positivserum. Dargestellt sind die MFI jeder gekoppelten Beadpopulation gemessen als Multiplex-CBA. **A:** Positivserum EYAV (Anti-Eyach) 1:200, n=3. **B:** Positivserum TAHV und INKV (Anti-Tahyna 181) 1:200, n=3 (Software: GraphPad Prism 6).

Die gekoppelten Proteinbeads EYAV-VP6 (Abb. 3.13 A) und UUKV-N, TRBV-VP7, BATV-N, ERVEV-N (siehe Anhang Abb. 6.8 A-D) zeigten, wie erwartet, keine oder nicht signifikant erhöhte Kreuzreaktionen zu anderen mit arboviralen Proteinen gekoppelten Proteinbeads. Die Kontrolle mit einem Negativserum zeigte keine falsch positiven Reaktionen im Multiplex-CBA.

Weitere Kreuzreaktionen zeigten sich, wie erwartet, zwischen den nah verwandten Viren:

3.5.6 Grenzwertberechnung Multiplex-CBA

Wie schon in Kap. 2.2.5.2.6 beschrieben wurde der Grenzwert an Hand der Ergebnisse des Multiplex-CBA von 45 gut charakterisierten humanen Negativseren (1:200 verdünnt) auf zwei Methoden berechnet:

Grenzwert (A) = MW (MFI) + 6 x SD und Grenzwert (B) = MW (MFI) + SD x f nach (Frey et al., 1998), jeweils pro Beadpopulation einmal für IgG-Antikörper und einmal für IgM-Antikörper.

Pro Messung wurden mind. 30 Beads am MAGPIX™-System gemessen und daraus die MFI berechnet. Die Daten, sowie die Grenzwert-Berechnungen wurden in Tabellenform dem Anhang hinzugefügt (siehe Kapitel 6.5, Tabelle 6.3, Tabelle 6.4, Tabelle 6.5 und Tabelle 6.6), die Ergebnisse wurden in Tabelle 3.13 und Tabelle 3.14 zusammengefasst:

Tabelle 3.13: Zusammenfassung der Grenzwert-Berechnungen für IgG-Antikörper, n=45

Beadpopulation	(A) IgG: MW (MFI) + 6 x SD	(B) IgG: MW (MFI) + SD x f
BP26 - UUKV	953	887
BP27 - SFNV	1199	1115
BP29 - SFSV	1403	1313
BP 34 - INKV	2751	2577
BP35 - ERVEV	1566	1465
BP36 - TBEV	1805	1686
BP37 - BHAV	2401	2233
BP42 - BSA	1649	1539
BP44 - BATV	2048	1912
BP46 - TAHV	1684	1574
BP52 - TRBV	2292	2148
BP53 - PALV	2694	2505
BP54 - TOSV	1923	1787
BP55 - EYAV	1630	1531
BP62 - WNV	1428	1337
BP63 - SFTV	1078	1010
BP65 - <i>E. coli</i>	1965	1837

Tabelle 3.14: Zusammenfassung der Grenzwert-Berechnungen für IgM-Antikörper, n=45

Beadpopulation	(A) IgM: MW (MFI) + 6 x SD	(B) IgM: MW (MFI)+ SD x <i>f</i>
BP26 - UUKV	1529	1438
BP27 - SFNV	3282	3075
BP29 - SFSV	2620	2463
BP 34 - INKV	2621	2463
BP35 - ERVEV	1290	1215
BP36 - TBEV	950	895
BP37 - BHAV	2925	2747
BP42 - BSA	1010	944
BP44 - BATV	1232	1159
BP46 - TAHV	3284	3084
BP52 - TRBV	2600	2452
BP53 - PALV	2962	2781
BP54 - TOSV	3589	3370
BP55 - EYAV	2231	2096
BP62 - WNV	960	904
BP63 - SFTV	3539	3326
BP65 - <i>E. coli</i>	572	539

3.5.7 IgM- und IgG- Antikörpernachweis gegen europäische humanpathogene Arboviren (Multiplex-CBA)

Der Multiplex-CBA wurde wie in Kap. 2.2.5.2.5 beschrieben durchgeführt. Alle Proben der Studie (111 Patienten, teils mehrere Proben verschiedener Zeitpunkte vorhanden) wurden sowohl auf anti-arbovirale IgG-Antikörper, wie auch anti-arbovirale IgM-Antikörper im Multiplex-CBA getestet. Bei unauffälligem Befund wurden die Proben einmalig, bei auffälligem Befund doppelt (n=2), teilweise in Triplika-Messung (n=3) in einer 1:200 Verdünnung getestet. Pro Messung wurden mind. 30 Beads am MAGPIX™-System gemessen und daraus die MFI berechnet. Die Daten wurden in Tabellenform dem Anhang (siehe Kap.6.6) hinzugefügt, Werte oberhalb des Grenzwertes wurden farblich hervorgehoben (siehe Tabelle 6.7 - Tabelle 6.12). Grenzwert (A) und (B) lieferten nahezu die gleiche Anzahl positiver Seren.

3.5.7.1 Auswertung Multiplex-CBA

Wie schon in Kap. 2.2.5.2.6 beschrieben, wurden alle getesteten Seren den Fällen 1 - 4 zugeordnet. Alle Seren unterhalb des berechneten beadspezifischen Grenzwertes (siehe Kap. 3.5.6) wurden zunächst Fall 1 (unauffälliges Serum ohne arbovirale Infektion) zugeordnet. Standen von einem Patienten mehr als eine Probe (beide Abnahmen innerhalb von zwei Wochen) zur Verfügung, kann von einem bestätigten Ergebnis ausgegangen werden. Dies war bei sechs Patienten der Fall (siehe Tabelle 6.9 und Tabelle 6.10 im Anhang bzw. Kap. 3.5.7.3). Die Multiplex-CBA-Ergebnisse aller anderen Patienten lieferten durch die einmalige Abgabe eines Serums lediglich einen ungesicherten Hinweis auf eine vorliegende Infektion (siehe Tabelle 6.7 und Tabelle 6.8). Auf die Problematik des falschen Zeitpunktes der Probenabnahme bei einmaliger Abgabe eines Serums und dem daraus möglicherweise resultierendem, unter dem Grenzwert liegenden Ergebnis wird in der Diskussion (siehe Kap. 4) weiter eingegangen. Bei vier Patienten wird eine akute Infektion (Fall 4 siehe Abb. 6.12) vermutet, obwohl die gemessene MFI gegen IgM-Antikörper knapp unterhalb des Grenzwertes lag, der IgG-Antikörper Grenzwert jedoch überschritten wurde.

3.5.7.1.1 Fall 1: Keine arbovirale Infektion: IgM und IgG negativ.

Die Seren von 61 der 111 Patienten zeigten keine Auffälligkeiten bei der Überprüfung auf anti-arbovirale IgM- und IgG-Antikörper im Multiplex-CBA. Alle Werte lagen unterhalb des berechneten beadspezifischen Grenzwertes. Der Auslöser der Krankheitssymptome dieser Patienten bleibt weiterhin unklar, lediglich die 15 in dieser Arbeit untersuchten Arboviren konnten ausgeschlossen werden.

3.5.7.1.2 Fall 2: Verdacht auf arbovirale Infektion, die Wochen oder Monate zurückliegt: IgM negativ, IgG positiv

Die Seren von 11 der 111 Patienten zeigten Auffälligkeiten bei der Überprüfung auf anti-arbovirale IgG-Antikörper im Multiplex-CBA, blieben jedoch IgM negativ (unterhalb des berechneten beadspezifischen Grenzwertes). Eine zweite Probe mit gleichem Ergebnis würde eine akute Infektion ausschließen. Lediglich bei einem Patienten lag eine zweite Probe vor. Die Ergebnisse der ersten Messung (n=1) wurden in Tabellenform dem Anhang hinzugefügt (siehe Tabelle 6.7 und Tabelle 6.8). Zur Bestätigung wurden alle auffälligen Seren erneut gemessen (siehe Kap. 3.5.7.2).

3.5.7.1.3 Fall 3: Verdacht auf akute arbovirale Infektion: IgM positiv, IgG negativ

Die Seren von 21 der 111 Patienten zeigten Auffälligkeiten bei der Überprüfung auf anti-arbovirale IgM-Antikörper im Multiplex-CBA, blieben jedoch IgG negativ (unterhalb des berechneten beadspezifischen Grenzwertes). Eine zweite Probe (Abnahme innerhalb von zwei Wochen) müsste eine Serokonversion zeigen und IgG positiv ausfallen.

Bei keinem dieser 21 Patienten lag eine zweite Probe vor. Die Ergebnisse der ersten Messung (n=1) wurden in Tabellenform dem Anhang hinzugefügt (siehe Tabelle 6.7 und Tabelle 6.8). Zur Bestätigung wurden alle auffälligen Seren erneut gemessen (siehe Kap. 3.5.7.2).

3.5.7.1.4 Fall 4: Verdacht auf akute arbovirale Infektion: IgM positiv, IgG positiv

Die Seren von 10 der 111 Patienten zeigten Auffälligkeiten bei der Überprüfung auf anti-arbovirale IgM- und IgG-Antikörper im Multiplex-CBA. Eine zweite Probe mit IgG positivem Ergebnis würde die Diagnose sichern. Dies ist bei zwei Patienten der Fall, es handelt sich demnach um eine akute Infektion in der späten Phase, in der bereits weitgehend ein Antikörpertiter gegen das entsprechende Virus ausgebildet wurde.

Die Ergebnisse der ersten Messung (n=1) wurden in Tabellenform dem Anhang hinzugefügt (siehe Tabelle 6.7 und Tabelle 6.8). Zur Bestätigung wurden alle auffälligen Seren erneut gemessen (siehe Kap. 3.5.7.2).

3.5.7.2 Bestätigung der Multiplex-CBA Ergebnisse durch Mehrfachmessung auffälliger Seren

Fall 2: IgM negativ, IgG positiv (11 Patienten)

Die Ergebnisse der 11 Patientenproben unter Betrachtung beider berechneter Grenzwerte (A) und (B) wurden in Tabelle 3.15 und Tabelle 3.16 zusammengefasst. Eine graphische Darstellung wurde dem Anhang Abb. 6.9 hinzugefügt. Jedes Serum wurde doppelt auf IgM-Antikörper (n=2) und dreifach auf IgG-Antikörper (n=3) getestet. 9 Seren zeigten einen positiven Wert jeweils auf ein Virus oder ein kreuzreagierendes Virenpaar (Kreuzreaktivitätstest auf IgG-Antikörper: BHAV/PALV, INKV/TAHV, SFNV/TOSV, SFSV/ SFTV siehe Kap. 2.2.5.2.4, Tabelle 3.12).

Tabelle 3.15: Ergebnisse Einzelinfektion, Multiplex-CBA, n=3, Fall 2 (IgM: -, IgG: +)

Vektor	Virus	Grenzwert (A) und (B)
Zecke	BHAV / PALV	0
	ERVEV	0
	EYAV	3 (bestätigt)
	UUKV	0
	TBEV	0
	TRBV	1 (unbestätigt)

Stechmücke	BATV	0
	INKV / TAHV	0
	INKV (ohne TAHV)	1 (bestätigt)
	TAHV (ohne INKV)	2 (bestätigt)
	WNV	0

Sandmücke	SFNV / TOSV	1 (bestätigt)
	SFSV / SFTV	0
	SFNV/TOSV + SFSV/SFTV	1 (bestätigt)

Tabelle 3.16: Ergebnisse Mehrfachinfektion, Multiplex-CBA, n=3, Fall 2 (IgM: -, IgG: +)

Serumnummer	Grenzwert (A)	Grenzwert (B)
653731	INKV/TAHV +	INKV/TAHV +
	TOSV(ohne SFNV) +	TOSV (ohne SFNV) +
	EYAV (+)	EYAV +

584297	SFNV/TOSV +	SFNV/TOSV +
	EYAV (+)	EYAV (+)
	INKV (ohne TAHV)	INKV (ohne TAHV)

(+) unbestätigt, nur eine von 3 Messungen positiv, aber IFT positiv

Das Serum mit der Nummer 653731 (Tabelle 3.16) zeigte positive Werte für EYAV, INKV/TAHV und TOSV (ohne SFNV), eine Mehrfachinfektion verschiedener Viren über die Zeit ist nicht auszuschließen, eine zweite Probe (Abnahme nach zwei Wochen) stand nicht zur Verfügung. Erneute Multiplex-CBA Messungen (IgG: n=3) bestätigten einen deutlich erhöhten IgG-Antikörpertiter gegen INKV/TAHV, der Wert für TOSV war in allen drei Messungen erhöht, zeigte aber nicht die zu erwartende Kreuzreaktion mit SFNV. EYAV konnte nicht in allen drei Messungen bestätigt werden und lag teilweise knapp unterhalb des Grenzwertes.

Bei dem Patienten mit der Serumnummer 584297 (positiv auf SFNV/TOSV, INKV (ohne TAHV), EYAV) lag eine zweite Probe (Abnahme nach zwei Wochen) mit Nr. 585668 vor (siehe Tabelle 6.9). Dieses Serum zeigte IgG positive Ergebnisse gegen SFNV/TOSV und INKV (ohne die zu erwartende Kreuzreaktion mit TAHV). Die zweite Probe blieb EYAV negativ.

Fall 3: IgM positiv, IgG negativ (21 Patienten)

Die Ergebnisse der 21 Patientenproben unter Betrachtung beider berechneter Grenzwerte (A) und (B) wurden in Tabelle 3.17 und Tabelle 3.18 zusammengefasst. 10 Seren zeigten einen positiven Wert jeweils auf ein Virus bzw. kreuzreagierendes Virenpaar, bei zwei Seren wurde das Ergebnis durch eine zweite Messung nicht bestätigt (Serumnr. 587182 EYAV und 634605 WNV). Bei vier Seren konnte eine deutlich erhöhte MFI für ein Virus gemessen werden, eine akute Mehrfachinfektion wurde ausgeschlossen (Serumnr. 584537, 630539, 640296, 654198). Eine graphische Darstellung wurde dem Anhang (Abb. 6.10 und Abb. 6.11) hinzugefügt. Die Seren wurden doppelt auf IgM-Antikörper (n=2) getestet, bei zwei Seren erfolgte wegen zu geringem Probevolumen nur eine Messung.

Die Seren mit den Nummern 653039 und 1163451 zeigten in der ersten Messung keine eindeutigen Ergebnisse, eine zweite Messung fiel IgM negativ aus. Da zu beiden Seren keine zweite Probe zur Messung zur Verfügung stand, wurde zuerst von einem falsch positiven Signal in der ersten Messung ausgegangen, eine spätere IFT-Überprüfung des Serums 1163451 bestätigt den Hinweis der ersten CBA-Messung auf eine vorliegende akute EYAV-Infektion (siehe Tabelle 3.20).

Die Seren mit den Nummern 532655, 567544 und 587131 zeigten keine eindeutigen Ergebnisse und eine Reaktion auf die *E. coli*-Kontrolle. Ein erhöhter Anti-*E.coli*-Antikörpertiter (auch nach Präadsorption noch erhöht) führt zu falsch positiven Ergebnissen, eine eindeutige Auswertung der drei Seren ist nicht möglich. Eine zweite Probe stand zur Messung nicht zur Verfügung.

Das Serum mit der Nummer 1155523 zeigte keine eindeutigen Ergebnisse, die MFI für verschiedene Viren war erhöht, eine zweite Probe stand nicht zur Verfügung. Eine eindeutige Auswertung ist nicht möglich.

Tabelle 3.17: Ergebnisse Einzelinfektion, Multiplex-CBA, n=3, Fall 3 (IgM: +, IgG: -)

Vektor	Virus	Grenzwert (A) und (B)
Zecke	BHAV (ohne PALV)	1 (bestätigt)
	ERVEV	0
	EYAV	1 (bestätigt) + 1 (unbestätigt)
	UUKV	0
	TBEV	0
	TRBV	3 (bestätigt)

Stechmücke	BATV	0
	INKV / TAHV	2 (bestätigt)
	WNV	1 (unbestätigt)

Sandmücke	SFNV / TOSV	1 (bestätigt)
	SFNV (ohne TOSV)	1 (bestätigt)
	SFSV / SFTV	1 (bestätigt)
	SFTV (ohne SFSV)	3 (bestätigt)

Das Serum mit der Nummer 618439 zeigte deutlich erhöhte MFI für zwei verschiedene Viren, eine akute Mehrfachinfektion mit INKV/TAHV und TRBV kann nicht ausgeschlossen werden. Eine zweite Probe stand zur Messung nicht zur Verfügung.

Tabelle 3.18: Ergebnisse Mehrfachinfektion, Multiplex-CBA, n=3, Fall 3 (IgM: +, IgG: -)

Serumnummer	Grenzwert (A)	Grenzwert (B)
618439	INKV/TAHV + TRBV	INKV/TAHV + TRBV

Fall 4: IgM positiv, IgG positiv (10 Patienten)

Da in diesem Fall sowohl anti-arbovirale IgM-, wie auch IgG-Antikörper nachgewiesen wurden handelt es sich um Patienten mit einer arboviralen Infektion in der späten akuten Phase, in der bereits ein IgG-Antikörpertiter ausgebildet wurde. Die Ergebnisse der 10 Patientenproben wurden in Tabelle 3.19 zusammengefasst. Eine graphische Darstellung wurde dem Anhang (Abb. 6.12) hinzugefügt.

Bei 4 von 10 Patientenproben lagen die MFI Werte nur knapp unterhalb des Grenzwertes für IgM-Antikörper, bedingt durch das Fehlen einer zweiten Probe nach zwei Wochen, aber dem passenden Muster (gleiche auffällige Beadpopulation IgG und IgM) wurden diese Seren Fall 4 und nicht Fall 2 (beschreiben beide akute Infektionen) zugeordnet.

Tabelle 3.19: Ergebnisse Einzelinfektion, Multiplex-CBA, Fall 4 (IgM: + , IgG: +)

Vektor	Virus	Grenzwert (A) und (B)
Zecke	BHAV / PALV	1 (bestätigt)
	ERVEV	1 (bestätigt)
	EYAV	1 (bestätigt)
	UUKV	0
	TBEV	1 (bestätigt)
	TRBV	0

Stechmücke	BATV	0
	INKV / TAHV	1 (bestätigt)
	WNV	0

Sandmücke	SFNV / TOSV	0
	TOSV (ohne SFNV)	2 (bestätigt)
	SFSV / SFTV	1 (bestätigt)
	SFTV (ohne SFSV)	2 (bestätigt)

Das Serum mit der Nummer 555627 zeigte neben der akuten ERVEV-Infektion zusätzlich einen Hinweis auf eine bereits zurückliegende EYAV-Infektion.

Das Serum mit der Nummer 635188 zeigte neben der akuten TOSV-Infektion zusätzlich einen Hinweis auf eine bereits zurückliegende TRBV- und EYAV-Infektion.

3.5.7.3 Bestätigung der Multiplex-CBA Ergebnisse durch Doppelproben

Bei sechs Patienten erfolgte eine weitere Probenabnahme innerhalb von zwei Wochen. Durch die erste Probe ergab sich der Verdacht auf zwei akute arbovirale Infektionen, eine zurückliegende arbovirale Infektion und drei Patienten waren Multiplex-CBA unauffällig. Bei allen sechs Patienten wurde durch die zweite Probe der Verdacht bestätigt. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 6.9 und Tabelle 6.10 dem Anhang hinzugefügt. Eine graphische Darstellung aller Patientenserum (Fall 2 in Abb. 6.9 und Fall 4 in Abb. 6.12) wurde dem Anhang hinzugefügt. Die Patienten mit zwei zur CBA-Messung zur Verfügung stehenden Proben wurden mit * (1. Probe) und * (2. Probe) gekennzeichnet.

In Abb. 3.14 und Abb. 3.15 wurden als Beispiel eine akute arbovirale SFNV/SFTV-Infektion und eine zurückliegende SFNV/TOSV-Infektion dargestellt. Jeweils mehrfach getestet auf IgM- und IgG- Antikörper.

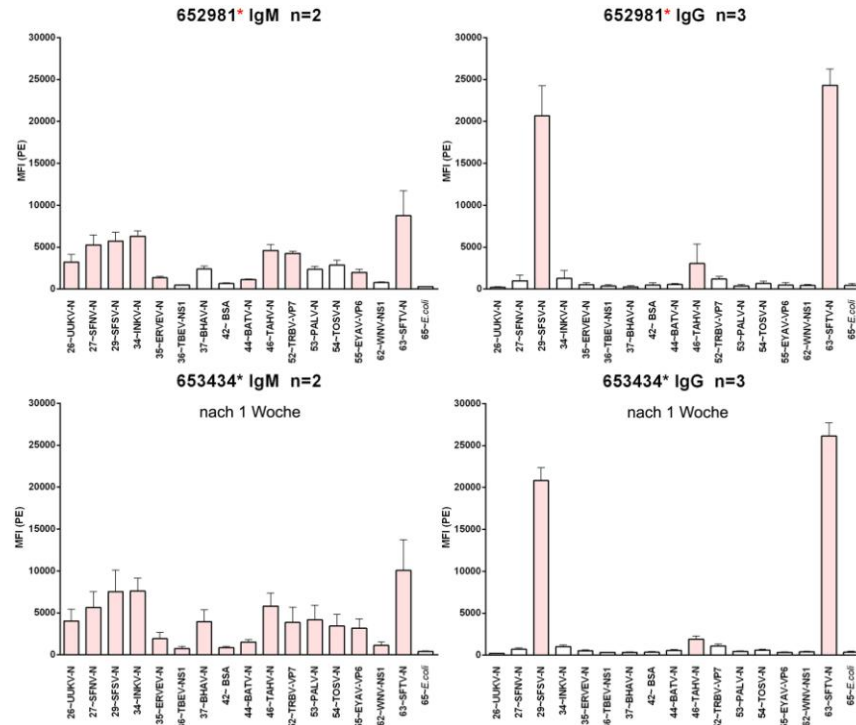


Abb. 3.14: Gesicherte akute SFSV/SFTV-Infektion (Multiplex-CBA). Dargestellt sind die MFI jeder gekoppelten Beadpopulation. Links die IgM-, rechts die IgG-Ergebnisse, oben die erste Patientenprobe, unten die zweite Patientenprobe (Software: GraphPad Prism 6).

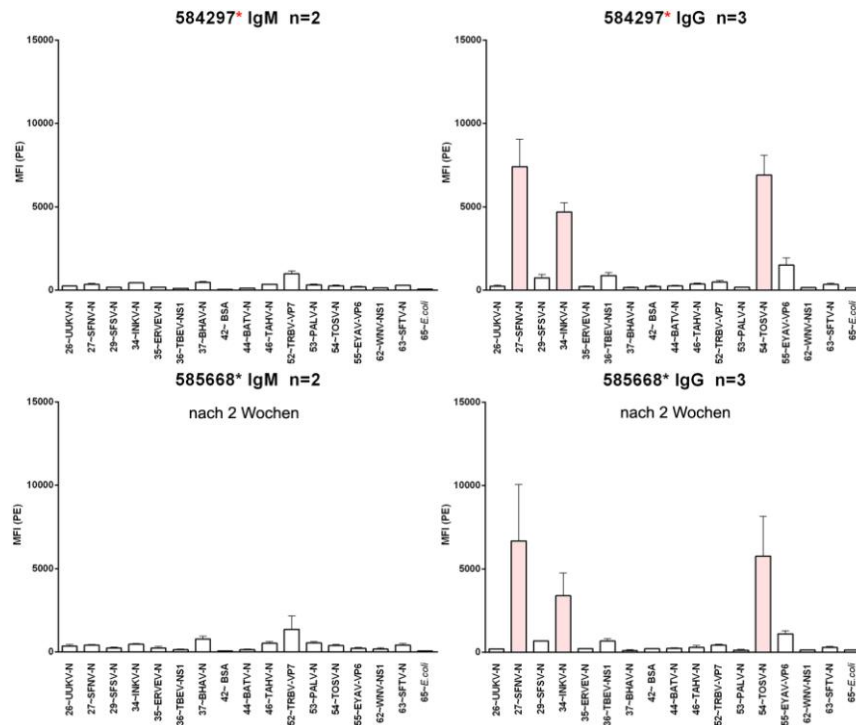


Abb. 3.15: Gesicherte zurückliegende SFNV/TOSV-Infektion, Verdacht auf Mehrfachinfektion mit INKV + evtl. EYAV (Multiplex-CBA). Dargestellt sind die MFI jeder gekoppelten Beadpopulation. Links die IgM-, rechts die IgG- Ergebnisse, oben die erste Patientenprobe, unten die zweite Patientenprobe (Software: GraphPadPrism6).

3.5.7.4 Zusammenfassung Multiplex-CBA und IFT-Bestätigung

Alle Seren der 111 Patienten wurden im Multiplex-CBA getestet und den Fällen 1 - 4 zugeordnet. Eine graphische Darstellung jedes Serums Fall 2 – 4 (zurückliegende und akute Infektionen) getestet gegen anti-arbovirale IgM-Antikörper und IgG-Antikörper wurde dem Anhang (siehe Kap. 6.6.6 - 6.6.8) hinzugefügt. Alle durch Mehrfachmessung bestätigten Ergebnisse wurden in Tabelle 3.21 und Tabelle 3.22 zusammengefasst. Zusätzlich wurden alle IgG auffälligen Seren mit dem in Kap. 2.2.5.1 bereits beschriebenen IFT getestet. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 3.20 dargestellt.

Tabelle 3.20: Ergebnisse Multiplex-CBA und IFT (IgG auffälliger Seren)

Serumnr.	Fall	Multiplex-CBA (1:200)	IFT (1:100)
482163	2	SFNV / TOSV +	SFNV +, TOSV +
554005	2	TRBV (+)	TRBV -
562900	2	INKV +, TAHV -	TAHV +
583091	2	EYAV +	EYAV +
584297*	2	SFNV/TOSV +, SFSV/SFTV -, EYAV (+), INKV +	SFNV +, TOSV +, SFSV +, SFTV +, EYAV +, TAHV -
585668*	2	SFNV/TOSV +, INKV +, EYAV -	SFNV +, TOSV +, EYAV +
600518	2	EYAV +	EYAV +
605741	2	TAHV +	TAHV -
644558	2	TAHV +	TAHV +
651426	2	EYAV +, BHAV/PALV -	EYAV +, BHAV -, PALV -
653731	2	INKV/TAHV +, TOSV +, EYAV(+)	TAHV +, TOSV +, EYAV +
120116	2	SFNV/TOSV +, SFSV/SFTV +	SFNV +, TOSV +, SFSV +, SFTV +
653039	3	SFTV (+), SFSV -, EYAV -	SFTV -, SFSV -, EYAV -
528149	4	BHAV/PALV +, SFNV +, TOSV -	BHAV +, PALV +, SFNV -, TOSV -
545809	4	SFTV +, SFSV -	SFTV +, SFSV -
555627	4	ERVEV +, EYAV (+)	EYAV (+),
578045*	4	EYAV +, BHAV/PALV -	EYAV (+), BHAV -, PALV -
578586*	4	EYAV +, BHAV/PALV -	EYAV (+), BHAV -, PALV -
598313	4	TOSV +, SFNV -	TOSV +, SFNV +
604152	4	SFTV +, SFS -	SFTV -, SFSV -
608929	4	INKV/TAHV +, PALV (+)	TAHV +, BHAV (+), PALV +
635188	4	TOSV +, SFNV (+), EYAV +, TRBV +, INKV (+)	TOSV (+), SFNV +, EYA +
635306	4	TBEV +, WNV -, INKV (+)	TBEV +, WNV -
652981*	4	SFSV/SFTV +, SFNV (+), TOSV -, TAHV +	SFSV +, SFTV +, SFNV +, TOSV +, TAHV +
653434*	4	SFSV/SFTV +, TAHV +	SFSV +, SFTV +

■ = Übereinstimmung, ■ = Abweichung, □ = nicht mit IFT getestet

Nach der zusätzlichen IFT-Testung des Patientenserums mit der Nummer 1163451 (CBA nicht eindeutig) wird von einer weiteren akuten EYAV-Infektion ausgegangen.

Die IFT-Überprüfung des Serums mit der Nummer 653039, das im Multiplex-CBA nicht eindeutig und somit nicht auswertbar war, führte zum Ausschluss einer Infektion mit SFSV, SFTV und EYAV.

Die Seren mit den Nummern 528149 (akut BHAV/PALV), 608929 (akut INKV/TAHV), 635306 (akut TBEV), 652981 (akut SFSV/SFTV) zeigen eine deutlich (signifikant) erhöhte MFI für ein Virus / ein Viruspaar, eine akute Mehrfachinfektion wurde ausgeschlossen.

Tabelle 3.21: Zusammenfassung bestätigter Einzelinfektionen

Vektor	Virus	akute arbovirale Infektion	zurückliegende arbovirale Infektion
Zecke	BHAV / PALV	2 (1,8%)	0
	ERVEV	1 [*] (0,9%)	0
	EYAV	2+1 [°] (2,7%)	4 [*] (3,6%)
	UUKV	0	0
	TBEV	1 (0,9%)	0
	TRBV	3 (2,7%)	1 [°] (0,9%)

Stechmücke	BATV	0	0
	INKV / TAHV	3 (2,7%)	3 (2,7%)
	WNV	1 [°] (0,9%)	0

Sandmücke	SFNV / TOSV	3 (2,7%)	1 (0,9%)
	SFSV / SFTV	7 (6,3%)	0
	SFNV/TOSV+SFSV/SFTV	0	1 (0,9%)

^{*}Serum 555627 (akut ERVEV, Hinweis auf zurückliegende EYAV-Infektion)

[°]unbestätigt, nur 1 Messungen CBA positiv und nicht IFT bestätigt

Tabelle 3.22: Zusammenfassung bestätigter Mehrfachinfektionen

Serumnr.	Status	Mehrfachinfektion Virus
618439	akute Infektion	INKV/TAHV + TRBV
584297	zurückliegende Infektion	SFNV/TOSV + INKV (ohne TAHV) + EYAV
653731	zurückliegende Infektion	INKV/TAHV + TOSV(ohne SFNV) + EYAV
635188	akute Infektion und zurückliegende Infektion	TOSV (ohne SFNV) und TRBV + EYAV

4 Diskussion

Neben dem TBE-Virus steht eine Reihe von seltenen europäischen Arboviren im Verdacht aseptische Meningitiden oder Enzephalitiden zu verursachen. Sie wären somit bei diesen Erkrankungen für einen Teil der in 50% der Fälle unklar bleibenden Ätiologie verantwortlich. Um hier eine innovative Problemlösung anzubieten wurde in dieser Arbeit das Ziel verfolgt ein serologisches Multiparameterdiagnostiksystem zum Nachweis von IgM-, und IgG-Antikörpern für diese vernachlässigten Viren zu entwickeln. Für den Aufbau eines solchen Diagnosesystems wurde ein Multiplex-CBA („*Cytometric Bead Array*“) auf Basis von antigegekoppelten Mikrokugeln (Beads) etabliert. Dieses Verfahren erlaubt erstmals einen simultanen Antikörpernachweis gegen 15 verschiedene europäische humanpathogene Arboviren. Das Testverfahren kann zum Nachweis von IgM- und IgG-Antikörpern verwendet werden.

Die Routinediagnostik erfolgte bislang üblicherweise durch ELISA- bzw. IFT- Techniken, wie in Kap.1.2.1 beschrieben, die jedoch die meisten dieser europäischen Arboviren gar nicht abbilden. Diese zum Nachweis von anti-viralen Antikörpern (IgM und IgG) verwendeten Methoden benötigen ein relativ großes Serumvolumen. Sowohl ELISA wie auch IFT eignen sich eher für Einzelanalysen, bei denen pro Testansatz in der Regel der Nachweis von Antikörpern gegen einen Erreger untersucht wird. Entsprechend zeitintensiv und aufwendig gestaltet sich die Überprüfung eines Serums auf ein ganzes Spektrum verschiedener Antikörper gegen unterschiedliche Viren (Khan et al., 2005).

Die Entwicklung eines geeigneten Testsystems, das schnell Ergebnisse liefert, einfach handhabbar und verlässlich ist, nur ein geringes Probenvolumen benötigt und den simultanen Nachweis mehrerer anti-arboviraler Antikörper zulässt ist zielführend, schnell durchführbar und kostensparend. Aussagen über Vorkommen und Verbreitung von Arboviren in Europa wären mit einem Multiplex-Test ebenso möglich, wie die Datenerhebung auf den Gebieten der Diagnostik, Epidemiologie und Pathogenese arboviraler Infektionen. Auch ließe sich so künftig eine datenbasierte Risikobewertung bezüglich des Auftretens arboviraler ZNS-Erkrankungen im öffentlichen Gesundheitswesen durchführen.

In dieser Arbeit wurde ein Multiplex-CBA gegen die in Tabelle 1.1 aufgelisteten europäischen Arboviren entwickelt, der Antikörper gegen die viralen Antigene Nukleoprotein N der Bunyaviren, Nichtstrukturprotein NS1 der Flaviviren und das Oberflächenprotein VP6 bzw. VP7 der Reoviren detektieren kann.

Die Bunyaviren (siehe Kap. 1.1.4.2) bestehen aus drei Genomsegmenten (S, M und L), die von einer Hüllmembran mit eingelagerten Glykoproteinen umgeben sind (siehe Abb. 1.5). Die drei einzelsträngigen RNA-Segmente sind mit einer Vielzahl von Nukleokapsidproteinen (N-Proteinen) komplexiert und bilden so die helikalen Ribonukleokapside. Diese Ummantelung der RNA-Segmente schützt die virale RNA vor Degradierung. Das N-Protein ist demnach das am häufigsten vorkommende virale Produkt in den Viruspartikeln der Bunyaviren, bzw. ihrer infizierten Zellen. Ferner wird vermutet, dass das N-Protein mit den L, Gn und Gc Proteinen interagiert und so eine Rolle bei der Replikation einnimmt. Aufgrund der hohen Anzahl der N-Proteine wird davon ausgegangen, dass nach der Infektion Antikörper gegen das N-Protein gebildet werden (Fields, Knipe & Howley, 2007). Grundlegend gilt, dass häufig virale Proteine, die nicht Ziel der neutralisierenden humoralen Immunantwort sind, eine hohe Antigenität aufweisen. Für die serologische Detektion von Antikörpern gegen Bunyaviren kommt das N-Protein als virales Antigen demnach in Frage. Gezeigt wurde dies mitunter für TOSV-N (Schwarz, Gilch & Schatzl, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das N-Protein der Viren ERVEV, BHAV, PALV, UUKV, TAHV, BATV, INKV, SFNV, SFSV, SFTV und TOSV rekombinant hergestellt.

Bisher entwickelte serologische Testverfahren für Flaviviren hingegen basieren größtenteils auf dem Nachweis von Antikörpern gegen das Glykoprotein E der Virushülle. Wie schon in Kap. 1.1.4.3 beschrieben besteht das Genom der Flaviviren aus einem linearen, einzelsträngigen RNA-Segment, das ein Polyprotein kodiert, welches durch wirtseigene Proteasen prozessiert wird. Teile dieses Polyproteins kodieren für die Strukturproteine C (englisch: core), M (englisch: membrane) und E (englisch: envelope), sowie die Nichtstrukturproteine NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5. Durch die antigenen Verwandtschaften der einzelnen Epitope des E-Proteins der Flaviviren konnten hohe Kreuzreaktivitäten bei der Testung verschiedener Seren beobachtet werden (Crill, Trainor

& Chang, 2007; Kimurakuroda & Yasui, 1986; Liu et al., 2008). Um diese Kreuzreaktionen zu vermeiden wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht das NS1-Protein und das C-Protein rekombinant zu exprimieren. In früheren Arbeiten konnten die antigenen Eigenschaften des NS1-Proteins und des C-Proteins bereits gezeigt werden (Alcon et al., 2002; PupoAntunez et al., 1997). Antikörper gegen das NS1-Protein von TBEV sind bereits acht Tage nach Infektion nachweisbar (Matveeva et al., 1995), demnach wird eine frühe Antikörperantwort gegen das NS1-Protein induziert (Bugrysheva et al., 2001).

Die viralen Gensequenzen von TBEV-C, TBEV-NS1, WNV-C und WNV-NS1 konnten mittels PCR amplifiziert und erfolgreich in den Donorvektor pENTRY-IBA51 bzw. den Expressionsvektor pASG-IBA ligiert werden. Die Expression des C-Proteins von TBEV und WNV war nicht erfolgreich, die Expression des NS1-Proteins von TBEV und WNV hingegen gelang. Bei dem NS1-Protein handelt es sich um ein Protein mit bislang unklarer Funktion (Brinton, 2002), das während der akuten Phase aus den infizierten Zellen durch Sekretion ins Serum abgegeben wird (Macdonald et al., 2005). NS1-Proteine konnten im Serum nach drei bis acht Tagen nach Infektion nachgewiesen werden, IgM-Antikörper gegen NS1-Protein bereits fünf Tage nach Infektion. Ferner konnte gezeigt werden, dass das NS1-Protein in mehreren Formen vorliegen kann, membrangebunden wahrscheinlich als Dimer, sezerniert als Hexamer. Es wird vermutet, dass das NS1-Protein des Gelbfiebervirus am Replikationszyklus mitwirkt (Lindenbach & Rice, 1997). Dem NS1-Protein von West Nil Virus konnte eine essentielle Co-Faktor Rolle in der Regulation des Replikationskomplexes und der viralen RNA-Synthese zugeordnet werden (Youn et al., 2013). Nach (Youn et al., 2012) ist das NS1-Protein von WNV nach Bindung mit NS4B-Protein an der frühen viralen RNA-Replikation beteiligt. Weitere Studien lassen vermuten, dass das NS1-Protein am intrazellulären Transport der viralen Strukturproteine und an der Virusfreisetzung beteiligt ist, die Funktionen der Nichtstrukturproteine konnten bislang nicht vollständig aufgeklärt werden (Brinton, 2014). Je Flavivirus wurde eine Beadpopulation (jeweils mit NS1-Protein gekoppelt) im Multiplex-CBA eingesetzt. Alle Daten die das C-Protein betreffen wurden nicht weiter in dieser Arbeit erwähnt.

Bei den Orbiviren und Coltiviren (Familie Reoviridae) (siehe Kap. 1.1.4.1) handelt es sich um nicht-umhüllte Viruspartikel, die aus drei Kapsidschichten aufgebaut sind, dem inneren, mittleren und äußeren Kapsid. Eine cryoelektronische Mikroskopie (CryoEM) des Broadhaven Virus (BRDV), ein wie Tribec-Virus von Zecken übertragenes Orbivirus (Gorman, 1983), gab bereits 1997 Aufschluss über die dreidimensionale Anordnung der Proteine der einzelnen Kapsidschichten (Schoehn et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die äußere Kapsidschicht aus zwei Proteinen (VP2 und VP5) und die mittlere Kapsidschicht aus VP7-Proteinen aufgebaut ist. Hierbei sind die Proteine des äußeren Kapsids so angeordnet, dass sie als Hülle um die VP7-Proteine kreisförmig herum liegen (Abb. 1.4).

Im Falle von Bluetongue Virus (BTV), dem bislang am besten untersuchten Orbivirus, konnte gezeigt werden, dass gereinigtes VP2-Protein eine Antikörperreaktion auslösen kann, die das Virus neutralisiert, die Bindung an Zellen verhindert und Schafe gegen eine BTV-Infektion schützt (Inumaru & Roy, 1987). Untersuchungen an Broadhaven Virus zeigten jedoch, dass hier VP5 die Haupt-Serotyp-Determinante ist (Moss, Ayres & Nuttall, 1987), vermutlich da VP5 auf der Oberfläche des äußeren Kapsids von BRDV besser für Antikörper zugänglich ist als bei BTV.

Die Expression von VP2 und VP5-Protein des TRBV war nicht erfolgreich, daher wurde auf das VP7-Protein zurückgegriffen. Die viralen Gensequenzen von VP2 und VP5 konnten mittels PCR amplifiziert und erfolgreich in den Donorvektor pENTRY-IBA51 ligiert werden, der Transfer der Gensequenzen in den Expressionsvektor pASG-IBA5 führte nach mehreren Versuchen zu keinem Expressionsplasmid mit vollständiger viraler Gensequenz. Die Sequenzierung von TRBV-VP2-pASG-IBA5 zeigte, dass nur 1130bp der ursprünglichen 1659bp (ohne Start- und Stopp-Kodon) in den Expressionsvektor transferiert wurden. Vermutlich ist die rekombinante Schnittstelle des Vektors der VP2-Sequenz so ähnlich, dass die hinteren 529bp abgeschnitten und nicht mit in das Plasmid integriert werden. Die Sequenzierung von TRBV-VP5-pASG-IBA5 zeigte ausschließlich Vektorsequenzen, das Insert ging beim Transfer vollständig verloren. Eine Expression der Proteine war nicht möglich, die Teilsequenz von VP2 führte zu keiner messbaren Expression.

Da allein die Expression des VP7-Proteins für TRBV erfolgreich verlief, wurden alle Daten die das VP2-Protein und das VP5-Protein betreffen nicht weiter in dieser Arbeit berücksichtigt. Das VP7-Protein ist auf Grund der Anordnung der äußeren Kapsidschicht, zumindest im Falle von BRDV, ebenfalls für Antikörper zugänglich (Schoehn et al., 1997) und lässt antigene Eigenschaften für VP7 von TRBV erwarten. Ferner existiert für das verwandte BTV ein VP7-basierter kompetitiver ELISA (Wang, 1992).

Für das Coltivirus EYAV wurde das VP6-Protein (auf Segment 6 lokalisiert) exprimiert. In einem von Jaafar et al. entwickelten ELISA zur Detektion von IgG-Antikörpern gegen das EYAV, in dem die Proteine VP6, VP7 und VP12 verglichen wurden, zeigte das VP6 die stärkste Reaktivität mit einer Spezifität von 100% (kein falsch-positives Ergebnis bei der Untersuchung von 340 Seren französischer Blutspender) (Mohd Jaafar et al., 2004).

Die viralen Gensequenzen ERVEV-N, BHAV-N, PALV-N, UUKV-N, TAHV-N, BATV-N, INKV-N, SFNV-N, SFSV-N, SFTV-N, TOSV-N (Bunyaviren), TBEV-NS1, WNV-NS1 (Flaviviren), EYAV-VP6, TRBV-VP7 (Reoviren) konnten mittels PCR amplifiziert (siehe Agarosegel Abb. 3.1) und erfolgreich in den Donorvektor pENTRY-IBA51 bzw. den Expressionsvektor pASG-IBA5, mit N-terminal gelegener Strep-tag[®] II Affinitätssequenz (Terpe, 2003), ligiert werden.

Durch die Sequenzanalysen zeigte sich in zwei Konstrukten jeweils eine Punktmutation im Vergleich zu der Originalsequenz (siehe Kap. 3.2.2), die unter diesen Umständen exprimierten Proteine zeigten trotz Mutation antigene Eigenschaften (siehe Kap. 3.5.4) und wurden für die Multiplex-CBA-Entwicklung verwendet.

Für die Expression der arboviralen Proteine wurde ein *in vivo* Expressions-System in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen gewählt in Verbindung mit einem Anhydrotetracyclin induzierbaren *tet*-Promotor (Terpe, 2006), unter Verwendung des Expressionsvektors pASG-IBA.

Vorversuche mit dem pPSG-IBA Vektor (IPTG-induzierbare Proteinexpression durch T7-Promotor) zeigten für die exemplarisch verwendeten TRBV-VP7 und UUKV-N eine sogenannte nicht induzierte Spontanexpression. Bereits vor Induktion durch IPTG-Zugabe wurden die Proteine exprimiert, die Zellen zeigten ein verlangsamtes Wachstum

der Hauptkultur bis zur OD = 0,5 (optimale Wachstumsphase zur Induktion). Verantwortlich dafür könnten die möglicherweise für die Zellen leicht toxischen viralen Proteine sein.

Die Spontanexpression bereits in der Vorkultur noch vor IPTG-Induktion verbunden mit einer zeitlichen Verlängerung der Zellwachstumsphase und einer verringerten Expressionseffizienz wurde bereits mehrmals bei Proteinexpressionen mit verschiedenen T7 RNA Polymerase/ T7 Promotor basierten Expressionssystemen beschrieben (Mertens, Remaut & Fiers, 1995). Da jedes rekombinante Protein anders auf seine Umgebung einwirken kann, ist eine Voraussage der Expressionseffizienz nie möglich und muss individuell ausgetestet werden. In kleinem Maßstab, um einen Überblick zu erhalten, eignen sich *in vitro* Expressionssysteme. Für größere Proteinmengen eignen sich, nicht zuletzt auch aus Kostengründen, *in vivo* Expressionssysteme, in denen Wirtszellen und Expressionsvektoren aufeinander abgestimmt werden können (z.B. StarGate[®]-System, IBA).

Vergleichsexperimente von Proteinexpressionen mit pPSG-IBA und pASG-IBA Expressionsvektoren zeigten eine deutlich höhere Proteinkonzentration für die Proteine der Arboviren TRBV und UUKV nach Expressionsversuchen mit dem pASG-IBA Vektor. Die Versuchsdauer auf Grund der Wachstumsgeschwindigkeit der Vorkultur war bei Verwendung des pASG-IBA Vektors kürzer. Die pASG Vektoren zeichnen sich durch ihre dichte Expression (keine Proteinexpression vor Induktion durch Anhydrotetracyclin) aus, laut Hersteller wird dieser Vektor bei der Expression vermeintlich toxischer Proteine empfohlen. Die Vorversuche wurden in dieser Arbeit nicht dargestellt, sie decken sich mit den Angaben zu den Vektoren des StarGate[®] – Handbuches des Herstellers (www.iba-lifesciences.com/technical-support.html) und den Expressionstests von Skerra mit pASK Expressionsvektor, einem dem pASG sehr ähnlichen Vektor (Skerra, 1994).

Wie in Kap. 2.2.4.6 beschrieben, wurde durch Verwendung der pASG-IBA5 Vektoren den rekombinanten viralen Proteinen bei der Expression N-terminal eine Strep-tag[®]II Affinitätssequenz angehängt. Dieser acht Aminosäuren lange Strep-tag[®]II (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) beeinflusst dabei weder die Proteinstruktur noch die biologische

Aktivität des Proteins als Antigen (Schmidt & Skerra, 2007). Der spezifische Nachweis im Western Blot mit Anti-Strep-tag[®]II-HRP durch ECL-Reaktion (Abb. 3.7) zeigte, dass alle Proteine erfolgreich exprimiert und gereinigt durch Säulenchromatographie vorlagen. Die unlöslichen Proteine ERVEV-N, EYAV-VP6, TRBV-VP7, TBEV-NS1 und WNV-NS1 (siehe Tabelle 3.4 [S]) wurden zuvor durch Solubilisierung in ihre lösliche Form überführt.

In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Solubilisierung mit 1,5% Sarkosyl zwar den größten Teil ungelöster Proteine in eine lösliche Form überführt, dass dadurch aber ihre Aktivität stark herabgesetzt werden kann (Zhuo et al., 2005). Eine Solubilisierung mit 0,3% Sarkosyl hingegen wird als ausreichend für die Solubilisierung von funktionsfähigen Proteinen beschrieben (R.R. Burgess, 1996). Für die Solubilisierung wurde in dieser Arbeit in einer Versuchsreihe eine Sarkosyl-Konzentration von 0,4% als ideal ermittelt und verwendet. Alle unlöslichen Proteine konnten solubilisiert werden und zeigten nach Kopplung an Beads antigene Eigenschaften (siehe Sensitivität).

Für die Kopplung von $1,25 \times 10^6$ Beads wird durch den Hersteller (BioRad) eine Proteinkonzentration von 5-12µg Protein empfohlen. Um diese Proteinmenge zu erhalten, wurden die rekombinanten Proteine *in vivo* in 100ml *E. coli* BL21 (DE3) Kulturen exprimiert.

Die Kopplung der 15 arboviralen Proteine an unterschiedliche farbkodierte Beads konnte nach Inkubation mit Strep-Tactin-R-PE durch Fluoreszenzdetektion (MAGPIX[™]-System) nachgewiesen werden. Das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin markierte Strep-Tactin bindet dabei an die Affinitätssequenz (Strep-tag[®]II) des rekombinanten Proteins. Als Negativkontrolle wurden Beads verwendet, die zuvor mit BSA bzw. *E. coli* Proteinen gekoppelt wurden (siehe Kap. 3.5.3.1). Pro Messung wurden mind. 100 Beads am MAGPIX[™]-System gemessen und daraus die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) berechnet. Abb. 3.10 zeigt die graphische Auftragung des Kopplungssignals und die Ergebnisse des *E. coli* Protein Nachweises je Beadpopulation. Ein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal der Kopplungsmessungen der Beadpopulationen mit arboviralen Proteinen (2000-fach bis 20000-fach höher) im Vergleich zu den beiden internen Negativkontrollen bestätigen die Kopplungen für alle Proteinbeads.

Die ebenfalls in Abb. 3.10 dargestellten Ergebnisse der *E. coli* Protein Nachweismessung bestätigen die Vermutung, dass nach Säulenchromatographie (siehe Kap. 3.3.2) die Eluate der rekombinanten Proteine nicht vollständig von allen (als Nebenprodukt der Expression entstandenen) *E. coli* Proteinen gereinigt vorlagen. Der in Abb. 3.9 dargestellte Western Blot mit spezifischem Nachweis durch Anti-*E.coli* Antikörper bekräftigt diesen Verdacht. Bei späteren Expressionen wie BHAV und PALV wurden die Proben doppelt (nach vorheriger Dialyse) über die zuvor regenerierte Säule gegeben.

Es muss demnach davon ausgegangen werden, dass eine geringe Menge verbliebener *E. coli* Proteine der Expressionskultur ebenfalls an die Beadoberfläche der Proteinbeads gekoppelt wurde. Seren mit intrinsisch hohem *E. coli*-Antikörpertiter könnten demnach zu einem Fluoreszenzsignal führen, obwohl keine anti-viralen Antikörper im Serum vorhanden sind.

Bei der Annahme, dass: (i) bei einer Kopplung von 10µg Protein alle Bindungsstellen der Beads besetzt werden, (ii) alle arboviralen Oberflächenproteine nicht mit anti-*E. coli* Antikörpern kreuzreagieren (keine Reaktion der rekombinanten Proteine im Western-Blot/Chemilumineszenz auf anti-*E. coli* Antikörper Abb. 3.9, nur spezifische *E. coli*-Proteinbande) und (iii) bei der Kopplung der *E. coli*-Kontrolle (BP-65) 100% *E. coli* Proteine an die Beadpopulation gekoppelt wurden, kann man davon ausgehen, dass der Wert (MFI) von 44624 der CBA-Messung (Tabelle 3.8) als Absolutwert (100%) interpretiert werden kann.

Daraus ergibt sich, dass bei 11 von 15 Kopplungen mind. 75% der Bindungsstellen mit arboviralen Proteinen und maximal 25% der Bindungsstellen mit *E. coli* Proteinen gekoppelt vorlagen (UUKV 98%, PALV 98%, BHAV 97%, TOSV 95%, SFTV 91%, INKV 89%, SFNV 81%, TAHV 80%, SFSV 79%, ERVEV 75%, TRBV 75%).

Ferner wurden bei 3 Kopplungen 60 –70% der Bindungsstellen mit arboviralen Proteinen und 30-40% mit *E. coli* Protein besetzt (TBEV 69%, EYAV 66%, BATV 62%).

Lediglich bei 1 Kopplung (WNV) lag das Verhältnis arboviraler Proteine zu *E. coli* Proteinen bei 51% zu 49%.

Die Kopplungsergebnisse durch Tag-Nachweis eignen sich nicht für derartige Rückschlüsse, da zum einen keine zu 100% mit Strep-tag[®] II gekoppelte Beadpopulation als

Absolutwert vorliegt und zum anderen jedes Protein durch Faltung und Größe eine unterschiedliche Zugänglichkeit des Strep-tag[®]IIs aufweist. Dennoch beweisen die gemessenen Fluoreszenzsignale nach Strep-Tactin-R-PE Inkubation (Tabelle 3.6), dass die Kopplung jeder Beadpopulation mit entsprechendem Strep-tag[®]II tragenden arboviralen Proteinen erfolgreich stattgefunden hat (siehe Kopplung).

Um falsch positive Signale in den Patientenseren durch Antikörper gegen *E. coli* auszuschließen, wurde eine Präadsorption des zu untersuchenden Materials durchgeführt (siehe Kap.2.2.5.2.3 und Kap.3.5.3.2), um die in den Patientenproben enthaltenen *E. coli*-Antikörper noch vor Kontakt mit den Proteinbeads abzufangen. Wie in Abb. 3.11 gezeigt, senkt eine Präadsorption das *E. coli* Signal auf ein zu vernachlässigendes Maß.

Auch wenn eine 1:10 Verdünnung des *E. coli* Lysats das *E. coli* Signal noch stärker reduziert hätte (siehe Abb. 3.11), wurde die Verdünnung so hoch wie möglich gewählt, um die Ursprünglichkeit des Probenmaterials weitestgehend zu wahren. Es zeigte sich, dass eine 1:60 Verdünnung das *E. coli* Signal auf ein zu vernachlässigendes Maß reduzierte. Solange der Wert unterhalb des *E. coli* spezifischen Grenzwertes (siehe Kap.3.5.6) liegt, ist ein falsch positives Ergebnis durch *E. coli*-Antikörper auszuschließen.

Die zur Verfügung stehenden Positivseren wurden zur Sensitivitätsmessung (siehe Kap.3.5.4) verwendet. Wie in Abb. 3.12 A und B zusammengefasst und in Abb. 6.4 einzeln dargestellt, konnten IgG-Antikörper gegen alle 15 Arboviren eindeutig nachgewiesen werden. Die medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind je Versuch signifikant höher als ihre vergleichbare Negativkontrolle. Es zeigten sich zwei Typen von Kurvenverläufen bei der Auftragung der MFI gegen die verschiedenen Verdünnungen (1:8 bis zu 1:65536): sigmoider Kurvenverlauf bei hoher Sensitivität (Typ I), linearer Kurvenverlauf bei geringerer Sensitivität (Typ II), was zum einen durch unterschiedlich fest bindende Antikörper an die Proteinbeads und zum anderen durch unterschiedliche anti-arbovirale Antikörpertiter der Positivseren zu erklären ist.

Der Kurvenverlauf von SFNV-N und TOSV-N (Typ II) lässt sich durch das verwendete humane Positivserum erklären, welches schon im IFT mit einer Nachweisgrenze von 1:80 auf ein nicht hochtitriges Serum hindeutet. Ein polyklonales Mausserum stand leider nicht

zur Verfügung, würde aber wahrscheinlich durch einen höheren Antikörpertiter zu einer Typ I Sensitivität mit sigmoidem Kurvenverlauf führen.

Bei der Kopplung der Proteine BATV-N und ERVEV-N (Typ II) betrug der Anteil der gekoppelten *E. coli* Proteine ca. 38% und 25%. Eine doppelte Reinigung der Proteine über Strep-Tactin Säulen könnte zu einer höheren Reinheit der gekoppelten viralen Proteine und einer damit verbundenen höheren Nachweissensitivität im CBA führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine solche Doppelreinigung für BATV-N und ERVEV-N nicht durchgeführt.

Bei TRBV-VP7 werden zum einen die 25% durch *E. coli* Protein blockierten Bead-Bindungsstellen ein Grund für die mit allen anderen Proteinbeads vergleichbar geringste Sensitivität sein. Ferner wird die bereits erwähnte strukturelle Lokalisation des VP7 auf der Virusoberfläche (versenkt und möglicherweise von VP2 und VP5 überdeckt) und die damit verbundene geringere Zugänglichkeit für Antikörper ein weiterer Grund für die beobachtete geringere Sensitivität sein. Da die Expression von VP2 und VP5 im Rahmen dieser Arbeit nicht zu den zur Kopplung notwendigen Proteinmengen geführt hat, muss die Expression dieser Proteine optimiert werden. Zur Verbesserung der Sensitivität zum Nachweis von TRBV wird die zusätzliche Aufnahme von VP2 und VP5 in den Multiplex-Test empfohlen. Die Sensitivität des VP7 reichte dennoch aus, um bei einer 1:200 Verdünnung von Patientenserum einen signifikanten Unterschied der MFI zum Negativserum zu erkennen und so Rückschlüsse auf vorliegende TRBV-Infektionen zu erhalten.

WNV-NS1 zeigt, obwohl wahrscheinlich nur die Hälfte der Bead-Bindungsstellen durch virales NS1 Protein gekoppelt wurde, eine signifikant erhöhte MFI im Vergleich zur Negativkontrolle. Eine doppelte Reinigung über Strep-Tactin Säulen würde zu einer höheren Sensitivität führen. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Verbesserung der Sensitivität wäre statt der Kopplung der löslichen Monomere des NS1-Proteins die Kopplung der bereits erwähnten hexameren Form des NS1-Proteins.

Für die Typ I Proteinbeads zeigte sich eine hohe Sensitivität (Abb. 3.12 A), der gemeinsame dynamische Bereich lag zwischen den Serenverdünnungen von 1:128 und

1:2048. Für die bereits erwähnten Typ II Proteinbeads zeigte sich eine geringere Sensitivität (Abb. 3.12 B), der gemeinsame dynamische Bereich lag zwischen den Serenverdünnungen von 1:16 und 1:256.

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist durch das entwickelte CBA-System Antikörper gegen Arboviren in Positivseren nachzuweisen. Als optimale Serumverdünnung zur Multiplex-CBA Entwicklung, bei der alle Proteinbeads signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu ihrer Negativkontrolle zeigen, wurde eine Serenverdünnung von 1:200 standardmäßig festgelegt.

Höher konzentrierte Patientenseren mit hohem Antikörpertiter könnten bei den Proteinbeads mit hoher Sensitivität dazu führen, dass der Multiplex-CBA nicht für alle Proteinbeads in seinem dynamischen Bereich (siehe Kap.3.5.4) liegt und sich ggf. die vorhandenen Antikörper gegenseitig behindern. Stärker verdünnte Seren hingegen könnten bei den Proteinbeads mit etwas geringerer Sensitivität zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Im Vergleich der Nachweisgrenze der Positivseren, die mittels CBA und IFT ermittelt wurden (siehe Tabelle 3.11) zeigte sich, dass der entwickelte CBA mindestens die doppelte Sensitivität im Vergleich zum IFT aufweist, teilweise sogar 100-fach sensitiver ist (siehe Tabelle 3.11 TAHV).

Der Kreuzreaktivitätstest des CBA als Multiplex-Test (siehe Kap. 3.5.5) ermöglicht Aussagen zur Spezifität der 15 einzelnen viralen Proteinbeads.

Zum Vergleich wurde eine phylogenetische Analyse der 15 arboviralen Proteinsequenzen durch ClustalW Multiple Sequence Alignment (LasergeneTM: DNASTAR Inc.) durchgeführt. Die Homologien der Proteine zueinander sind in Abb. 4.1 dargestellt und spiegeln im Wesentlichen die im Multiplex-CBA gezeigten Kreuzreaktivitäten (BHAV-N/PALV-N, INKV-N/TAHV-N, SFNV-N/TOSV-N, SFSV-N/SFTV-N und WNV-NS1/TBEV-NS1) wieder.

		Identität [%]																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergenz	1	█	10.2	9.4	6.9	42.9	10.6	12.2	11.1	11.1	42.9	9.4	13.1	6.5	13.7	9.0	1	BATV-N
	2	504.0	█	11.4	10.9	9.7	97.6	32.1	34.6	35.4	9.3	8.9	32.1	10.6	26.1	5.3	2	BHAV-N
	3	553.0	442.0	█	8.3	6.0	11.4	9.5	8.6	9.4	6.0	5.4	8.8	6.3	10.3	6.7	3	ERVEV-N
	4	1000.0	461.0	661.0	█	8.5	10.5	9.9	11.8	11.0	8.9	10.8	9.1	7.0	10.2	11.6	4	EYAV-VP6
	5	101.1	538.0	1000.0	637.0	█	9.7	6.5	8.8	9.3	83.8	6.8	7.4	6.0	9.7	8.9	5	INKV-N
	6	476.0	2.5	442.0	482.0	538.0	█	32.1	34.1	35.0	9.3	9.3	32.1	11.0	26.1	5.3	6	PALV-N
	7	407.0	147.4	545.0	524.0	1000.0	147.4	█	44.3	45.1	6.1	11.1	89.3	8.8	29.6	10.7	7	SFNV-N
	8	451.0	134.8	637.0	426.0	605.0	136.8	96.5	█	97.2	8.8	12.7	43.5	8.2	34.3	8.9	8	SFSV-N
	9	451.0	130.9	560.0	461.0	569.0	132.8	93.9	2.9	█	9.3	13.1	43.9	8.2	34.3	9.8	9	SFTV-N
	10	101.1	569.0	1000.0	595.0	18.3	569.0	1000.0	605.0	569.0	█	7.2	7.0	6.4	8.4	8.9	10	TAHV-N
	11	553.0	595.0	1000.0	471.0	1000.0	560.0	451.0	393.0	380.0	874.0	█	11.0	5.5	9.1	43.1	11	TBEV-NS1
	12	377.0	147.4	615.0	577.0	845.0	147.4	11.5	99.1	97.8	1000.0	461.0	█	8.5	29.5	9.8	12	TOSV-N
	13	1000.0	482.0	1000.0	945.0	1000.0	461.0	615.0	688.0	688.0	1000.0	1000.0	649.0	█	7.3	7.3	13	TRBV-VP7
	14	360.0	188.3	493.0	498.0	538.0	188.3	162.5	136.1	136.1	661.0	586.0	163.3	874.0	█	11.8	14	UUKV-N
	15	586.0	1000.0	1000.0	434.0	595.0	1000.0	476.0	595.0	531.0	595.0	100.3	531.0	845.0	422.0	█	15	WNV-NS1
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		

Abb. 4.1: Phylogenetische Analyse der 15 arboviralen Proteinsequenzen. Dargestellt sind die einzelnen prozentualen Identitäten und Divergenzen der Proteinsequenzen zueinander. Farblich hervorgehoben sind die im Multiplex-CBA auftretenden Kreuzreaktivitäten von BHAV-N/PALV-N (97,6%), INKV-N/TAHV-N (83,8%), SFNV-N/TOSV-N (89,3%), SFSV-N/SFTV-N (97,2%) und WNV-NS1/TBEV-NS1 (43,1%). (ClustalW Multiple Sequence Alignment, MegAlign, Lasergene™: DNASTAR Inc.)

Die Reoviren (EYAV-VP6 und TRBV-VP7), sowie die Bunyaviren UUKV-N, BATV-N, ERVEV-N zeigten keine signifikanten Kreuzreaktionen zu anderen Proteinbeads. Mit Homologie von unter 12% zu den jeweils 14 anderen Aminosäuresequenzen bestätigen die phylogenetischen Analysen für EYAV-VP6, TRBV-VP7 und ERVEV-N die Ergebnisse. Ebenfalls lässt sich aus Multiplex-CBA und phylogenetischer Analyse schließen, dass im Falle von UUKV-N eine maximale Homologie zu den anderen Proteinen von 34,3% ebenfalls nicht zu einer messbaren signifikanten Kreuzreaktion führt.

Innerhalb der von Zecken-übertragenen Phleboviren zeigte sich neben dem erwähnten UUKV (keine Kreuzreaktion im Multiplex-CBA) eine Kreuzreaktion von BHAV-N und PALV-N. Beide Positivseren führten zu einem Fluoreszenzsignal jeweils beider Beadpopulationen, blieben jedoch im Multiplex-CBA für alle anderen Beads negativ (Tabelle 3.12). Durch die auf Nukleotidebene 86%ige Homologie des S-Segmentes von BHAV und PALV (Dilcher et al., 2012a) war diese Kreuzreaktion zu erwarten. Das S-Segment von UUKV weist im Vergleich lediglich eine 35,8%ige Homologie auf Nukleotidebene zu BHAV auf (Dilcher et al., 2012a). Diese Ergebnisse decken sich mit der phylogenetischen Analyse auf Proteinebene, BHAV-N und PALV-N zeigen eine 97,6%ige

Homologie (siehe Abb. 4.1 roter Kasten) und bestätigen dadurch letztlich die serologischen Ergebnisse bei der Erstbeschreibung des PALV (Filipe et al., 1994).

Innerhalb der von Stechmücken-übertragenen Orthobunyaviren zeigten nur INKV-N und TAHV-N eine Kreuzreaktion. Es kam zu keiner Kreuzreaktion mit BATV-N. Das TAHV-Positivserum führte zu einem Fluoreszenzsignal beider Beadpopulationen, blieb jedoch sonst im Multiplex-CBA negativ. INKV und TAHV sind auf Nukleotidebene für das S-Segment zu 79,7% homolog (Vapalahti et al., 1996) und zeigen für das N-Protein auf Aminosäureebene nach ClustalW Alignment sogar 83,8 %ige Homologie (siehe Abb. 4.1 roter Kasten). TAHV und INKV werden der California Serogruppe und BATV der Bunyamwera Serogruppe der Bunyaviren zugeordnet (Lundstrom, 1999).

Wegen der antigenen Verwandtschaften der einzelnen Epitope des E-Proteins der Flaviviren werden hohe Kreuzreaktivitäten bei der Testung verschiedener Seren beobachtet (Crill et al., 2007; Dobler et al., 1997; Kimurakuroda & Yasui, 1986; Liu et al., 2008). Die Kopplung des NS1-Proteins der Flaviviren WNV und TBEV (zu 43,1% homolog siehe Abb. 4.1 roter Kasten) führte nicht zu der erhofften verbesserten und eindeutigeren Differenzierung, WNV-NS1 und TBEV-NS1 zeigten eine Kreuzreaktion im Multiplex-CBA, blieben jedoch für Bunyaviren und Reoviren unauffällig.

Die europäischen Sandmücken-übertragenen Phleboviren werden in zwei Serogruppen eingeteilt (Hubálek, 1996). Wie erwartet zeigten sich Kreuzreaktionen der Proteinbeads SFNV-N mit TOSV-N, sowie SFSV-N mit SFTV-N. Alle anderen Proteinbeads blieben bei den Kreuzreaktivitätstests der Positivseren der Phleboviren im Multiplex-CBA unauffällig. SFTV-N und SFSV-N zeigen auf Nukleotidebene für das S-Segment eine 91,8%ige Homologie (Carhan et al., 2010), auf Aminosäureebene sind SFSV-N und STFV-N zu 97,2% homolog und SFNV-N und TOSV-N zu 89,3% (siehe Abb. 4.1 roter Kasten). Beide Gruppen zueinander zeigen jedoch nur Homologien von 43,5 - 45,1% und führen zu keinen signifikanten Kreuzreaktionen im Multiplex-CBA.

Kurz gesagt konnten Kreuzreaktionen für BHAV/PALV, INKV/TAHV, TBEV/WNV, SFNV/TOSV, SFSV/SFTV gezeigt werden.

Es ist demnach möglich Patientenseren mit dem Multiplex-CBA zu testen und anschließend die Ergebnisse zehn verschiedenen Kategorien zuzuordnen. Fünf Kategorien sind dabei eindeutig einem Arbovirus zuzuordnen (BATV, ERVEV, EYAV, UUKV, TRBV), die anderen fünf Kategorien ermöglichen durch Kreuzreaktion zueinander die Eingrenzung auf je zwei Viren (BHAV/PALV, INKV/TAHV, TBEV/WNV, SFNV/TOSV, SFSV/SFTV).

Die Evaluation des neu entwickelten Multiplex-CBA erfolgte an Hand der bereits in Kap. 2.2.5.2.5 beschriebenen Proben erkrankter Patienten mit Symptomen einer aseptischen Meningitis oder aseptischen Meningoenzephalitis. Als Kernuntersuchung der vorliegenden Arbeit soll somit die Frage beantwortet werden, ob es möglich ist, anhand der in dieser Arbeit exprimierten, gereinigten und an Beads gekoppelten arboviralen Proteine, anti-arbovirale Antikörper in Seren nachzuweisen.

Hierzu wurden die Beads im Multiplex-Ansatz (siehe Kap. 2.2.5.2.5) mit Patientenseren (1:200 verdünnt) inkubiert, gefolgt von einer Zweitantikörperinkubation. Nach Messung am MAGPIXTM-System wurde die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt. Bei dem Probenmaterial handelt es sich um Humanseren, der Zweitantikörper wurde entsprechend des Ursprungs und Immunglobulin-Typs gewählt (PE-Anti-Human IgM bzw. PE-Anti-Human IgG). Als Negativkontrolle wurden beide Kontrollbeads (BSA und *E.coli*) mitgeführt.

Der Grenzwert (siehe Kap. 2.2.5.2.6) wurde auf Grund nicht vorhandener humaner Positivseren an Hand der Messung von 45 bestätigten Negativseren für jede Beadpopulation unabhängig berechnet. Für die IgM-Antikörperdetektion und die IgG-Antikörperdetektion wurde jeweils ein Grenzwert für jede Beadpopulation berechnet. Verglichen wurden zwei Methoden: Die aus Erfahrungsberichten stammende Standardformel (A): Mittelwert addiert mit der sechsfachen Standardabweichung und die nach (Frey et al., 1998) statistisch definierte Endpunkt Titer Bestimmung für Immuntests (B): Mittelwert addiert mit dem Produkt aus Standardabweichung und Multiplikator f . Zur Vermeidung falsch positiver Signale wurde der t -Wert einer einseitigen t -Verteilung mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9999% ($P = 0,999999$) möglichst hoch gewählt. Zur Bestätigung des ersten Befundes würde einem Patienten innerhalb von zwei Wochen

erneut eine Probe entnommen werden, wäre der Patient wirklich akut infiziert müsste die zweite Probe deutlich oberhalb des IgG-Grenzwertes liegen (Serokonversion). Um unnötige, kostenintensive und möglicherweise risikoreiche Behandlungen eines Patienten mit nicht bestätigtem Befund zu vermeiden, ist der Grenzwert vertretbar größer zu wählen, als es die Sensitivitätsmessungen erlauben. Eine endgültige Evaluation des Multiplex-CBA ist erst mit der Zeit möglich, wenn auf Grund mehrerer Studien genug bestätigte humane Positivseren vorliegen. An Hand gut charakterisierter Positiv- und Negativseren könnten weitere Grenzwertberechnungen (Greiner & Gardner, 2000; Greiner, Sohr & Gobel, 1995) erstellt werden, was z.B. die Einteilung in drei Kategorien (positiv, grenzwertig, negativ) ermöglichen würde. Da zurzeit bundesweit keine definierten Humanseren in ausreichender Zahl vorliegen ist eine solche Untersuchung nicht möglich.

Beide in dieser Arbeit in Kap. 2.2.5.2.6 beschriebenen und in Kap. 3.5.6 berechneten Grenzwerte führen zu nahezu der gleichen Anzahl positiver Seren, so dass im Folgenden die Auswertung an Hand des etwas geringeren Grenzwertes (Methode B) diskutiert wurde, um alle auffälligen Seren zu erfassen.

Die internen CBA-Kontrollen, in Form von an Beads gekoppelten BSA und *E.coli* Proteinen, konnten erfolgreich hergestellt werden. Durch das standardmäßige Mitführen der *E. coli* Kontrolle (BP 65) können falsch positive Seren, die auch nach Präadsorption einen störenden anti-*E. coli* Antikörpertiter aufweisen, schnell und einfach identifiziert werden.

23 Seren zeigten Auffälligkeiten mindestens einer Beadpopulation für anti-arbovirale IgG-Antikörper (siehe Kap. 3.5.6) nach erster Messung aller 111 Patientenseren. Auffällig bedeutet, dass die ermittelte MFI oberhalb des errechneten Grenzwertes lag, alle auffälligen Ergebnisse wurden in Tabelle 6.7 farblich hervorgehoben. Ein Patientenserum (558123) zeigte trotz Präadsorption (siehe Kap.2.2.5.2.4) eine erhöhte MFI der *E.coli* Kontrolle. Die ebenfalls messbare MFI für TAHV dieses Serums wird als falsch positiv auf Grund störender *E.coli*-Antikörper im Serum eingestuft. Alle anderen Seren zeigten keine Auffälligkeiten der internen Kontrollen.

Alle 23 IgG-Antikörper auffälligen Patientenseren wurden drei Mal (in voneinander unabhängigen Testläufen) gemessen (Tabelle 6.11). Bei 91% der Seren (21 von 23) konnten die Ergebnisse der ersten Messung in beiden folgenden Messungen bestätigt werden.

27 Seren zeigten Auffälligkeiten mindestens einer Beadpopulation für anti-arbovirale IgM-Antikörper (siehe Kap.3.5.6) nach erster Messung aller 111 Patientenseren und liegen oberhalb des errechneten Grenzwertes (siehe Tabelle 6.8). Das Patientenserum (653731) zeigte Reaktion auf die BSA-Kontrolle, blieb aber für alle anderen Proteinbeads unauffällig. 26 der 28 IgM-Antikörper auffälligen Patientenseren wurden zur Bestätigung der Ergebnisse erneut mit dem Multiplex-CBA gemessen, zwei Patientenseren standen zur erneuten Messung nicht mehr zur Verfügung (495922, 612490). Die positiven Multiplex-CBA Ergebnisse konnten bei 77% der Seren (20 von 26) bestätigt werden (siehe Tabelle 6.12). Ein möglicher Grund für die niedrigere Reproduktionsrate der Ergebnisse im Vergleich zu den Multiplex-CBA Messungen der anti-arboviralen IgG-Antikörper könnte die Tatsache sein, dass IgM-Antikörper anfälliger gegenüber dem mehrfachen Auftauen und Einfrieren sind (Truszkiewicz, 2011). Die zweite Messung zeigte tendenziell etwas geringere MFI der Proteinbeads.

Für die Zuordnung der Multiplex-CBA Ergebnisse in zurückliegende Infektionen (Fall 2, siehe Kap. 3.5.7.1.2) und akute Infektionen (Fall 3-4, siehe Kap. 3.5.7.1.3 und 3.5.7.1.4), wie in Kap. 2.2.5.2.6 ausführlich beschrieben, wurden 22 der 23 IgG-Antikörper auffälligen Seren zur Absicherung im IFT (Verdünnung 1:100) getestet. Das Serum mit der Nummer 654198 stand zur IFT Überprüfung nicht mehr zur Verfügung. Von 3 der 22 Patienten standen jeweils zwei Proben (Abnahme innerhalb von zwei Wochen) zur Messung zur Verfügung. Diese mit *gekennzeichneten Seren wurden ebenfalls im IFT überprüft. Eine Zusammenfassung beider Auswertungen ist in Tabelle 3.20 dargestellt. Von den insgesamt 25 überprüften Patientenseren konnten 21 Patientenseren (84%) durch Immunfluoreszenzmikroskopie der IFTs als auffällig bewertet werden. Bei 35 positiven CBA Ergebnissen konnten 29 im IFT (83%) positiv bestätigt werden und bei 13 negativen CBA Ergebnissen konnten 9 im IFT (70%) negativ bestätigt werden.

Im Anhang wurden die Multiplex-CBA Ergebnisse aller auffälligen Patientenseren nach Fallzuordnung graphisch dargestellt (Fall 2 siehe Kap. 6.6.6, Fall 3 siehe Kap. 6.6.7, Fall 4 siehe Kap. 6.6.8). Gezeigt werden die MFI je Beadpopulation einmal gegen anti-arbovirale IgM- und einmal gegen anti-arbovirale IgG-Antikörper. Mit nur einer abgegebenen Patientenprobe können keine den Verdacht der ersten Probe bestätigenden Aussagen getroffen werden, eine zweite Probe (Abgabe innerhalb von zwei Wochen) hätte die Diagnose zweifelsfrei bewiesen. Bei nur 6 von 111 Patienten stand eine zweite Probe zur Messung zur Verfügung (Tabelle 6.9 und Tabelle 6.10), für alle anderen Patienten kann der Multiplex-CBA nur einen Hinweis auf die vermeintlich vorliegende arbovirale Infektion geben.

Die Fallzuordnung der 111 erkrankten Patienten mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Multiplex-CBA wird im Folgenden ausführlich beschrieben.

Fall 1 (IgM negativ, IgG negativ): 69 von 111 Patienten (62%) zeigen keine Anzeichen für eine akute oder Wochen bis Monate zurückliegende arbovirale Infektion der in dieser Arbeit untersuchten 15 Arboviren (IgM-Antikörper und IgG-Antikörper unauffällig). Der Auslöser der Krankheitssymptome bleibt weiterhin unklar, eine BATV-, BHAV-, ERVEV-, EYAV-, INKV-, PALV-, SFNV-, SFSV-, SFTV-, TAHV-, TBEV-, TOSV-, TRBV-, UUKV-, oder WNV-Infektion konnte als Krankheitsursache ausgeschlossen werden.

42 von 111 Patienten (38%) zeigen Anzeichen für eine akute oder Wochen bis Monate zurückliegende arbovirale Infektion:

Fall 2 (IgM negativ, IgG positiv): Von den 42 Patienten weisen 11 Patienten (10% aller getesteten Patienten) Anzeichen einer zurückliegenden arboviralen Infektion auf. Auf Grund der spezifischen MFI, bzw. signifikant erhöhter MFI bestimmter Proteinbeads (siehe Kreuzreaktivitätstest Kap. 3.5.5) konnten den Patienten Einzelinfektionen (siehe Tabelle 3.15) oder Mehrfachinfektionen (siehe Tabelle 3.16) zugeordnet werden.

Hinweise für Einzelinfektionen konnten für INKV/TAHV=3 (2,7%), EYAV=3 (2,7%), SFNV/TOSV=1 (0,9%) und TRBV-Infektion (0,9%) (Nr.554005) gezeigt werden.

Das Patientenserum mit der Nr. 554005 konnte weder mit weiteren CBA-Messungen, noch mit dem IFT bestätigt werden. Es muss als unbestätigter Verdacht auf eine zurückliegende TRBV-Infektion behandelt werden.

Das Patientenserum mit der Nummer 120116 ist für alle vier Sandmückenfiebertviren (SFSV, SFNV, SFTV, TOSV) positiv. Es kann sich entweder um eine Mehrfachinfektion mit jeweils einem Virus jeder Kategorie (SFSV/SFTV, SFNV/TOSV) handeln oder es liegt eine Infektion mit einem diesen Viren verwandten, aber nicht im Multiplex-CBA erfassten Sandmückenfiebertvirus vor, das eine ausreichende Homologie des Nukleokapsids aufweist, um eine Kreuzreaktivität hervorzurufen.

Wie in Kap. 3.5.7.2 beschrieben führte die Untersuchung von 2 Patientenseren mittels Multiplex-CBA und IFT zum Verdacht auf zurückliegende Mehrfachinfektionen (siehe Tabelle 3.16):

Hinweis auf Mehrfachinfektion bei dem Patientenserum 653731 mit zurückliegender INKV/TAHV-, sowie TOSV-Infektion und IFT-begründetem Verdacht einer EYAV-Infektion.

Hinweis auf Mehrfachinfektion bei dem Patientenserum 584297 (mit zurückliegender SFNV/TOSV-Infektion und dem Verdacht einer zusätzlichen zurückliegenden INKV- und EYAV-Infektion). Von diesem Patienten stand eine weitere Probe zur Messung zur Verfügung, die Ergebnisse bestätigen den Verdacht auf eine vorliegende Mehrfachinfektionen (siehe Abb. 3.15).

Fall 3 und Fall 4: Von den 42 Patienten weisen 31 Patienten (28% aller getesteten Patienten) Anzeichen einer akuten arboviralen Infektion auf. Hierbei kann zwischen einer akuten Infektion ohne Serokonversion (Fall 3: IgM positiv, IgG negativ) und einer Infektion in der späten akuten Phase mit Serokonversion (Fall 4: IgM positiv und IgG positiv) unterschieden werden.

Nur von zwei Patienten stand eine weitere Probe (Abnahme innerhalb von zwei Wochen) zur Messung zur Verfügung (siehe Tabelle 6.9 und Tabelle 6.10). Bei dem einen Patienten (578045 + 578586) konnte so eine akute EYAV-Infektion bestätigt werden, bei dem anderen Patienten (652981 + 653434) eine akute SFSV/SFTV-Infektion (siehe Kap. 3.5.7.3) jeweils mit Serokonversion.

Hinweise für akute arbovirale Einzelinfektionen konnten für BHAV/PALV=2 (1,8%), ERVEV=1 (0,9%), EYAV=3 (2,7%) (davon eine unbestätigt), TBEV=1 (0,9%), TRBV=3 (2,7%), INKV/TAHV=3 (2,7%), WNV=1 (0,9%) (unbestätigt), SFNV/TOSV=3 (2,7%), SFSV/SFTV=7 (6,3%) gezeigt werden.

Hinweise auf eine akute arbovirale Mehrfachinfektion (siehe Tabelle 3.18) konnten für ein Serum (618439) für INKV/TAHV und TRBV gezeigt werden. Das Patientenserum (635188) zeigte Hinweise auf akute TOSV-Infektion und eine zurückliegende Infektion mit TRBV und EYAV.

Fall 3 (IgM positiv, IgG negativ): Drei Patientenseren (532655, 567544, 587131) waren zwar auffällig in der IgM-Antikörper Detektionsmessung, konnten aber wegen erhöhter MFI der *E.coli* Kontrolle auf Grund von störenden *E.coli*-Antikörpern im Serum (trotz Präadsorption) und der daraus möglicherweise resultierenden falsch positiven Fluoreszenzsignale nicht ausgewertet werden. Bei zwei weitere Seren (584537 und 630539) lag das Fluoreszenzsignal der *E.coli*-Kontrolle zwar oberhalb des Grenzwertes, die Proteinbeads zeigten jedoch einen signifikanten Unterschied, so dass von einer akuten TRBV-Infektion (584537) beziehungsweise einer akuten SFNV/TOSV-Infektion (630539) ausgegangen werden kann. Das Patientenserum 653039 ohne signifikant erhöhte MFI der IgM-Antikörpermessung, war IgG-Antikörper auffällig für SFTV-N, dies konnte allerdings im IFT nicht bestätigt werden.

Fall 4 (IgM positiv, IgG positiv): Die Ergebnisse des Patientenserums 528149 wurden zur Absicherung im IFT getestet (BHAV und PALV positiv, SFNV negativ). Dieses Serum wurde durch die IFT-Bestätigung als BHAV und PALV IgG positiv eingestuft.

Fünf Seren (545809, 578586, 598313, 604152 und 635188) einzeln graphisch dargestellt im Anhang Abb. 6.12 zeigten eine MFI (IgM-Antikörper Messung) unterhalb des berechneten Grenzwertes, geht man aber davon aus, dass in diesen Fällen die erste Probenentnahme zu spät erfolgte (eine zweite zum Vergleich lag nicht vor) und es bereits zu einer Serokonversion von IgM-Antikörpern zu IgG-Antikörpern gekommen ist, sind diese Seren Fall 4 zuzuordnen. Die Patienten befinden sich in der sehr späten akuten Phase einer viralen Infektion.

Alle Multiplex-CBA Ergebnisse wurden in akute und zurückliegende Einzelinfektionen (siehe Tabelle 3.21) und Mehrfachinfektionen (siehe Tabelle 3.22) zusammengefasst.

Mit dem Multiplex-CBA war es möglich durch die Untersuchung der 111 Patientenserum (Proben erkrankter Patienten mit Symptomen einer aseptischen Meningitis oder aseptischen Meningoenzephalitis, siehe Kap. 2.2.5.2.5) bei 42 Patienten einen erhöhten anti-arboviralen Antikörpertiter zu detektieren.

An Hand von sechs Fallbeispielen (sechs Personen von denen eine weitere Probe zur Untersuchung vorlag) konnten zwei akute arbovirale Infektionen zum einen mit dem von Zecken übertragenen Eyach Virus (EYAV) und zum anderen mit einem der beiden Sandmückenfiebertviren SFSV/SFTV, sowie eine Wochen oder Monate zurückliegende arbovirale Infektion mit einem der beiden Sandmückenfiebertviren SFNV/TOSV als Auslöser der Krankheitssymptome eindeutig identifiziert werden.

Mit dem Multiplex-CBA war es erstmals möglich Patientenserum mit relativ geringem Zeitaufwand auf Mehrfachinfektionen mit unterschiedlichen Arboviren zu testen. Die bei den Mehrfachinfektionen auftretenden Arboviren (siehe Tabelle 3.22) INKV/TAHV, TRBV, EYAV, SFSV/SFTV und SFNV/TOSV spiegeln dabei die fünf häufigsten Fälle der Einzelinfektionen wieder.

Beziehen wir die Erkenntnisse der Fallzuordnungen aller Patienten nach Multiplex-CBA Messungen auf die jeweiligen Vektoren der Viren, um die teilweise spärliche Literatur der wenig untersuchten Arboviren in den Kontext zu den CBA-Ergebnissen zu stellen, lassen sich folgende Aussagen treffen:

15 Patienten zeigten Hinweise auf eine akute oder zurückliegende von Zecken übertragene arbovirale Infektion: 7 Fälle von EYAV (6,3%), 4 Fälle von TRBV (3,6%), 2 Fälle von BHAV/PALV (1,8%) und je 1 Fall von TBEV (0,9%) und ERVEV (0,9%). Es gab keine Hinweise auf eine UUKV-Infektion.

Der Vektor dieser Arboviren *Ixodes ricinus* ist seit Jahren in Deutschland heimisch (siehe Abb. 1.1). Die kürzlich neu im April 2014 erschienene Auflistung des Robert-Koch-Instituts (Seedat, Altmann & Hellenbrand, 2014) der TBE-Risikogebiete, beruhend auf

gemeldeten Fällen von TBE-Erkrankungen in Deutschland von 2002-2013 macht deutlich, wie (aktuell 142 Kreise) diese Zecke fast flächendeckend in Deutschland vorkommt. Dass in dieser Arbeit lediglich ein TBEV Fall gezeigt wurde erklärt sich dadurch, dass alle Seren der Studie zuvor auf TBEV-Infektion geprüft und nicht zum Pool der 111 in dieser Arbeit untersuchten Patientenseren hinzugefügt wurden. Mit dem Multiplex-CBA war es somit möglich bei einem als zuvor enzephalitischen Patienten mit unklarer Ätiologie eingestuften Patienten eine akute TBEV-Infektion nachweisen zu können.

Bei der Untersuchung von Patienten mit neuropathologischen Störungen in Tschechien wurden 12% EYAV positiv getestet (Malkova et al., 1980). Im Rahmen dieser Arbeit wurden 6,3% der Patienten EYAV positiv getestet, ein Zeichen dafür, dass EYAV weiterhin in Deutschland vorkommt. Nach neusten Erkenntnissen konnte mitunter EYAV, TRBV und UUKV in Zecken in Deutschland nachgewiesen werden (Dobler et al., 2014). Im Fall von TRBV konnten diese Erkenntnisse durch die vier TRBV auffälligen Patientenseren bestätigt werden. Eine weitere Studie von 2006, in der Proben von Hasen als mögliches Reservoir für Viren untersucht wurden, zeigte 1 von 22 Proben aus Schleswig-Holstein (Deutschland) einen positiven Fall von TRBV (Dobler et al., 2006).

Hinweise auf eine UUKV-Infektion gab es im Rahmen der Multiplex-CBA Auswertungen nicht. Es lässt sich allerdings vermuten, dass auf Grund der zuvor erwähnten Detektion von UUKV in Zecken (Dobler et al., 2014) eine Untersuchung von Patientenseren des aktuellen Jahres sehr wahrscheinlich UUKV positiv ausfallen würde.

Nach (Hubalek, 2009) kam BHAV 2009 in Europa in Italien, Kroatien, Bulgarien und der Slowakei vor. Die zwei positiven Fälle von BHAV/PALV im Multiplex-CBA lassen dies nun auch für Deutschland vermuten.

Bereits vor 1989 lag die Seroprävalenz der Bevölkerung rund um Saulges (Frankreich) gegen ERVEV bei 2,7% (Chastel et al., 1989). 1998 konnten in einer Blindstudie 13,9% der Patienten mit Donnerschlag Kopfweh („thunderclap headache“) ERVEV Antikörper nachgewiesen werden. Die Seroprävalenz einer Kohorte von unauffälligen Blutspendern lag bei 1% (Treib et al., 1998). Der eine Fall von EYAV unter Patienten mit aseptischer Meningitis und aseptischer Meningoenzephalitis stehen nicht im Widerspruch zu den bislang veröffentlichten Ergebnissen.

7 Patienten zeigten Hinweise auf eine akute oder zurückliegende von Stechmücken-übertragene arbovirale Infektion: 6 Fälle von INKV/TAHV (5,4%), 1 unbestätigter Fall von WNV (0,9%), für eine BATV-Infektion gab es keine Hinweise.

Ein WNV Ausbruch 1999 in Nord-Amerika führte zu 1,8 Millionen infizierten Menschen mit 12 852 gemeldeten Meningoenzephalitis Fällen und 1308 Toten (Kilpatrick, 2011). Ferner wurden 3827 WNV-Infektionen von Menschen innerhalb von fünf Jahren (2003 – 2007) in Colorado gemeldet (Kilpatrick & Pape, 2013). Auch wenn in dieser Arbeit eine WNV-Infektion in Deutschland nicht eindeutig bewiesen werden konnte, so ist es nur noch eine Frage der Zeit.

Die den Erreger tragenden Stechmücken (siehe Abb. 1.2) wurden bereits mehrfach in Deutschland gesichtet (Becker et al., 2014), eine aktuelle Studie belegt Funde verschiedener Stechmückenarten, die von 2010-2014 in Hamburg gefangen wurden (Kruger et al., 2014). Bei der Untersuchung von 16 057 Stechmücken, die in Südwest-Deutschland gefangenen wurden, zeigten sich Hinweise auf BATV in den Vektoren (Jost et al., 2011). Auf Grund phylogenetischer Analysen ist es wahrscheinlich, dass das BATV aus der Slowakei, Ukraine oder Russland nach Deutschland eingewandert ist. Dies konnte mit den von 2003-2009 gesammelten Patientenproben jedoch nicht bestätigt werden.

Die Verbreitung des INKV ist auf Nordeuropa und Russland beschränkt (siehe Abb. 1.2), in den 1960er Jahren betrug die Seroprävalenz in Finnland etwa 24% (Brummer-Korvenkontio et al., 1973) und verdoppelte sich mit 51% nahezu bis 2007 (Putkuri, Vaheri & Vapalahti, 2007). Das TAHV konnte erstmals im Oberrheintal aus Stechmücken, die von 1979-1981 gefangen wurden, isoliert werden (Pilaski & Mackenstein, 1985). Darüber hinaus wurde TAHV im Rahmen einer Dissertationsarbeit im Oberrheingebiet in Stechmücken mit einer nested RT-PCR nachgewiesen (Schüßler, 2000). Aktuelle Studien zufolge konnte TAHV nördlich der Alpen in Tirol in humanen Patientenproben nachgewiesen werden, 2,6% waren TAHV positiv (Sonnleitner et al., 2014). Die ermittelten positiven Seren bestätigen, dass es tatsächlich auch im Oberrheingebiet zu TAHV-Infektionen kommt.

12 Patienten zeigten Hinweise auf eine akute oder zurückliegende von Sandmücken-übertragene arbovirale Infektion: 4 Fälle von SFNV/TOSV (3,6%), 7 Fälle von SFSV/SFTV (6,3%) und 1 Fall, bei dem die MFI aller Proteinbeads der Sandmückenfiebereviren (SFSV+SFTV+SFNV+TOSV) oberhalb des Grenzwertes lagen. Bei diesem Fall konnte nicht geklärt werden, ob es sich um eine Mehrfachinfektion mit mehreren Sandmückenfiebereviren handelt oder um ein in dieser Arbeit nicht untersuchtes Virus, das nah verwandt mit SFSV, SFNV, SFTV und TOSV ist.

Die Seroprävalenz für SFNV und SFSV der Bevölkerung Athens (Griechenland), die vor dem extremen Einsatz von Insektenschutzmitteln als Malariaphylaxe 1946 bereits gelebt hat, liegt zwischen 13 - 36% (Tesh & Papaevangelou, 1977). Eine weitere Studie in Griechenland zeigte 11,26% TOSV positive Menschen im Alter von 1-87 Jahren (Anagnostou & Papa, 2013). Die Seroprävalenz für TOSV im südlichen Europa liegt zwischen 16-72% (Charrel et al., 2005).

Alarmierend sind die insgesamt 10 Fälle (3 SFNV/TOSV, 7 SFSV/SFTV) einer akuten Sandmückenfiebereviren-Infektion. Anders als bisher bekannt (siehe Abb. 1.3) konnten seit 2000 Sandmücken in Deutschland gefangen werden (Naucke et al., 2008; Naucke & Pesson, 2000). Die durch sie übertragenen Viren wurden nur bislang, bedingt durch fehlende Studien, fälschlicherweise nicht als Risiko in Deutschland angesehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Infektionen mit Sandmückenfiebereviren beobachtet, was die Vermutung nahe legt, dass die Sandmücken den Sprung von südlich der Alpen in unsere Breitengrade vollzogen haben. Dies deckt sich mit der Hypothese von (Semenza & Menne, 2009), dass eine mögliche Ausbreitung der Sandmücken in Europa besteht, sofern es die Umweltbedingungen ermöglichen.

Durch die Entwicklung des Multiplex-CBA für humanpathogene Arboviren war es erstmals möglich Einzelinfektionen in solch einem Umfang nachzuweisen. Dabei ist das Vorkommen von Mehrfachinfektionen gleichsam erstaunlich, wie ebenfalls alarmierend. Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten stammen aus der Region rund um den Schwarzwald (Oberrheintal) und waren die letzten drei Jahre nicht im Mittelmeerraum im Urlaub (Meyer-König et al., 2014 in preparation). Demnach kommen solche arboviralen Infektionen mittlerweile in Deutschland vor und müssen in Zukunft bei aseptischer Meningoenzephalitis mit berücksichtigt werden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein zytometrisches Kugel-Test-Verfahren (englisch: *Cytometric-Bead-Array* „CBA“) als serologischer Simultannachweis (Multiplex-Test) von Antikörpern gegen ein Spektrum von 15 durch Zecken, Stechmücken und Sandmücken übertragene europäische humanpathogene Arboviren entwickelt.

Bei diesem auf Beads basierenden Flüssigphasen-Immunsorptionstest wurden 15 rekombinante virale Proteine: Nukleoprotein N der Bunyaviren, Nichtstrukturprotein NS1 der Flaviviren und die Oberflächenproteine VP6 bzw. VP7 der Reoviren mit antigenen Eigenschaften exprimiert, gereinigt, quantifiziert und an magnetische Beads gekoppelt. Des Weiteren wurden zwei interne CBA-Kontrollen (BSA-Kontrolle: Nachweis unspezifischer Hintergrundreaktion, *E. coli*-Kontrolle: Nachweis intrinsisch erhöhter *E. coli* Antikörpertiter) entwickelt, die schnell und verlässlich Hinweise auf falsch positive Ergebnisse geben konnten. Die Messungen erfolgten durch Fluoreszenzdetektion am MAGPIX™-System.

Als Kontrolltest wurde parallel ein Immunfluoreszenztest (IFT) aufgebaut um so die zur Verfügung gestellten sehr seltenen Positivseren zu bestätigen. Die CBA-Austestung der Positivseren ergab eine optimale Serenverdünnung für den Multiplex-Test von 1:200, hier lag jeder Antikörpernachweis in seinem dynamischen Testbereich.

Die bei den Arboviren bekannten Kreuzreaktionen zeigten sich auch im CBA. In Folge war es möglich bei fünf Arboviren (BATV, ERVEV, EYAV, UUKV, TRBV) eine eindeutige serologische Diagnose zu stellen und die Viren als Krankheitsursache zu bestimmen. Bei den restlichen zehn Arboviren war, bedingt durch die Kreuzreaktionen, eine Eingrenzung auf je zwei Viren (BHAV/PALV, INKV/TAHV, TBEV/WNV, SFNV/TOSV, SFSV/SFTV) als Krankheitsursache möglich.

Basierend auf der Messung von 45 gut charakterisierten humanen Negativseren wurde ein Grenzwert je Virus bestimmt und der Multiplex-CBA mit Patientenseren evaluiert.

Von 111 Patienten (mit aseptischen Meningitis oder aseptischen Meningoenzephalitis Symptomen) konnte der Multiplex-CBA bei 42 Patienten (38%) einen Hinweis auf eine vorliegende virale Infektion liefern. Es konnte durch IgM-Antikörper und IgG-Antikörper Messungen zwischen dem Verdacht auf eine akute Infektion (bei 31 Patienten = 28%)

und dem Verdacht auf eine Wochen oder Monate zurückliegende Infektion (bei 11 Patienten = 10%) unterschieden werden.

Die Reproduzierbarkeit der Multiplex-CBA Ergebnisse lag bei 91% (IgG-Antikörper-Detektion) und bei 77% (IgM-Antikörper-Detektion).

Der entwickelte Multiplex-CBA spart wertvolle Zeit im Labor durch den simultanen Antikörpernachweis und benötigt nur ein sehr geringes Probenvolumen. Sind die Proteinbeads erst einmal gekoppelt sind diese mindestens ein Jahr haltbar und liefern bei gleichbleibender Qualität der Proben identische Fluoreszenzsignale.

Der Multiplex-CBA hat das Potential, erfolgreich als Labor-Standard für die Diagnostik von aseptischen Meningoenzephalitiden etabliert zu werden. Die Verwendung des neu entwickelten Multiplex-CBAs erlaubt eine Eingrenzung eines Pathogens und gibt Aufschluss darüber, ob eine akute oder eine bereits zurückliegende arbovirale Infektion vorliegt. Durch die Identifizierung akuter arboviraler Infektionen könnte der Krankheitsverlauf und die Epidemiologie einzelner europäischer Arboviruskrankungen genauer beschrieben werden.

Ferner könnte der Multiplex-CBA klären, welchen Anteil einzelne europäische Arboviruskrankungen an den bis zu 50% ungeklärten aseptischen Meningoenzephalitiden in Europa haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum Teil erstmals zurückliegende Infektionen (IgM negativ / IgG positiv) mit EYAV, TRBV, INKV/TAHV, SFNV/TOSV und akute Infektionen (IgM positiv / IgG negativ oder IgM positiv / IgG positiv) mit EYAV, TRBV, ERVEV, TBEV, WNV, INKV/TAHV, BHAV/PALV, SFSV/SFTV, SFNV/TOSV bei Patienten mit aseptischer Meningoenzephalitis aus Südwest-Deutschland nachgewiesen.

Es konnten somit erstmals in solch einem Umfang Patientenserien getestet werden und so gezeigt werden, dass in Südwest-Deutschland neben Zecken und Stechmücken auch Sandmücken als Virusüberträger fungieren und diese damit eine Gefahr für das Auftreten von Meningitis- und Enzephalitisfällen darstellen.

Eine zunehmende Verbreitung virusübertragender Vektoren mit Ausdehnung nach Norden ist, wahrscheinlich auf Grund der Klimaerwärmung, bereits eingetreten, sodass bei dem klinischen Verdacht auf aseptische Meningitis diese europäischen Arboviren in der Routinediagnostik mit zu berücksichtigen sind.

6 Anhang

6.1 Zusammenfassung: Sequenzanalyse Lasergene™

6.1.1 Sequenzanalyse aller rekombinanten Donorplasmide (Strategy View)

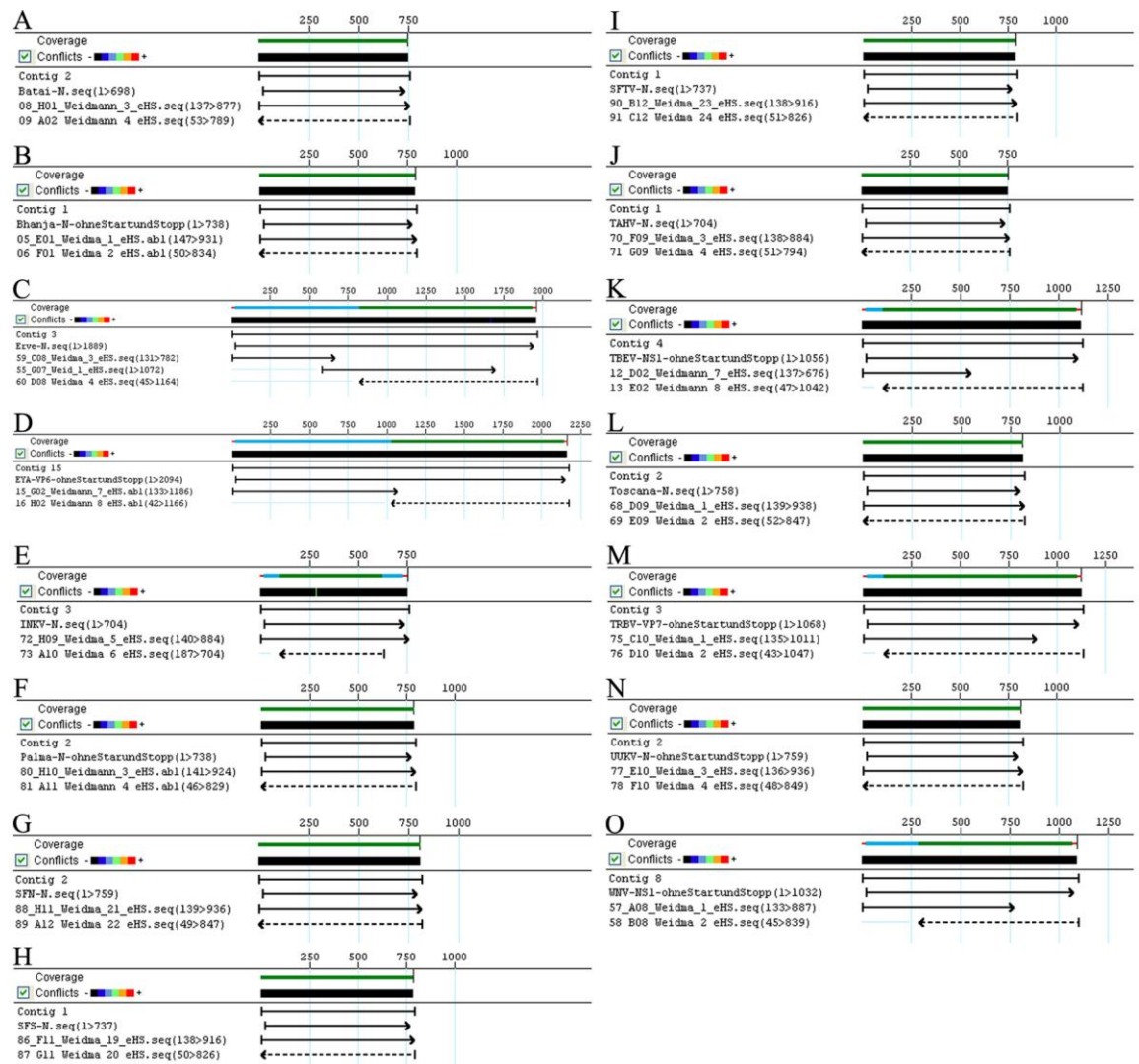


Abb. 6.1: Sequenzanalyse aller hergestellten rekombinanten Donorplasmide. A: BATV-N-pENTRY-IBA51#1, B: BHAV-N-pENTRY-IBA51#2, C: ERVEV-N-pENTRY-IBA51#4b die Sequenzanalyse zeigt eine Punktmutation von Prolin (CCC) zu Serin (TCC), D: EYAV-VP6-pENTRY-IBA51#8, E: INKV-N-pENTRY-IBA51#2 die Sequenzanalyse zeigt eine Punktmutation von Asparagin (AAC) zu Serin (AGC), F: PALV-N-pENTRY-IBA51#3, G: SFNV-N-pENTRY-IBA51#2, H: SFSV-N-pENTRY-IBA51#1, I: SFTV-N-pENTRY-IBA51#1, J: TAHV-N-pENTRY-IBA51#1, K: TBEV-NS1-pENTRY-IBA51#2, L: TOSV-N-pENTRY-IBA51#1, M: TRBV-VP7-pENTRY-IBA51#2, N: UUKV-N-pENTRY-IBA51#3, O: WNV-NS1-pENTRY-IBA51#2. (Software:Lasergene™)

6.1.2 Beispiel: BATV-N-pENTRY (Alignment)

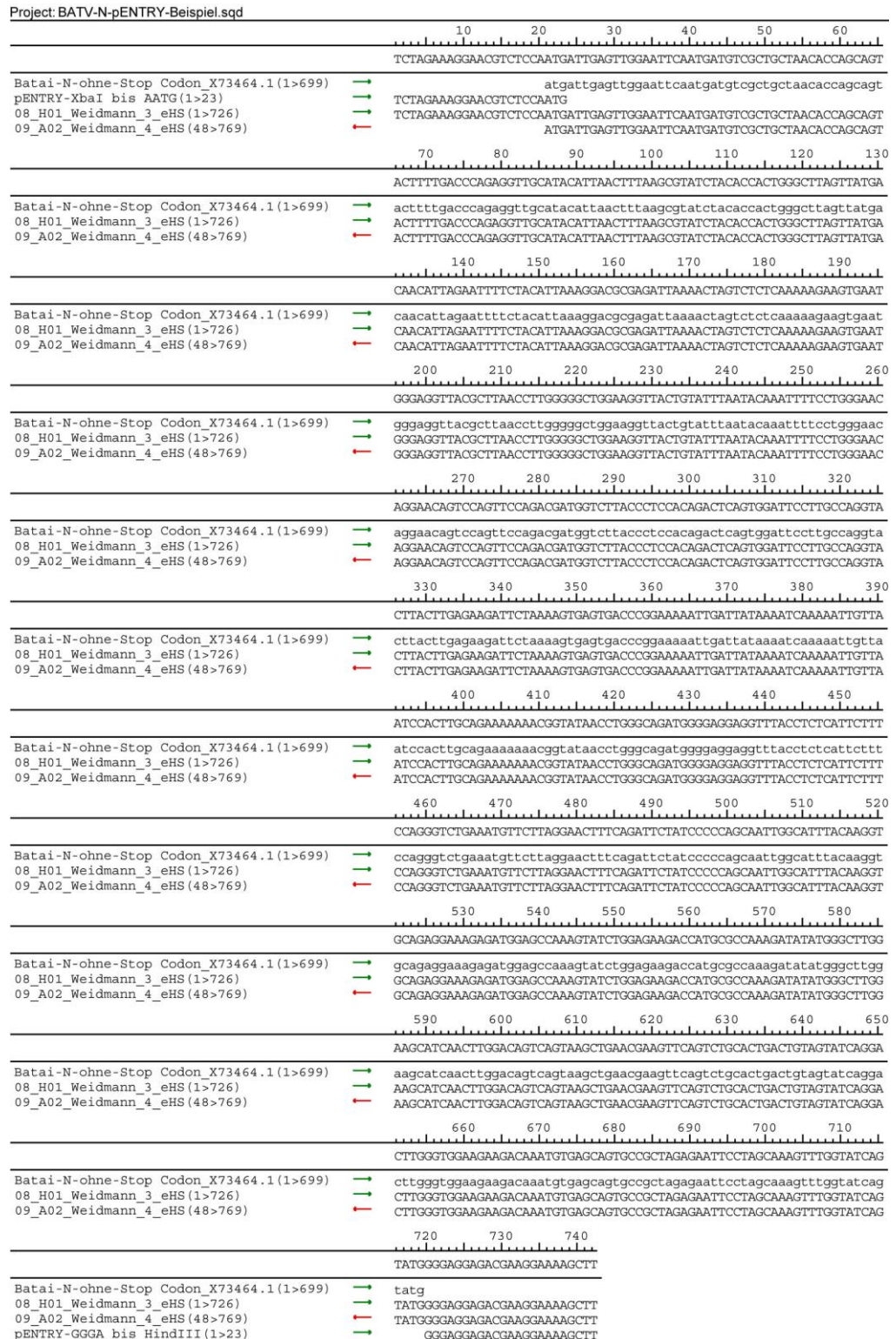


Abb. 6.2: Sequenzanalyse von BATV-N. Vergleich BATV-N-pENTRY-IBA51-#1 (08 Sequenzierung mit Vorwärts-Primer und 09 mit Rückwärtsprimer) mit der Referenzsequenz der Datenbank und den flankierenden pENTRY-Sequenzen (Software: Lasergene™).

6.2 Zusammenfassung: Ergebnisse CBA Präadsorptions-Test

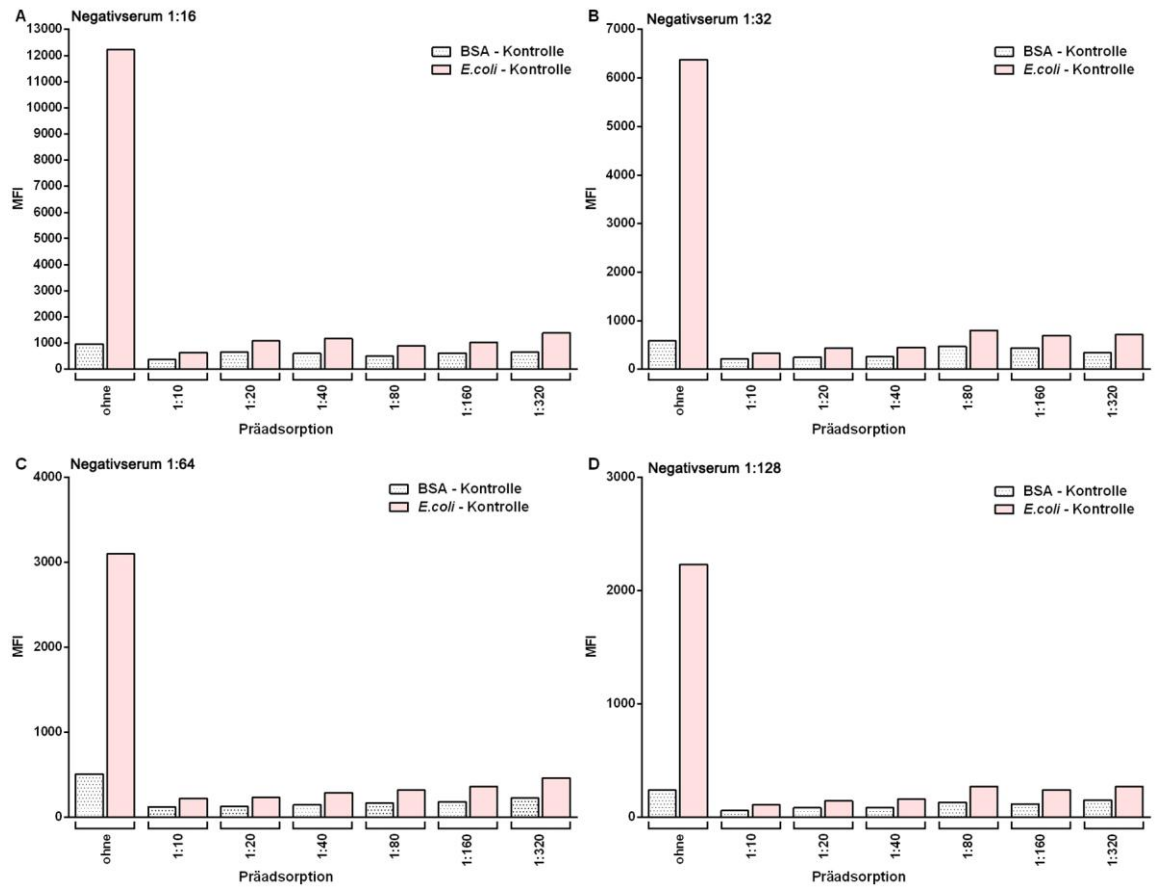


Abb. 6.3: Graphische Darstellung des Präadsorptions-Tests mit *E. coli* Lysat. **A:** Negativserum Verdünnung 1:16 mit und ohne Präadsorption mit *E. coli* Lysat, **B:** Negativserum Verdünnung 1:32 mit und ohne Präadsorption mit *E. coli* Lysat, **C:** Negativserum Verdünnung 1:64 mit und ohne Präadsorption mit *E. coli* Lysat, **D:** Negativserum Verdünnung 1:128 mit und ohne Präadsorption mit *E. coli* Lysat (Software: GraphPad Prism 6).

6.3 Zusammenfassung: Ergebnisse CBA Sensitivitätstest

6.3.1 MFI (PE) aller Sensitivitätstests, IgG-Antikörper, n=3 (Daten)

Tabelle 6.1: Daten (MFI) nach Messung verschiedener Verdünnungen aller Positiven

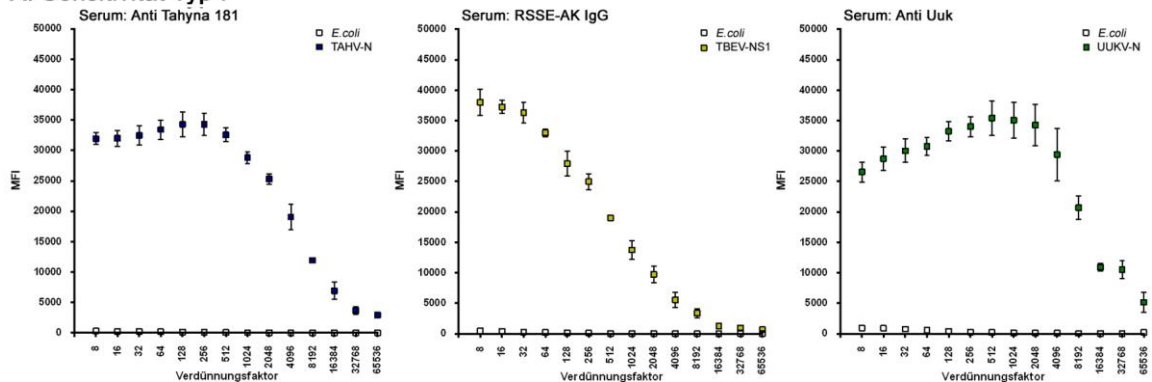
		Verdünnung													
		1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384	1:32768	1:65536
Anti-TAHYNA 181	n=1	31970	33407	34057	34681	36024	35783	32213	28983	23935	15277	11184	5159	2574	2652
		302	294	280	218	114	141	79	55	49	36	27	26	54	
(Für: TAHV-N)	n=2	33638	33254	34057	35344	36581	36438	34702	30405	26794	22518	12519	9834	4783	3241
		430	358	326	246	234	190	170	82	74	61	57	38	44	
	n=3	30312	29316	29343	30310	30296	30622	30769	27076	25265	19458	12179	5872	3735	2886
		254	181	124	144	115	71	45	48	32	23	18	22	29	30
RSSE-AK IgG	n=1	36209	36220	39084	34112	29747	25326	18822	13282	9434	5085	2853	1161	959	636
		362	379	337	226	158	99	27	48	38	24	24	20	16	22
(Für: TBEV-NS1)	n=2	42293	39425	36599	32689	23866	22558	19275	11310	7489	3735	2336	817	636	578
		249	92	110	78	60	55	44	35	41	33	27	30	29	31
	n=3	35597	36157	33202	32160	30236	27091	19032	16682	12309	7885	4890	1708	1348	840
		800	794	416	349	265	192	88	53	54	41	37	38	27	29
Anti Uuk	n=1	25640	29332	30917	29284	34015	32414	33451	31753	31136	23418	23040	10443	7961	4611
		1024	996	828	642	492	314	211	129	122	60	64	49	33	26
(Für: UUKV-N)	n=2	24265	25193	26373	29345	30328	32335	31816	32446	30618	27182	16897	10201	10492	2557
		903	894	741	564	379	279	181	129	109	78	61	41	45	525
	n=3	29773	31767	32863	33683	35462	37310	41023	41000	41120	37725	22192	12139	13101	8289
		917	794	662	461	360	287	208	146	125	94	54	48	54	91

		Verdünnung														
		1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384	1:32768	1:65536	
Anti-Eyach	n=1	33587	33865	33792	33909	32756	30042	23402	14587	10290	6592	3866	1728	1206	621	
	n=2	30678	32987	31572	31470	30984	28655	19622	12338	10433	6426	4011	2110	1129	705	
(Für: EYAV-VP6)	n=3	29991	30570	30498	29891	29230	26478	21122	11565	8165	7159	3288	1869	1104	672	
Anti-Bhanja	n=1	258	191	143	114	75	56	46	39	39	39	31	33	27	31	
	n=2	21632	22786	25057	23399	18229	12647	8556	4376	3280	1731	974	420	322	158	
(Für: BHAN-N)	n=3	33701	35066	28210	28920	22218	10456	9434	4115	3618	1428	511	298	317	165	
Anti-Palma M4746	n=1	39173	39478	42516	45755	45863	51324	45176	29839	29151	16214	10818	5940	3376	2145	
	n=2	39758	43886	48134	46284	47115	45168	41579	28555	19368	12228	6201	3776	1962	1326	
(Für: PALV-N)	n=3	40612	44214	46562	44906	39447	40895	33952	25889	12377	10530	4636	2740	1389	1091	
Anti-TAHYNA 181	n=1	26549	25949	25025	26843	26837	26136	25564	21935	17396	12282	5042	2638	2448	1512	
	n=2	25811	25102	25466	26139	26899	26986	25646	22114	17722	11060	6382	3847	2368	1259	
(Für: INKV-N)	n=3	29734	29024	29352	29103	30317	30074	29322	23950	17964	10296	8488	3231	3081	2268	
S18	n=1	32288	32213	30097	22179	18915	10305	7515	5220	2604	1182	587	249	217	136	
	n=2	21804	29818	29418	22609	19137	11972	7793	5335	3117	1424	884	411	270	208	
(Für: SFSV-N)	n=3	30638	30184	28289	1058	18104	13873	7798	4729	2636	1325	763	426	209	163	
SCI	n=1	41285	43840	42228	41929	36418	29239	22365	14714	6917	3167	2487	2055	1028	314	
	n=2	38950	38050	38936	37222	33442	21076	17983	8122	6047	2897	1428	792	719	254	
(Für: SFTV-N)	n=3	38956	37515	38316	35353	25787	20648	14605	6517	3920	1510	805	681	290	243	
Anti-Erve	n=1	19160	15305	13182	11390	8223	5629	3146	1806	631	554	298	119	116	73	
	n=2	18580	16940	15344	11294	8227	6074	3378	1635	1029	559	294	163	99	78	
(Für: ERVEV-N)	n=3	29553	27591	26698	23496	19849	15129	6632	5798	3453	1986	1064	387	341	213	
West Nil MIAF MG61369	n=1	16619	14440	9497	5915	5384	2351	1856	1136	558	392	126	87	67	53	
	n=2	17756	14809	11066	9015	6542	3698	2585	1431	830	102	260	136	105	65	
(Für: WNV-NS1)	n=3	18332	13265	11627	8978	6977	3975	2945	1341	985	378	335	140	79	69	
Anti-Calovo	n=1	14124	11640	10169	7023	6531	5080	3525	2422	1419	740	424	287	186	196	
	n=2	14687	11074	10032	8153	6557	5164	4046	2947	2013	955	767	358	218	208	
(Für: BATV-N)	n=3	9987	7658	5479	3594	3127	2073	1040	736	373	191	176	75	84	60	
Anti-Tribec	n=1	13929	10340	4495	5966	3950	2505	2063	1206	688	388	151	137	88	108	
	n=2	4438	6615	3550	4186	2936	1726	1707	710	491	280	160	118	128	87	
(Für: TRBV-VP7)	n=3	8627	4515	3162	2481	1027	1263	671	381	388	116	87	79	42	71	
T06	n=1	31296	20522	16369	11431	7139	3823	1961	1009	625	307	177	103	48	38	
	n=2	28476	18864	13984	11420	4895	2704	1844	874	372	220	105	109	29	23	
(Für: TOSV-N)	n=3	26232	17699	12692	9811	3873	1910	1163	755	257	135	86	52	23	30	
Nap1	n=1	14174	12556	6225	3271	2047	1182	532	171	155	83	31	26	18	24	
	n=2	21750	13479	8023	5462	3291	1971	1108	367	188	112	75	34	27	29	
	n=3	22737	14982	9459	5420	2740	1667	1004	546	243	162	64	38	29	37	

MFI (Proteinbead)
MFI (E.coli-Kontrolle)

6.3.2 Einzeldarstellung Sensitivität Typ I und Typ II (GraphPad Prism 6)

A: Sensitivität Typ I



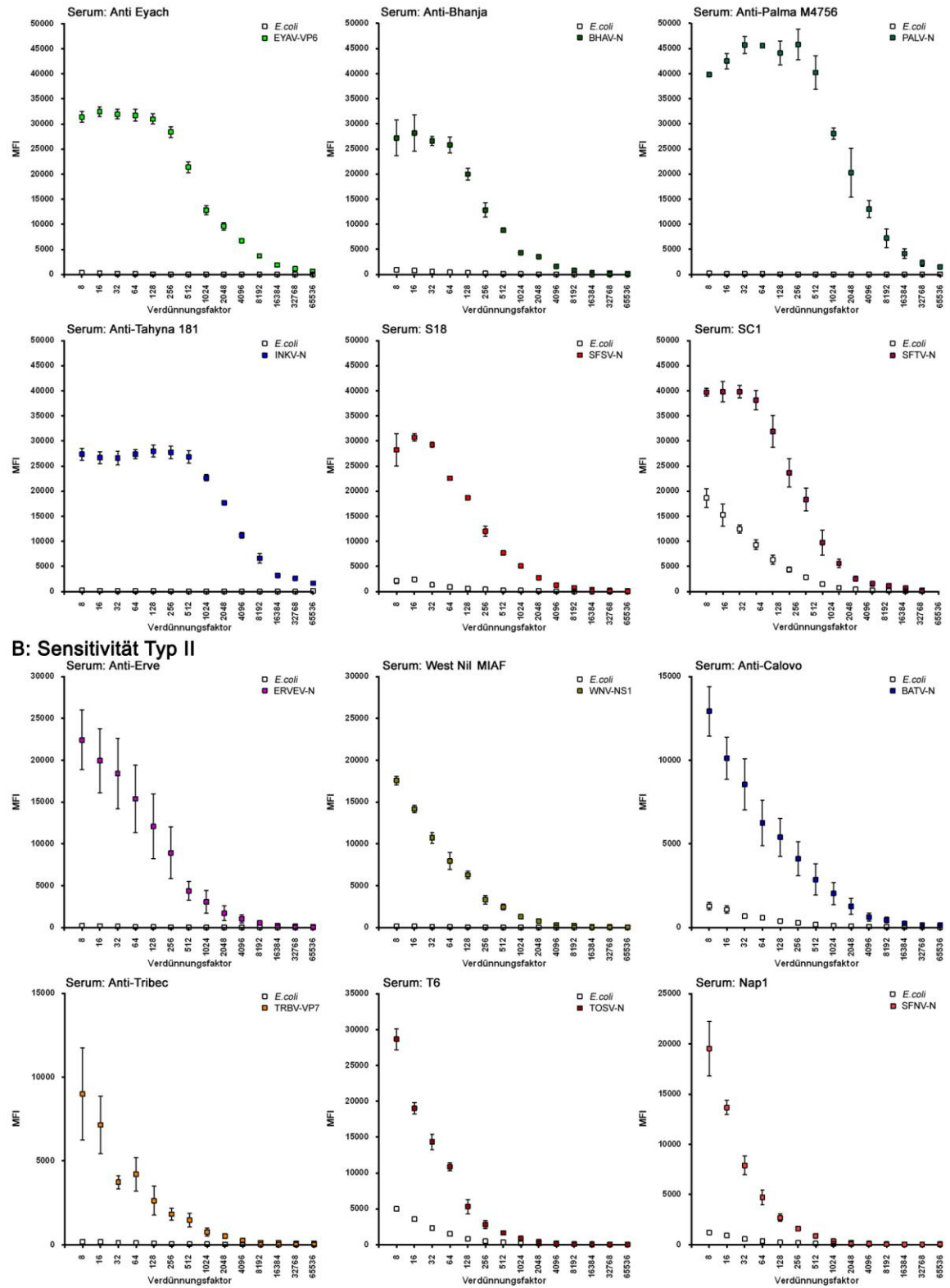


Abb. 6.4: Sensitivitätsmessungen aller Positivseren (IgG). Dargestellt sind die MFI aller Positivseren, jeweils als CBA getestet mit der zugehörigen gekoppelten Beadpopulation und der *E. coli*- Kontrolle. Typ I zeigt sigmoiden Kurvenverlauf, Typ II zeigt linearen Kurvenverlauf. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen $n=3$ und die daraus resultierenden Fehlerbalken (Software: GraphPad Prism 6).

6.4 Zusammenfassung: Ergebnisse Multiplex-CBA Kreuzreaktivitätstest

6.4.1 MFI (PE) aller Kreuzreaktivitätstests, IgG-Antikörper, n=3 (Daten)

Tabelle 6.2: Daten (MFI) nach Messung aller Positivseren als Multiplex-CBA (IgG)

Positivserum	BP26- UUKV	BP27- SFNV	BP29- SFSV	BP34- INKV	BP35- ERVV	BP36- TRBV	BP37- BHAV	BP42- BSA	BP44- BATV	BP46- TAHV	BP52- TRBV	BP53- PALV	BP54- TOSV	BP55- EYAV	BP52- WNV	BP63- SFTV	BP65- E.coli
Anti-Calvo (Batai Virus)	122	105	151	724	430	350	72	131	3823	768	1006	52	60	91	342	124	89
Anti-Bhanja (Bhanja Virus)	166	92	280	488	904	532	27261	243	1143	199	1935	32145	429	249	551	173	122
Anti-Live (Erve Virus)	1446	524	798	951	20559	439	521	2209	1999	462	8290	713	245	180	352	288	117
Anti-Eyach (Eyach Virus)	154	416	105	287	92	64	52	50	75	126	700	52	146	26204	59	68	49
Anti-Palma M4756 (Palma Virus)	269	74	107	147	54	63	39296	88	126	53	239	44830	640	46	65	61	57
Nap1 (SFN Virus)	152	5471	602	354	485	255	885	106	305	824	577	1095	3637	1821	188	606	136
S18 (SFS Virus)	167	1186	26197	624	1042	253	211	252	458	1356	741	222	904	1506	88	34798	168
SCI (SFT Virus)	721	687	29961	3590	3001	1076	826	1287	2723	828	2308	360	1787	1512	39069	2114	3271
Anti-Tahyna 181 (Tahyna+Inkoo Virus)	99	97	69	28643	83	86	44	42	124	29114	188	27	34	65	67	131	40
RSSe-AK IgG (TBE Virus)	352	380	255	265	167	30083	743	109	299	140	1263	317	86	105	1669	199	94
T6 (Toscana Virus)	1150	4719	320	387	369	248	422	228	310	220	528	487	6618	2240	230	158	416
Anti-Tribec (Tribec Virus)	2236	131	63	122	44	37	1085	75	80	114	1693	1323	33	211	48	92	34
Anti-Uuk (Uukunemi Virus)	117	73	35	39	54	18058	33	27	39	41	103	35	1507	51	3847	45	32
West Nil MIAF (West Nil Virus)	344	185	129	204	390	19908	92	178	176	112	418	75	3747	136	9343	144	112
	1658	724	470	1097	2082	29497	392	663	741	480	2545	302	1661	536	27247	594	417

6.4.2 Kreuzreaktivitätstest mit erwarteten Kreuzreaktionen (GraphPad Prism 6)

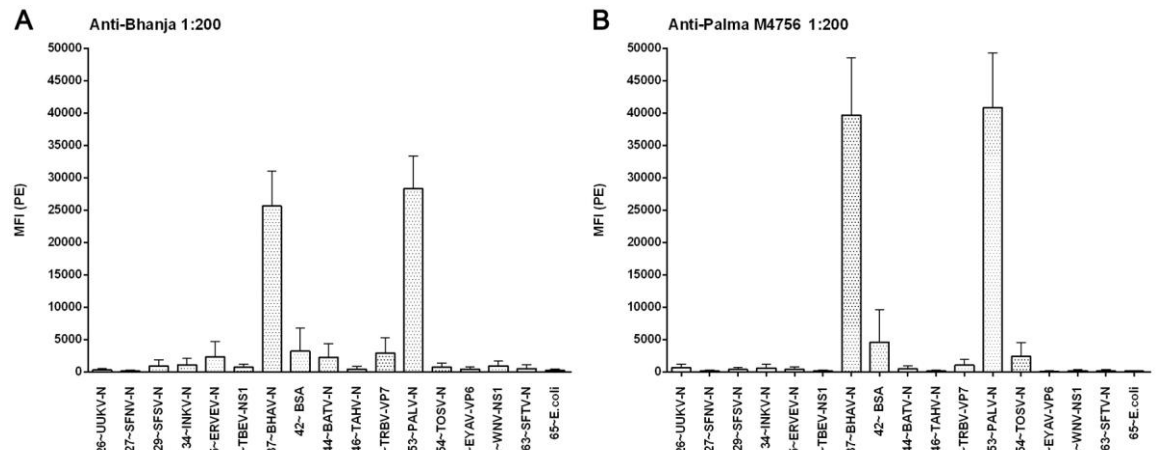


Abb. 6.5: Kreuzreaktivitätstest Multiplex-CBA für BHAV- und PALV-Positivserum (IgG). Dargestellt sind die MFI jeder gekoppelten Beadpopulation gemessen als Multiplex-CBA. A: Positivserum BHAV (Anti-Bhanja) 1:200, n=3. B: Positivserum PALV (Anti-Palma M4756) 1:200, n=3 (Software: GraphPad Prism 6).

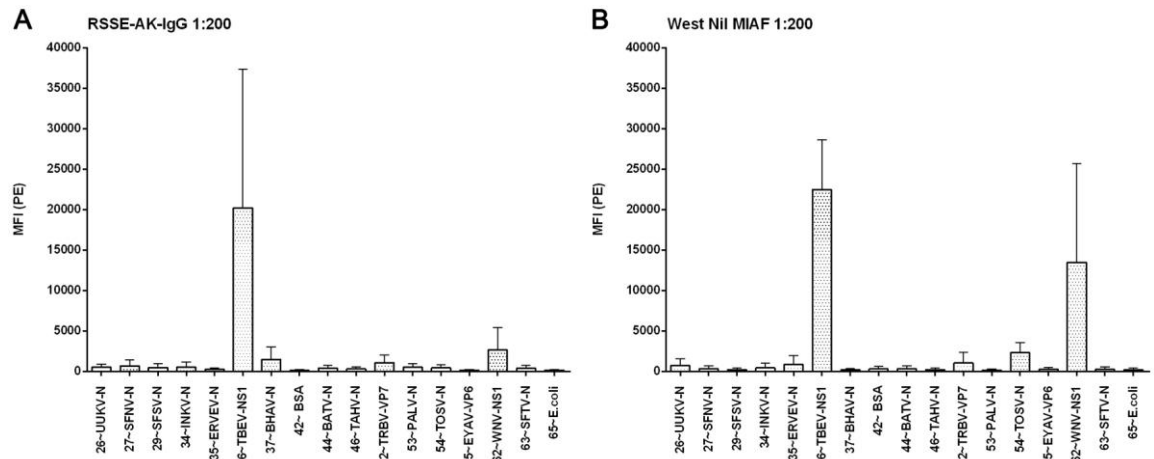


Abb. 6.6: Kreuzreaktivitätstest Multiplex-CBA für TBEV- und WNV-Positivserum (IgG). Dargestellt sind die MFI jeder gekoppelten Beidpopulation gemessen als Multiplex-CBA. **A:** Positivserum TBEV (RSSE-AK-IgG) 1:200, n=3. **B:** Positivserum WNV (West Nil MIAF) 1:200, n=3 (Software: GraphPad Prism 6).

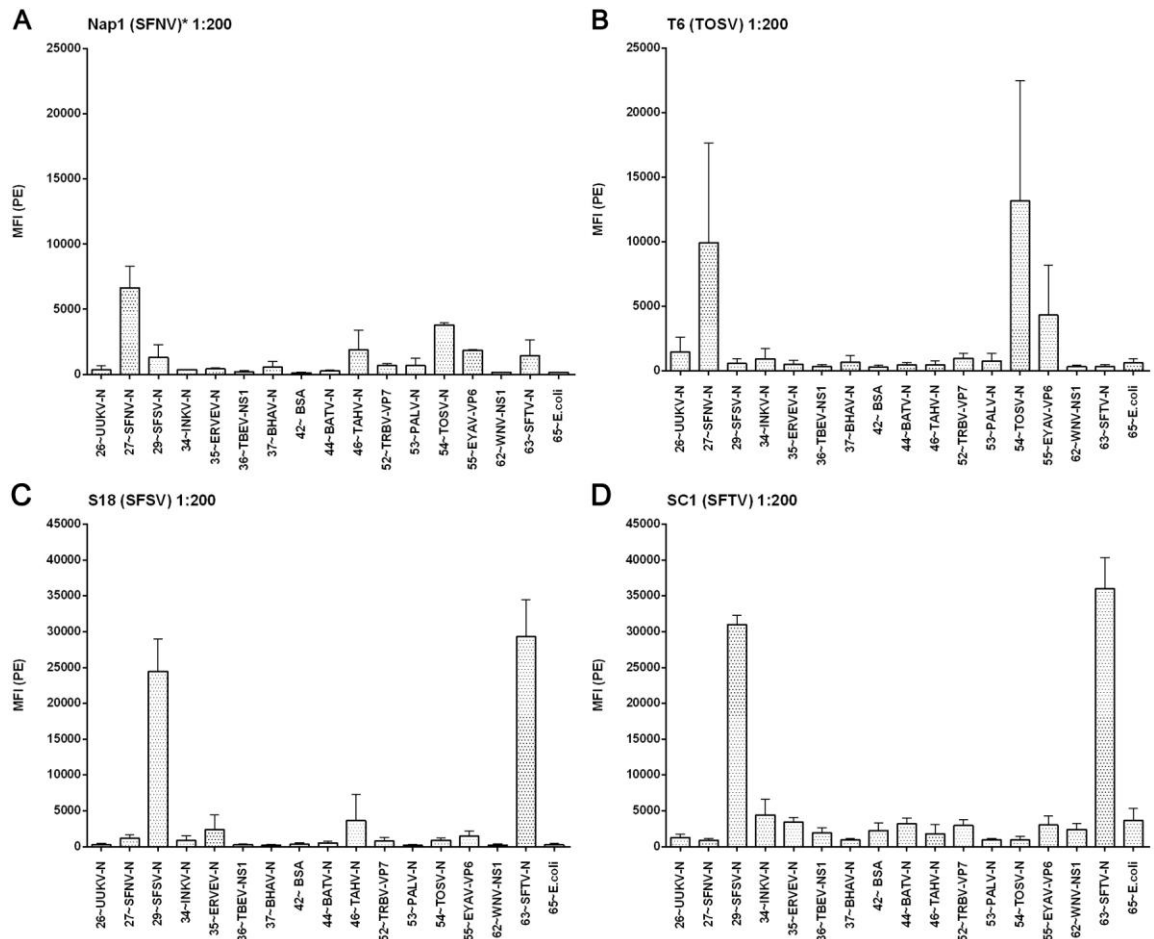


Abb. 6.7: Kreuzreaktivitätstest Multiplex-CBA für SFNV-, TOSV-, SFSV-, und SFTV-Positivserum (IgG). Dargestellt sind die MFI jeder gekoppelten Beidpopulation gemessen als Multiplex-CBA. **A:** Positivserum SFNV (Nap1) 1:200, *n=2. **B:** Positivserum TOSV (T6) 1:200, n=3. **C:** Positivserum SFSV (S18) 1:200, n=3. **D:** Positivserum SFTV (SC1) 1:200, n=3 (Software: GraphPad Prism 6).

6.4.3 Kreuzreaktivitätstest ohne Kreuzreaktion (GraphPad Prism 6)

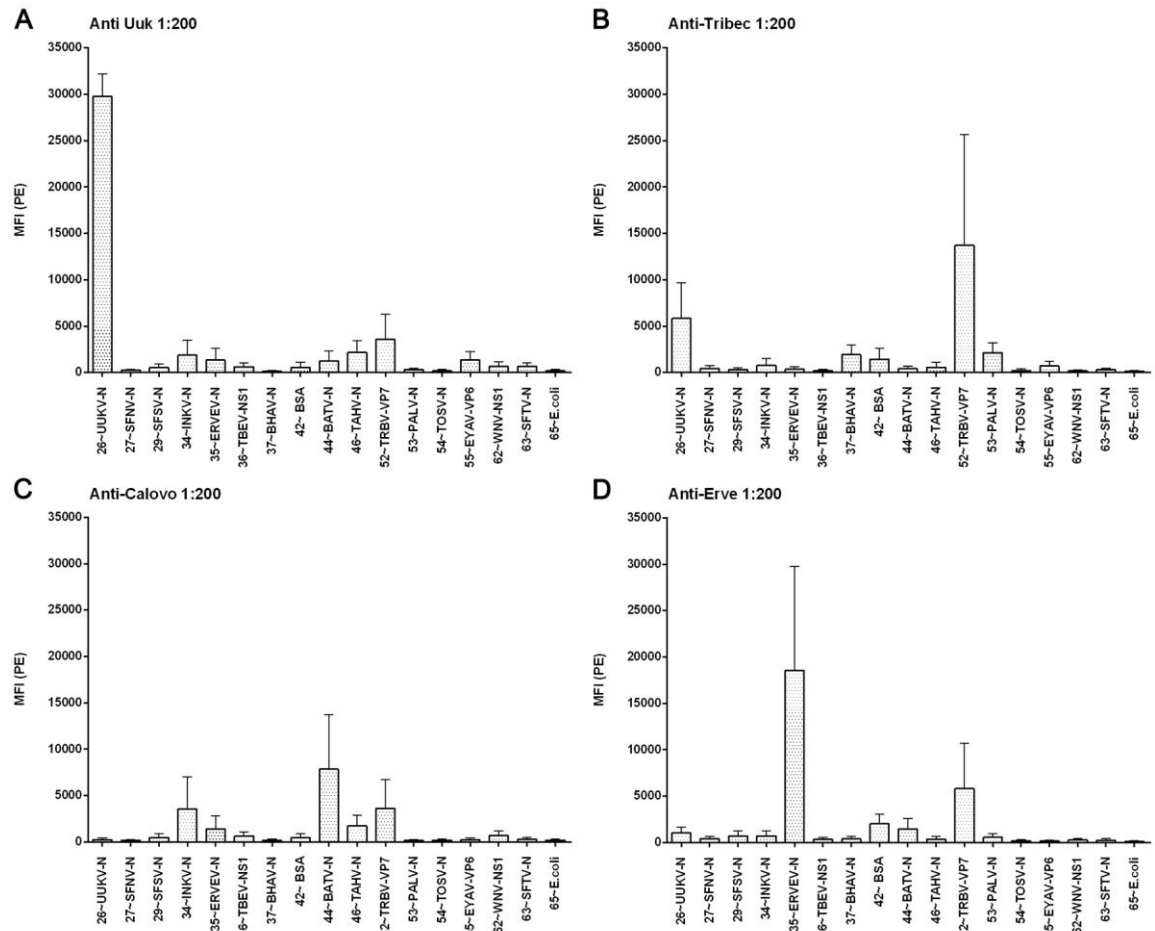


Abb. 6.8: Kreuzreaktivitätstest Multiplex-CBA für UUKV-, TRBV-, BATV- und ERVEV-Positivserum (IgG). Dargestellt sind die MFI jeder gekoppelten Beadpopulation gemessen als Multiplex-CBA. **A:** Positivserum UUKV (Anti-Uuk) 1:200, n=3. **B:** Positivserum TRBV (Anti-Tribec) 1:200, n=3. **C:** Positivserum BATV (Anti-Calovo) 1:200, n=3. **D:** Positivserum ERVEV (Anti-Erve) 1:200, n=3 (Software: GraphPad Prism 6).

6.5.3 Zusammenfassung: Grenzwertberechnung IgG und IgM

Tabelle 6.5: Grenzwertberechnung Methode (A) und (B) IgG-Antikörper

Table with 18 columns (BP26-UIUKV to BP65-E.coff) and 6 rows (A) MW je BD, SD je BP, f [P*(1+1/n)], f [P*(1+1/n)], (B) IgG: MW + SD*f, and a legend for MW, SD, n, t, and f.

Tabelle 6.6: Grenzwertberechnung Methode (A) und (B) IgM-Antikörper

Table with 18 columns (BP26-UIUKV to BP65-E.coff) and 6 rows (A) MW je BD, SD je BP, f [P*(1+1/n)], f [P*(1+1/n)], (B) IgM: MW + SD*f, and a legend for MW, SD, n, t, and f.

6.6 Zusammenfassung: Ergebnisse Multiplex-CBA Patientenproben

6.6.1 MFI (PE) Patientenproben IgG n=1 (Daten)

Tabelle 6.7: Daten (MFI) nach Messung von 111 Patientenseren, Multiplex-CBA (IgG)

Table with 18 columns (BP26-UIUKV to BP65-E.coff) and 111 rows of patient data (Serumnr. to 5842977).

Table with 11 columns and 100 rows of numerical data. Rows are numbered 584407 to 127983. Many cells contain numerical values, some are highlighted in red.

6.6.2 MFI (PE) Patientenproben IgM n=1 (Daten)

Tabelle 6.8: Daten (MFI) nach Messung von 111 Patientenseren, Multiplex-CBA (IgM)

Table with 20 columns and 111 rows. Columns include patient ID (Serumnr.), various test codes (BP26-LUKV to BP65-E.coif), and MFI values. The header row is detailed, and the body contains 111 rows of data.

Tabelle 6.10: Daten (MFI) nach Messung aller Proben der sechs Patienten* (IgM)

Table with columns for patient ID (e.g., 569420, 561616), measurement type (n=1, n=2), and various assay codes (BP26-UIUKV to BP65-E.ocol). It contains MFI values for each patient and measurement.

6.6.4 Bestätigung seropositiver Patientenproben auf arbovirale IgG-Antikörper durch Mehrfachmessung (Daten)

Tabelle 6.11: Daten (MFI) nach Messung IgG positiver Patientenproben n=3 (IgG)

Table with columns for patient ID (e.g., 482163, 528149), measurement type (n=1, n=2, n=3), and various assay codes (BP26-UIUKV to BP65-E.ocol). It contains MFI values for each patient and measurement.

6.6.6 Graphische Darstellung Patientenseren Fall 2 (GraphPad Prism 6)

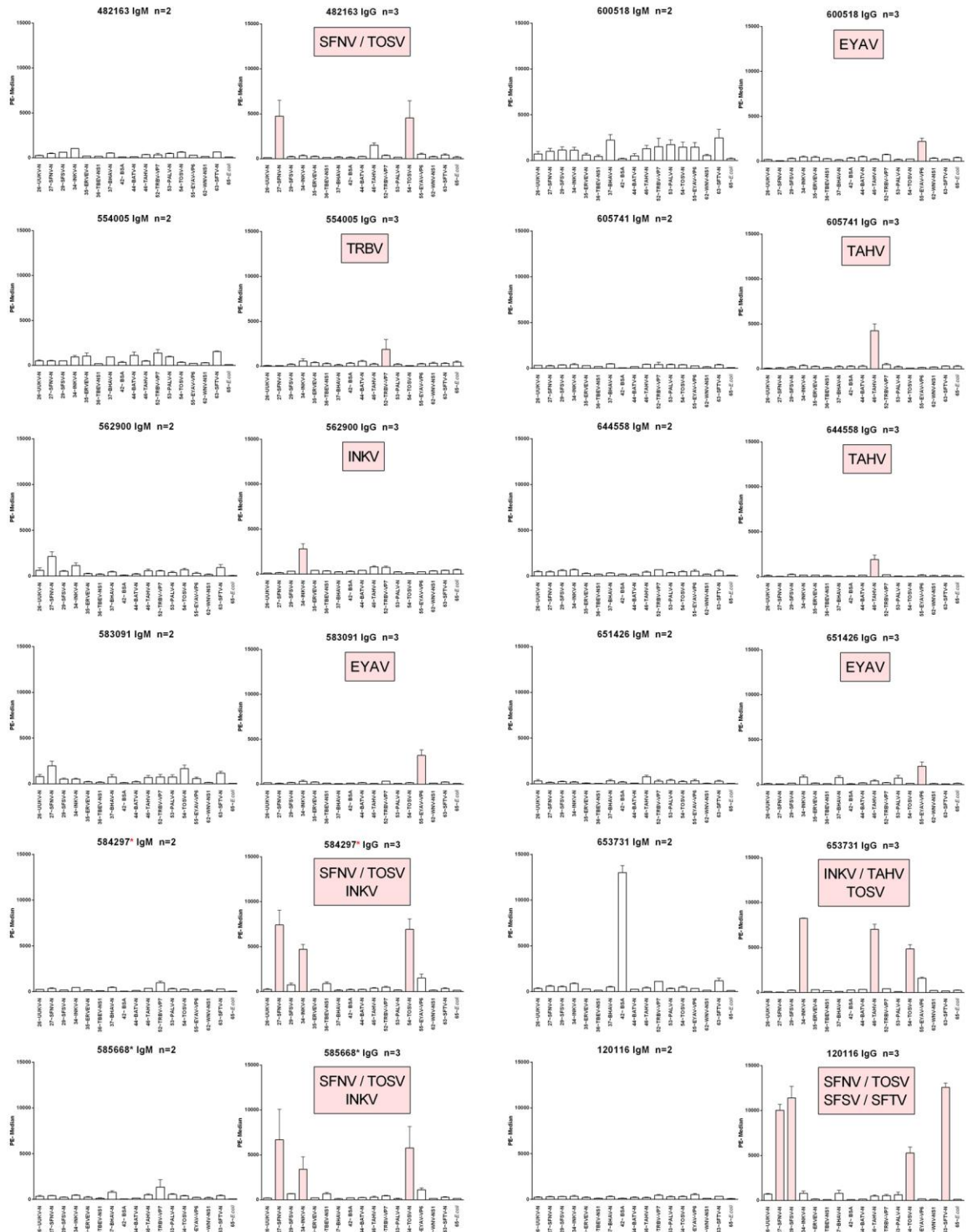


Abb. 6.9: Multiplex-CBA, Seren Fall 2 (IgM -, IgG +). Dargestellt sind die MFI jeder Beadpopulation gemessen als Multiplex-CBA (Software: GraphPad Prism 6). Bei den mit * gekennzeichneten Seren handelt es sich um eine Person, von der eine weitere Probe zur Untersuchung vorlag.

6.6.7 Graphische Darstellung Patientenseren Fall 3 (GraphPad Prism 6)

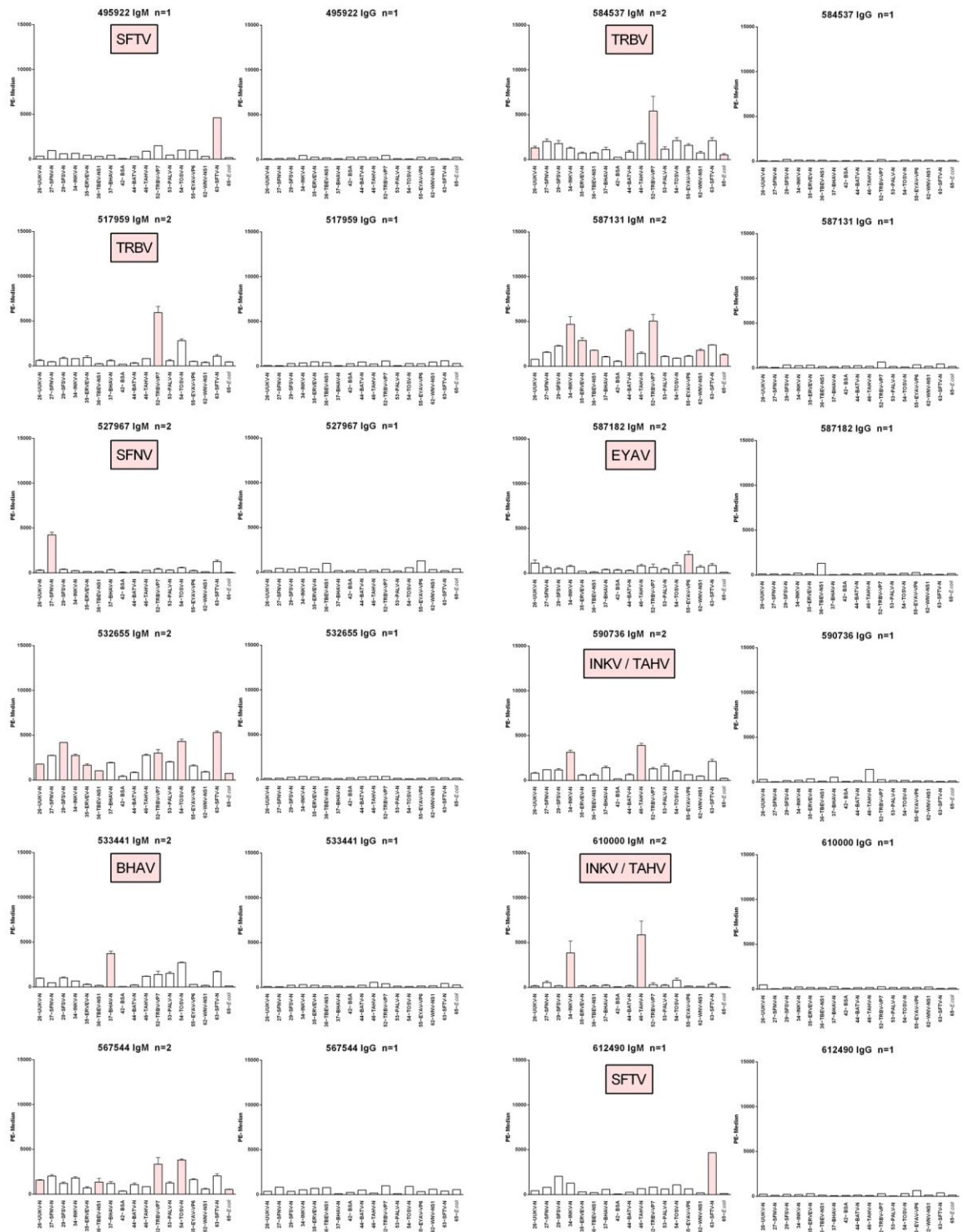


Abb. 6.10: Multiplex-CBA, Seren Fall 3 (IgM +, IgG -), Teil 1 von 2. Dargestellt sind die MFI jeder Beadpopulation gemessen als Multiplex-CBA (Software: GraphPad Prism 6).

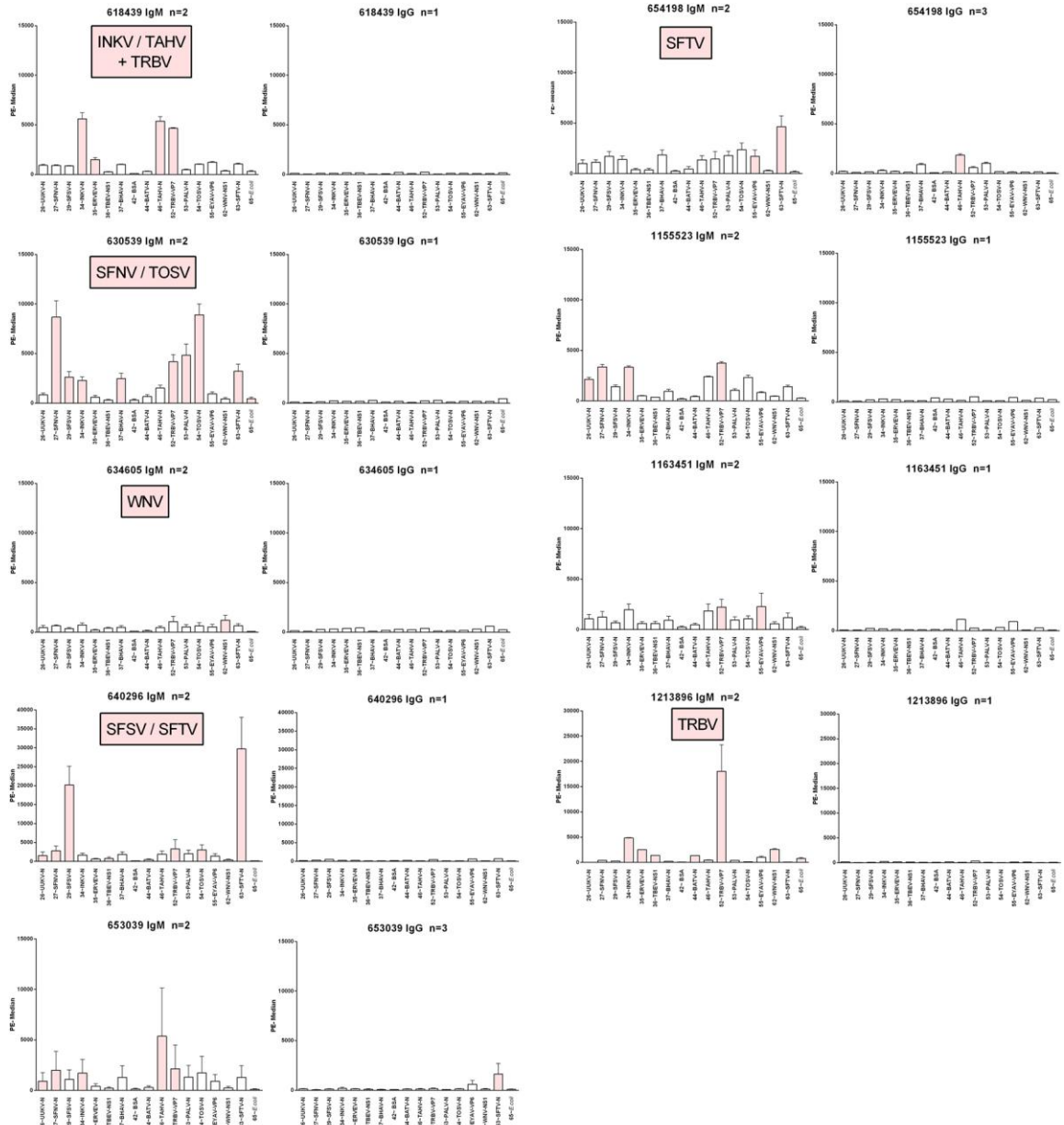


Abb. 6.11: Multiplex-CBA, Seren Fall 3 (IgM +, IgG -), Teil 2 von 2. Dargestellt sind die MFI jeder Beadpopulation gemessen als Multiplex-CBA (Software: GraphPad Prism 6).

6.6.8 Graphische Darstellung Patientenseren Fall 4 (GraphPad Prism 6)

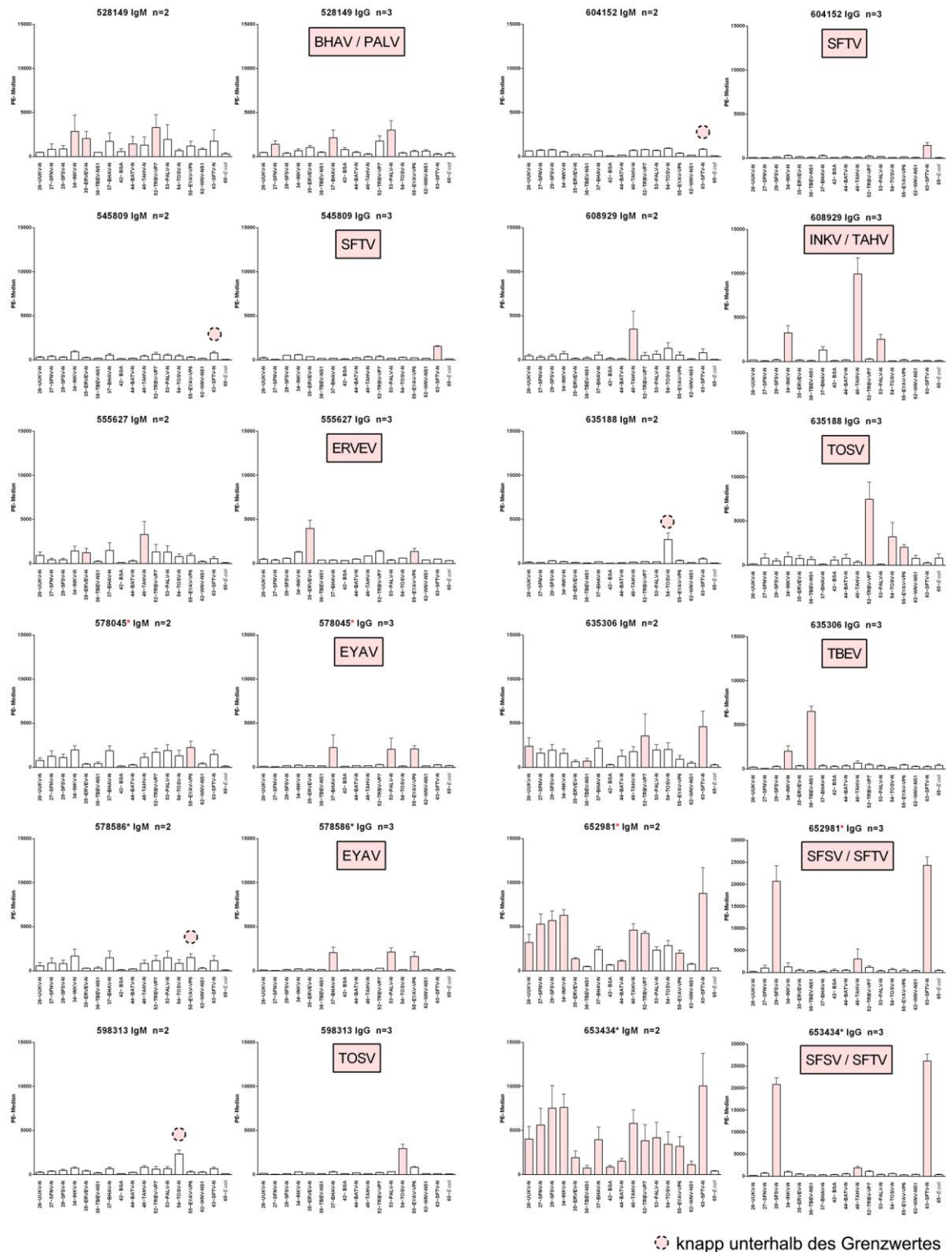


Abb. 6.12: Multiplex-CBA, Seren Fall 4 (IgM +, IgG +). Dargestellt sind die MFI jeder Beadpopulation gemessen als Multiplex-CBA (Software: GraphPad Prism 6). Bei den mit * gekennzeichneten Seren handelt es sich um eine Person, von der eine weitere Probe zur Untersuchung vorlag.

7 Literaturverzeichnis

- ALCON, S., TALARMIN, A., DEBRUYNE, M., FALCONAR, A., DEUBEL, V. & FLAMAND, M. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the experiencing primary acute phase of disease in patients or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 376-381.
- ALKAN, C., BICHAUD, L., DE LAMBALLERIE, X., ALTEN, B., GOULD, E. A. & CHARREL, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral research* **100**, 54-74.
- ANAGNOSTOU, V. & PAPA, A. (2013). Prevalence of antibodies to phleboviruses within the sand fly fever Naples virus species in humans, northern Greece. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**, 566-70.
- ARTSOB, H., GUBLER, D. J., ENRIA, D. A., MORALES, M. A., PUPO, M., BUNNING, M. L. & DUDLEY, J. P. (2009). West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses and public health* **56**, 357-69.
- BALDUCCI, M., VERANI, P., LOPES, M. C. & NARDI, F. (1970). Experimental pathogenicity of Bhanja virus for white mice and Macaca mulatta monkeys. *Acta virologica* **14**, 237-43.
- BARDOS, V. (1974). Recent state of knowledge of Tahyna virus infections. *Folia parasitologica* **21**, 1-10.
- BARDOS, V. & CUPKOVA, E. (1962). The Calovo virus--the second virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology* **6**, 186-92.
- BARDOS, V. & DANIELOVA, V. (1959). The Tahyna virus--a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology* **3**, 264-76.
- BECKER, N., KRUGER, A., KUHN, C., PLENGE-BONIG, A., THOMAS, S. M., SCHMIDT-CHANASIT, J. & TANNICH, E. (2014). Mosquitoes as vectors for exotic pathogens in Germany. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz* **57**, 531-540.
- BIGL, S. (2001). Virus-Meningoenzephalitis im Freistaat Sachsen. In *Epidemiologisches Bulletin*, pp. 153-156. Robert Koch Institut.
- BRINTON, M. A. (2002). The molecular biology of West Nile Virus: a new invader of the western hemisphere. *Annu Rev Microbiol* **56**, 371-402.
- BRINTON, M. A. (2014). Replication cycle and molecular biology of the West Nile virus. *Viruses* **6**, 13-53.

- BROWN, J. E., SCHOLTE, E.-J., DIK, M., DEN HARTOG, W., BEEUWKES, J. & POWELL, J. R. (2011). *Aedes aegypti* mosquitoes imported into the Netherlands, 2010. *Emerging infectious diseases* **17**, 2335-7.
- BRUMMER-KORVENKONTIO, M., SAIKKU, P., KORHONEN, P., ULMANEN, I., REUNALA, T. & KARVONEN, J. (1973). Arboviruses in Finland. IV. Isolation and characterization of Inkoo virus, a Finnish representative of the California group. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **22**, 404-13.
- BUGRYSHEVA, J. V., MATVEEVA, V. A., DOBRIKOVA, E. Y., BYKOVSKAYA, N. V., KOROBOVA, S. A., BAKHVALOVA, V. N. & MOROZOVA, O. V. (2001). Tick-borne encephalitis virus NS1 glycoprotein during acute and persistent infection of cells. *Virus Research* **76**, 161-169.
- BURKE, D. S. A. M., T. P. (2001). Flaviviruses. In *Fields Virology* (D. M. Knipe and P. M. Howley, eds.), vol. 1, pp. 1043-1126. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- CARHAN, A., UYAR, Y., OZKAYA, E., ERTEK, M., DOBLER, G., DILCHER, M., WANG, Y., SPIEGEL, M., HUFERT, F. & WEIDMANN, M. (2010). Characterization of a sandfly fever Sicilian virus isolated during a sandfly fever epidemic in Turkey. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **48**, 264-9.
- CHARREL, R. N., GALLIAN, P., NAVARRO-MARI, J. M., NICOLETTI, L., PAPA, A., SANCHEZ-SECO, M. P., TENORIO, A. & DE LAMBALLERIE, X. (2005). Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis* **11**, 1657-63.
- CHASTEL, C., MAIN, A. J., RICHARD, P., LELAY, G., LEGRANDQUILLIEN, M. C. & BEAUCOURNU, J. C. (1989). Erve Virus, a Probable Member of Bunyaviridae Family Isolated from Shrews (*Crocidura-Russula*) in France. *Acta Virologica* **33**, 270-280.
- CONNIE, R., MAHON & MANUSELIS, G., JR. (1995). *Textbook Of Diagnostic Microbiology*. W.B. Saunders Company.
- CRILL, W. D., TRAINOR, N. B. & CHANG, G.-J. J. (2007). A detailed mutagenesis study of flavivirus crossreactive epitopes using West Nile virus-like particles. *Journal of General Virology*, 1169-1174.
- DANIEL, M., DANIELOVA, V., KRIZ, B. & KOTT, I. (2004). An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic. *International journal of medical microbiology : IJMM* **293 Suppl 37**, 55-62.
- DANIELOVA, V., HOLUBOVA, J., PEJCOCH, M. & DANIEL, M. (2002). Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia parasitologica* **49**, 323-5.
- DANIELOVA, V., RUDENKO, N., DANIEL, M., HOLUBOVA, J., MATERNA, J., GOLOVCHENKO, M. & SCHWARZOVA, L. (2006). Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *International journal of medical microbiology : IJMM* **296 Suppl 40**, 48-53.
- DAVISON, K. L., CROWCROFT, N. S., RAMSAY, M. E., BROWN, D. W. G. & ANDREWS, N. J. (2003). Viral encephalitis in England, 1989-1998: what did we miss? *Emerging infectious diseases* **9**, 234-40.

- DEKONINCK, W., HENDRICKX, F., VASN BORTEL, W., VERSTEIRT, V., COOSEMANS, M., DAMIENS, D., HANCE, T., DE CLERCQ, E. M., HENDRICKX, G., SCHAFFNER, F. & GROOTAERT, P. (2011). Human-induced expanded distribution of *Anopheles plumbeus*, experimental vector of West Nile virus and a potential vector of human malaria in Belgium. *Journal of medical entomology* **48**, 924-8.
- DEPAQUIT, J., GRANDADAM, M., FOUQUE, F., ANDRY, P. E. & PEYREFITTE, C. (2010). Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **15**, 19507.
- DILCHER, M., ALVES, M. J., FINKEISEN, D., HUFERT, F. & WEIDMANN, M. (2012a). Genetic characterization of Bhanja virus and Palma virus, two tick-borne phleboviruses. *Virus genes* **45**, 311-5.
- DILCHER, M., HASIB, L., LECHNER, M., WIESEKE, N., MIDDENDORF, M., MARZ, M., KOCH, A., SPIEGEL, M., DOBLER, G., HUFERT, F. T. & WEIDMANN, M. (2012b). Genetic characterization of Tribec virus and Kemerovo virus, two tick-transmitted human-pathogenic Orbiviruses. *Virology* **423**, 68-76.
- DILCHER, M., KOCH, A., HASIB, L., DOBLER, G., HUFERT, F. T. & WEIDMANN, M. (2012c). Genetic characterization of Erve virus, a European Nairovirus distantly related to Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Virus genes* **45**, 426-32.
- DILCHER, M., SALL, A. A., HUFERT, F. T. & WEIDMANN, M. (2013). Clarifying Bunyamwera virus riddles of the past. *Virus genes* **47**, 160-3.
- DOBLER, G. (1996). Arboviruses causing neurological disorders in the central nervous system. *Archives of Virology*, 33-40.
- DOBLER, G., FINGERLE, V., HAGEDORN, P., PFEFFER, M., SILAGHI, C., TOMASO, H., HENNING, K. & NIEDRIG, M. (2014). [Threat of transmission of infectious pathogens by *Ixodes ricinus* ticks in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **57**, 541-8.
- DOBLER, G., JELINEK, T., FROSNER, G., NOTHDURFT, H. D. & LOSCHER, T. (1997). [Cross reactions of patients with acute dengue fever to tick-borne encephalitis]. *Wien Med Wochenschr* **147**, 463-4.
- DOBLER, G., WOLFEL, R., SCHMUSER, H., ESSBAUER, S. & PFEFFER, M. (2006). Seroprevalence of tick-borne and mosquito-borne arboviruses in European brown hares in Northern and Western Germany. *Int J Med Microbiol* **296 Suppl 40**, 80-3.
- ECHEVARRIA, J.-M., DE ORY, F., GUIASOLA, M.-E., SANCHEZ-SECO, M.-P., TENORIO, A., LOZANO, A., CORDOBA, J. & GOBERNADO, M. (2003). Acute meningitis due to Toscana virus infection among patients from both the Spanish Mediterranean region and the region of Madrid. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **26**, 79-84.
- EITREM, R., STYLIANOU, M. & NIKLASSON, B. (1991). High prevalence rates of antibody to three sandfly fever viruses (Sicilian, Naples, and Toscana) among Cypriots. *Epidemiology and infection* **107**, 685-91.
- EITREM, R., VENE, S. & NIKLASSON, B. (1990). Incidence of sand fly fever among Swedish United Nations soldiers on Cyprus during 1985. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **43**, 207-11.

- ERGUNAY, K., ISMAYILOVA, V., COLPAK, I. A., KANSU, T. & US, D. (2012). A case of central nervous system infection due to a novel Sandfly Fever Virus (SFV) variant: Sandfly Fever Turkey Virus (SFTV). *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **54**, 79-82.
- ERGUNAY, K., SAYGAN, M. B., AYDOGAN, S., LO, M. M., WEIDMANN, M., DILCHER, M., SENER, B., HASCELİK, G., PINAR, A. & US, D. (2011). Sandfly fever virus activity in central/northern Anatolia, Turkey: first report of Toscana virus infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**, 575-81.
- FAUQUET, C. M., M.A. MAYO, J. MANILOFF, U. DESSELBERGER, AND BALL L.A. (2005). *8th Reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2005*. Elsevier Academic Press.
- FIELDS, B., KNIPE, D. & HOWLEY, P. (2007). *Virology* 5edition. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, USA.
- FILIFE, A. R., ALVES, M. J., KARABATSOS, N., DE MATOS, A. P., NUNCIO, M. S. & BACELLAR, F. (1994). Palma virus, a new bunyaviridae isolated from ticks in Portugal. *Intervirolgy* **37**, 348-51.
- FREY, A., DI CANZIO, J. & ZURAKOWSKI, D. (1998). A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of immunological methods* **221**, 35-41.
- GORMAN, B. M. (1983). On the evolution of orbiviruses. *Intervirolgy*, 169-180.
- GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of biological chemistry* **177**, 751-66.
- GRAY, J. S. (2002). Biology of Ixodes species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Wien Klin Wochenschr* **114**, 473-8.
- GREINER, M. & GARDNER, I. A. (2000). Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev Vet Med* **45**, 3-22.
- GREINER, M., SOHR, D. & GOBEL, P. (1995). A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J Immunol Methods* **185**, 123-32.
- GRESIKOVA, M., NOSEK, J., KOZUCH, O., ERNEK, E. & LICHARD, M. (1965). Study on the ecology of Tribec Virus. *Acta Virologica* **9**, 83-88.
- GRESIKOVA, M., RAJCANI, J. & HRUZIK, J. (1966). Pathogenicity of Tribec virus for Macaca rhesus monkeys and white mice. *Acta Virol* **10**, 420-4.
- HASIB, L., DILCHER, M., HUFERT, F., MEYER-KONIG, U., KONIG-MEYER, U. & WEIDMANN, M. (2011). Development of a flow-through [corrected] microarray based reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification assay for the detection of European Bunyaviruses. [corrected]. *Molecular biotechnology* **49**, 176-86.
- HELLING, R. B., GOODMAN, H. M. & BOYER, H. W. (1974). Analysis of endonuclease EcoRI fragments of DNA from bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. *J. Virol.* **14**, 1235-1244.
- HOUSER, B. (2012). Bio-Rad's Bio-Plex suspension array system, xMAP technology overview. *Archives of physiology and biochemistry* **118**, 192-6.

- HUBALEK, Z. (1987). Experimental pathogenicity of Bhanja virus. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie, und Hygiene Series A, Medical microbiology, infectious diseases, virology, parasitology* **266**, 284-91.
- HUBALEK, Z. (2008). Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitology research* **103 Suppl 1**, S29-43.
- HUBALEK, Z. (2009). Biogeography of tick-borne bhanja virus (bunyaviridae) in europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2009**, 372691.
- HUBALEK, Z. & HALOUZKA, J. (1999). West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging infectious diseases* **5**, 643-50.
- HUBALEK, Z. & RUDOLF, I. (2012). Tick-borne viruses in Europe. *Parasitology research* **111**, 9-36.
- HUBALEK, Z., ZEMAN, P., HALOUZKA, J., JURICOVA, Z., STOVICKOVA, E., BALKOVA, H., SIKUTOVA, S. & RUDOLF, I. (2005). Mosquitoborne viruses, Czech Republic, 2002. *Emerg Infect Dis* **11**, 116-8.
- HUBÁLEK, Z. H., JIŘÍ. (1996). Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae* **30**, 95pp.
- HUKIC, M. & SALIMOVIC-BESIC, I. (2009). Sandfly - Pappataci fever in Bosnia and Herzegovina: the new-old disease. *Bosnian journal of basic medical sciences / Udruzenje basicnih mediciniskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences* **9**, 39-43.
- INUMARU, S. & ROY, P. (1987). Production and characterization of the neutralization antigen VP2 of bluetongue virus serotype 10 using a baculovirus expression vector. *Virology* **157**, 472-9.
- JOST, H., BIALONSKI, A., SCHMETZ, C., GUNTHER, S., BECKER, N. & SCHMIDT-CHANASIT, J. (2011). Isolation and phylogenetic analysis of Batai virus, Germany. *Am J Trop Med Hyg* **84**, 241-3.
- KARABATSOS, N. (1978). Supplement to International Catalogue of Arboviruses including certain other viruses of vertebrates. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **27**, 372-440.
- KHAN, I. H., KENDALL, L. V., ZIMAN, M., WONG, S., MENDOZA, S., FAHEY, J., GRIFFEY, S. A., BARTHOLD, S. W. & LUCIW, P. A. (2005). Simultaneous serodetection of 10 highly prevalent mouse infectious pathogens in a single reaction by multiplex analysis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**, 513-519.
- KILPATRICK, A. M. (2011). Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus. *Science* **334**, 323-7.
- KILPATRICK, A. M. & PAPE, W. J. (2013). Predicting human West Nile virus infections with mosquito surveillance data. *Am J Epidemiol* **178**, 829-35.
- KIMURAKURODA, J. & YASUI, K. (1986). Antigenic Comparison of Envelope Protein-E between Japanese Encephalitis-Virus and Some Other Flaviviruses Using Monoclonal-Antibodies. *Journal of General Virology* **67**, 2663-2672.
- KOLMAN JM, K. K., WOKOUNOVÁ D. (1973). Serological examination of the population from the endemic area of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Uukuniemi virus (UKV). *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol.* **22**, 153-9.

- KRUGER, A., BORSTLER, J., BADUSCHE, M., LUHKEN, R., GARMS, R. & TANNICH, E. (2014). Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of metropolitan Hamburg, Germany. *Parasitol Res.*
- KUNITZ, M. & SIMMS, H. S. (1928). DIALYSIS WITH STIRRING. *The Journal of general physiology* **11**, 641-4.
- KUNO, G., MITCHELL, C. J., CHANG, G. J. & SMITH, G. C. (1996). Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *Journal of clinical microbiology* **34**, 1184-8.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAL, G., BALMER, P., STANFORD, E., MARTIN, S., WARRINGTON, R. & BORROW, R. (2005). Development and validation of a nonaplex assay for the simultaneous quantitation of antibodies to nine Streptococcus pneumoniae serotypes. *J Immunol Methods* **296**, 135-47.
- LANCIOTTI, R. S., ROEHRIG, J. T., DEUBEL, V., SMITH, J., PARKER, M., STEELE, K., CRISE, B., VOLPE, K. E., CRABTREE, M. B., SCHERRET, J. H., HALL, R. A., MACKENZIE, J. S., CROPP, C. B., PANIGRAHY, B., OSTLUND, E., SCHMITT, B., MALKINSON, M., BANET, C., WEISSMAN, J., KOMAR, N., SAVAGE, H. M., STONE, W., MCNAMARA, T. & GUBLER, D. J. (1999). Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science (New York, N Y)* **286**, 2333-7.
- LIBIKOVA, H., REHACEK, J., GRESIKOVA, M., KOZUCH, O., SOMOGYIOVA, J. & ERNEK, E. (1964). Cytopathic viruses isolated from Ixodes ricinus ticks in Czechoslovakia. *Acta Virologica* **8**, 96.
- LIBIKOVA, H., TESAROVA, J. & RAJCANI, J. (1970). Experimental infection of monkeys with Kemerovo virus. *Acta virologica* **14**, 64-9.
- LINDENBACH, B. D. & RICE, C. M. (1997). trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol* **71**, 9608-17.
- LINDGREN, E. & GUSTAFSON, R. (2001). Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet* **358**, 16-8.
- LINDGREN, E., TALLEKLINT, L. & POLFELDT, T. (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick Ixodes ricinus. *Environmental health perspectives* **108**, 119-23.
- LINDQUIST, L. & VAPALAHTI, O. (2008). Tick-borne encephalitis. *Lancet* **371**, 1861-71.
- LISI, P. J., HUANG, C. W., HOFFMAN, R. A. & TEIPEL, J. W. (1982). A fluorescence immunoassay for soluble antigens employing flow cytometric detection. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **120**, 171-9.
- LIU, J., LIU, B., CAO, Z., INOUE, S., MORITA, K., TIAN, K., ZHU, Q. & GAO, G. (2008). Characterization and application of monoclonal antibodies specific to West Nile virus envelope protein. *J Virol Methods* **154**, 20-6.
- LUNDSTROM, J. O. (1999). Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *J Vector Ecol* **24**, 1-39.
- MACDONALD, J., TONRY, J., HALL, R. A., WILLIAMS, B., PALACIOS, G., ASHOK, M. S., JABADO, O., CLARK, D., TESH, R. B., BRIESE, T. & LIPKIN, W. I. (2005). NS1

- protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. *J Virol* **79**, 13924-33.
- MACFARLANE, D. E. & SOMMERVILLE, R. G. (1969). VERO cells (Cercopithecus aethiops kidney)--growth characteristics and viral susceptibility for use in diagnostic virology. (Brief report). *Archiv fur die gesamte Virusforschung* **27**, 379-85.
- MAINO, V. C. & MAECKER, H. T. (2004). Cytokine flow cytometry: a multiparametric approach for assessing cellular immune responses to viral antigens. *Clinical Immunology* **110**, 222-231.
- MALKOVA, D., HOLUBOVA, J., KOLMAN, J. M., MARHOUL, Z., HANZAL, F., KULKOVA, H., MARKVART, K. & SIMKOVA, L. (1980). Antibodies against some arboviruses in persons with various neuropathies. *Acta virologica* **24**, 298.
- MARTIN PFEFFER, G. D. (2009). What comes after bluetongue--Europe as target for exotic arboviruses. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* **122(11-12):458-66**.
- MATVEEVA, V. A., POPOVA, R. V., KVETKOVA, E. A., CHERNICINA, L. O., ZLOBIN, V. I., PUCHOVSKAYA, N. M. & MOROZOVA, O. V. (1995). Antibodies against tick-borne encephalitis virus (TBEV) non-structural and structural proteins in human sera and spinal fluid. *Immunol Lett* **46**, 1-4.
- MERTENS, N., REMAUT, E. & FIERS, W. (1995). Tight transcriptional control mechanism ensures stable high-level expression from T7 promoter-based expression plasmids. *Biotechnology (N Y)* **13**, 175-9.
- MEYER-KÖNIG, U., SCHNEIDER, K., ÖZDEMİR, S., HUTHMACHER, K., WEIDMANN, M., PIETSCH, J., KAISER, R., RAUER, S., DOBLER, G. & HUFERT, F. T. (2014 in preparation). Endemic Toscana virus infections emerging north of the Alps, PLoS ONE.
- MISIĆ, M., DAKOVIĆ, R. & RUZIĆ, S. (2009). Post-encephalitic syndrome in patients with tick-borne encephalitis. *Acta Med Croatica* **63**, 269-78.
- MOHD JAAFAR, F., ATTOUI, H., DE MICCO, P. & DE LAMBALLERIE, X. (2004). Recombinant VP6-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of immunoglobulin G antibodies to Eyach virus (genus Coltivirus). *J Clin Virol* **30**, 248-53.
- MORGAN, E., VARRO, R., SEPULVEDA, H., EMBER, J. A., APGAR, J., WILSON, J., LOWE, L., CHEN, R., SHIVRAJ, L., AGADIR, A., CAMPOS, R., ERNST, D. & GAUR, A. (2004). Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. *Clinical Immunology* **110**, 252-266.
- MOSS, S. R., AYRES, C. M. & NUTTALL, P. A. (1987). Assignment of the genome segment coding for the neutralizing epitope(s) of orbiviruses in the Great Island subgroup (Kemerovo serogroup). *Virology* **157**, 137-44.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* **155**, 335-350.
- NAUCKE, T. J., MENN, B., MASSBERG, D. & LORENTZ, S. (2008). Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitology research* **103 Suppl 1**, S65-8.
- NAUCKE, T. J. & PESSON, B. (2000). Presence of Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassi, 1908 (Diptera : Psychodidae) in Germany. *Parasitol Res* **86**, 335-6.

- NAVARRO, J. M., FERNANDEZ-ROLDAN, C., PEREZ-RUIZ, M., SANBONMATSU, S., DE LA ROSA, M. & SANCHEZ-SECO, M. P. (2004). [Meningitis by Toscana virus in Spain: description of 17 cases]. Meningitis por el virus Toscana en Espana: descripcion de 17 casos. *Medicina clinica* **122**, 420-2.
- NICOLETTI, L., CIUFOLINI, M. G. & VERANI, P. (1996). Sandfly fever viruses in Italy. *Archives of virology Supplementum* **11**, 41-7.
- NICOLETTI, L., VERANI, P., CACIOLLI, S., CIUFOLINI, M. G., RENZI, A., BARTOLOZZI, D., PACI, P., LEONCINI, F., PADOVANI, P. & TRAINI, E. (1991). Central nervous system involvement during infection by Phlebovirus toscana of residents in natural foci in central Italy (1977-1988). *The American journal of tropical medicine and hygiene* **45**, 429-34.
- NIEDRIG, M., VAISVILIENE, D., TEICHMANN, A., KLOCKMANN, U. & BIEL, S. S. (2001). Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *Journal of Clinical Virology* **20**, 179-182.
- NOWAK, D. A., BOEHMER, R. & FUCHS, H. H. (2003). A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. *European Journal of Neurology* **10**, 271-280.
- OECHTERING, J. & PETZOLD, G. C. (2012). Acute hydrocephalus due to impaired CSF resorption in Toscana virus meningoencephalitis. *Neurology* **79**, 829-31.
- OKER-BLOM, N., SALMINEN, M. BRUMMER-KORVENKOTIO, L. KAAERIAEINEN, AND P. WECKSTROEM. (1964). Isolation Of Some Viruses Other Than Typical Tick-Borne Encephalitis Viruses From Ixodes Ricinus Ticks In Finland., vol. 42, pp. 109-12. *Ann Med Exp Biol Fenn.*
- PAPA, A., KONSTANTINOOU, G., PAVLIDOU, V. & ANTONIADIS, A. (2006). Sandfly fever virus outbreak in Cyprus. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **12**, 192-4.
- PILASKI, J. & MACKENSTEIN, H. (1985). [Isolation of Tahyna virus from mosquitoes in 2 different European natural foci]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* **180**, 394-420.
- PRICHARD, P. M. & CORMIER, M. J. (1968). Studies on the mechanism of the horseradish peroxidase catalyzed luminescent peroxidation of luminol. *Biochemical and biophysical research communications* **31**, 131-6.
- PUPOANTUNEZ, M., RODRIGUEZ, H., VAZQUEZ, S., VILASECA, J. C., ALVAREZ, M., OTERO, A. & GUZMAN, G. (1997). Monoclonal antibodies raised to the dengue-2 virus (Cuban: A15 strain) which recognize viral structural proteins. *Hybridoma* **16**, 347-353.
- PUTKURI, N., VAHERI, A. & VAPALAHTI, O. (2007). Prevalence and protein specificity of human antibodies to Inkoo virus infection. *Clin Vaccine Immunol* **14**, 1555-62.
- R.R. BURGESS, M. K. K. (1996). Purification of a recombinant protein overproduced in *E. coli*. In *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Manual* (ed. J. K. D. Marshak, R. Burgess, M. Knuth, W. Brennan Jr., S.-H. Lin), pp. 205-274. Cold Spring Harbor Press.

- RHESE-KÜPPER B, C. J., RHESE E, ACKERMANN R. (1976). Eyach- an Arbovirus related to Colorado tick fever virus in the Federal Republic of Germany. *Acta Virol* **20**:339-346.
- ROCKX, B., VAN ASTEN, L., VAN DEN WIJNGAARD, C., GODEKE, G. J., GOEHRING, L., VENNEMA, H., VAN DER AVOORT, H., VAN PELT, W. & KOOPMANS, M. (2006). Syndromic surveillance in the Netherlands for the early detection of West Nile virus epidemics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **6**, 161-169.
- ROSEN, L. (1981). [Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes (author's transl)]. Transmission transovarienne des arbovirus par les moustiques. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial* **41**, 23-9.
- SABIN, A. B. (1951). Experimental studies on Phlebotomus (pappataci, sandfly) fever during World War II. *Archiv fur die gesamte Virusforschung* **4**, 367-410.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH AND T. MANIATIS. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. (1977). DNA-sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- SCHEIBE, J. & SCHULZ, K. R. (1991). [Headache and unconsciousness--diagnostic indications for meningoencephalitis].
Kopfschmerz und Bewusstlosigkeit--diagnostische Hinweise auf eine Meningoenzephalitis. *Zeitschrift fur arztliche Fortbildung* **85**, 437-9.
- SCHMIDT, T. G. M. & SKERRA, A. (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nature protocols* **2**, 1528-35.
- SCHNEIDER, H. (1931). Über epidemische akute Meningitis serosa. *Wr. Klin. Wochenschrift* **44**, 350-352.
- SCHOEHN, G., MOSS, S. R., NUTTALL, P. A. & HEWAT, E. A. (1997). Structure of Broadhaven virus by cryoelectron microscopy: correlation of structural and antigenic properties of Broadhaven virus and bluetongue virus outer capsid proteins. *Virology* **235**, 191-200.
- SCHOLTE, E., DEN HARTOG, W., DIK, M., SCHOELITZ, B., BROOKS, M., SCHAFFNER, F., FOUSSADIER, R., BRAKS, M. & BEEUWKES, J. (2010). Introduction and control of three invasive mosquito species in the Netherlands, July-October 2010. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **15**.
- SCHOLTE, E. J., DEN HARTOG, W., BRAKS, M., REUSKEN, C., DIK, M. & HESSELS, A. (2009). First report of a North American invasive mosquito species Ochlerotatus atropalpus (Coquillett) in the Netherlands, 2009. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **14**.
- SCHOLTE, E. J. J., F.; LINTON, Y.; DIJKSTRA, E.; FRANSEN, J.; TAKKEN, W. (2007). First Record of Aedes (Stegomyia) albopictus in the Netherlands. In *European Mosquito Bulletin*, vol. 22, pp. 5-9. Journal of the European Mosquito Control Association.
- SCHULTZE-AMBERGER, J., EMMERICH, P., GUNTHER, S. & SCHMIDT-CHANASIT, J. (2012). West Nile virus meningoencephalitis imported into Germany. *Emerging infectious diseases* **18**, 1698-700.

- SCHÜBLER, E. (2000). Tahyna-Virus : Untersuchungen zum Vorkommen am Oberrhein und Sequenzvergleiche des M-Segments bei zehn Virusisolaten <http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/1400>.
- SCHWARZ, T. F., GILCH, S. & JAGER, G. (1995). Aseptic meningitis caused by sandfly fever virus, serotype Toscana. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **21**, 669-71.
- SCHWARZ, T. F., GILCH, S. & SCHATZL, H. M. (1998). A recombinant Toscana virus nucleoprotein in a diagnostic immunoblot test system. *Res Virol* **149**, 413-8.
- SEEDAT, J., ALTMANN, D. & HELLENBRAND, W. (2014). Aktuelle daten und informationen zu infektionskrankheiten und public health - FSME: Risikogebiete in Deutschland. In *Epidemiologisches Bulletin*, pp. 1-16. Robert-Koch-Institut.
- SEMENZA, J. C. & MENNE, B. (2009). Climate change and infectious diseases in Europe. *The Lancet infectious diseases* **9**, 365-75.
- SHAH, K. V. & WORK, T. H. (1969). Bhanja virus: a new arbovirus from ticks *Haemaphysalis intermedia* Warburton and Nuttall, 1909, in Orissa, India. *The Indian journal of medical research* **57**, 793-8.
- SISSY T. SONNLEITNER, J. O. L., RAPHAELA BAUMGARTNER, JOSEF SIMEONI, HARALD SCHENNACH, ROLAND ZELGER, ANGELIKA PRADER, ERICH SCHMUTZHARD, NORBERT NOWOTNY, GERNOT WALDER. (2013). Investigations on California serogroup orthobunyaviruses in the Tyrols: First description of autochthonous strains of Tahyna virus in the Alps. In *XII International Jena Symposium on Tick-borne Diseases*, Weimar.
- SKERRA, A. (1994). Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **151**, 131-5.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* **150**, 76-85.
- SOLOMON, T., HART, I. J. & BEECHING, N. J. (2007). Viral encephalitis: a clinician's guide. *Pract Neurol* **7**, 288-305.
- SONNLEITNER, S. T., LUNDSTROM, J., BAUMGARTNER, R., SIMEONI, J., SCHENNACH, H., ZELGER, R., PRADER, A., SCHMUTZHARD, E., NOWOTNY, N. & WALDER, G. (2014). Investigations on California serogroup orthobunyaviruses in the Tyrols: first description of Tahyna virus in the Alps. *Vector Borne Zoonotic Dis* **14**, 272-7.
- STUDAHL, M., BERGSTROM, T. & HAGBERG, L. (1998). Acute viral encephalitis in adults - a prospective study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **30**, 215-220.
- SUSS, J., BEZIAT, P., ROHR, H. P., TREIB, J. & HAASS, A. (1996). Detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several federal "Länder" of Germany by means of the polymerase chain reaction (PCR)--characterization of the virus. *Infection* **24**, 403-4.
- SÜSS J, B. P., RAMELOW C, BERNDT D. (1995). Untersuchungen zur epidemiologischen Situation der FSME in den neuen Bundesländern von 1992-1994. In *Durch Zecken übertragbare Erkrankungen. FSME und Lyme-Borreliose*, pp. 25-32. Weller, Schriesheim.

- SÜSS J., S. C. (2004). Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered non-pathogenic Part I: ticks and viruses. *Bundesgesundheitsblatt* **47**, 392-404.
- TERPE, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 523-33.
- TERPE, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 211-22.
- TESH, R. B. & CHANIOTIS, B. N. (1975). Transovarial transmission of viruses by phlebotomine sandflies. *Annals of the New York Academy of Sciences* **266**, 125-34.
- TESH, R. B. & PAPAEVANGELOU, G. (1977). Effect of insecticide spraying for malaria control on the incidence of sandfly fever in Athens, Greece. *Am J Trop Med Hyg* **26**, 163-6.
- TOWBIN, H., STAEBLIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- TREIB, J., DOBLER, G., HAASS, A., VON BLOHN, W., STRITTMATTER, M., PINDUR, G., FROESNER, G. & SCHIMRIGK, K. (1998). Thunderclap headache caused by Erve virus? *Neurology* **50**, 509-11.
- TRUSZKIEWICZ, W. (2011). [Influence of storage conditions on results of antibody level assay in human serum samples]. *Med Dosw Mikrobiol* **63**, 189-93.
- TSAI, T. F., POPOVICI, F., CERNESCU, C., CAMPBELL, G. L. & NEDELCU, N. I. (1998). West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* **352**, 767-71.
- TYLER, K. L. (2001). West Nile virus encephalitis in America. *The New England journal of medicine* **344**, 1858-9.
- VAPALAHTI, O., PLYUSNIN, A., CHENG, Y., MANNI, T., BRUMMER-KORVENKONTIO, M. & VAHERI, A. (1996). Inkoo and Tahyna, the European California serogroup bunyaviruses: sequence and phylogeny of the S RNA segment. *J Gen Virol* **77** (Pt 8), 1769-74.
- VERANI, P., BALDUCCI, M., LOPES, M. C. & SACCA, G. (1970). Isolation of Bhanja virus from Haemaphysalis ticks in Italy. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **19**, 103-5.
- VERANI, P., NICOLETTI, L. & CIUFOLINI, M. G. (1984). Antigenic and biological characterization of Toscana virus, a new Phlebotomus fever group virus isolated in Italy. *Acta virologica* **28**, 39-47.
- VIGNALI, D. A. (2000). Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of immunological methods* **243**, 243-55.
- VOSS, S. & SKERRA, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein engineering* **10**, 975-82.
- WANG, L. F., GOULD, A.R., HYATT, A.D., EATON B.T. (1992). Nature and location of epitopes utilized in competitive ELISA to detect bluetongue virus antibodies. In *Bluetongue, African Horsesickness and related Orbiviruses: proceedings of the Second International symposium*, pp. 596-603. CRC Press, Paris, France.

- WEIDMANN, M., ARMBRUSTER, K. & HUFERT, F. T. (2008a). Challenges in designing a Taqman-based multiplex assay for the simultaneous detection of Herpes simplex virus types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *J Clin Virol* **42**, 326-34.
- WEIDMANN, M., MEYER-KONIG, U. & HUFERT, F. T. (2003a). Rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections by real-time PCR. *J Clin Microbiol* **41**, 1565-8.
- WEIDMANN, M., RUDAZ, V., NUNES, M. R. T., VASCONCELOS, P. F. C. & HUFERT, F. T. (2003b). Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. *Journal of clinical microbiology* **41**, 3299-305.
- WEIDMANN, M., SANCHEZ-SECO, M. P., SALL, A. A., LY, P. O., THIONGANE, Y., LO, M. M., SCHLEY, H. & HUFERT, F. T. (2008b). Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **41**, 138-42.
- WERNER, D., KRONEFELD, M., SCHAFFNER, F. & KAMPEN, H. (2012). Two invasive mosquito species, *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus japonicus*, trapped in south-west Germany, July to August 2011. *Euro Surveill* **17**.
- WONG, S. J., DEMAREST, V. L., BOYLE, R. H., WANG, T., LEDIZET, M., KAR, K., KRAMER, L. D., FIKRIG, E. & KOSKI, R. A. (2004). Detection of human anti-flavivirus antibodies with a West Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 65-72.
- WWW.CDC.GOV/ARBOCAT. International Catalog of Arboviruses. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.
- YOUN, S., AMBROSE, R. L., MACKENZIE, J. M. & DIAMOND, M. S. (2013). Non-structural protein-1 is required for West Nile virus replication complex formation and viral RNA synthesis. *Virology* **453**, 339.
- YOUN, S., LI, T., MCCUNE, B. T., EDELING, M. A., FREMONT, D. H., CRISTEA, I. M. & DIAMOND, M. S. (2012). Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of West Nile Virus. *Journal of Virology* **86**, 7360-7371.
- ZHUO, Q., PIAO, J. H., WANG, R. & YANG, X. G. (2005). Refolding and purification of non-fusion HPT protein expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* **41**, 53-60.

Lebenslauf:

Persönliche Daten

Name Dora Elisabeth Finkeisen
Anschrift Angerstraße 1, 37073 Göttingen
geboren 21.09.1984 in Northeim

Schule und Studium

4/2010 bis 7/2014 Promotion an der biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen
Dissertationstitel:
„Entwicklung von diagnostischen Methoden zum Nachweis von europäischen humanpathogenen Arboviren“

10/2004 bis 3/2010 Studium der Dipl. Biologie an der biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

24.03.2010 Abschluss des Dipl. Studiums Biologie
Hauptfach Mikrobiologie,
Nebenfächer Humangenetik und Pathologie
Diplomarbeitstitel:
„Entwicklung eines zytometrischen-Kugel-Test-Verfahrens zum Nachweis von zeckenübertragenden Viren“

8/1997 bis 6/2004 Ratsgymnasium Goslar mit Abschluss: Abitur

Fort- und Weiterbildungen

2013 Fortbildung: *„Sicherheitsaspekte der Gentechnik“*

2012 Fachtagung mit Vortrag:
„Joint Conference on Emerging and Re-emerging Epidemics Affecting Global Health 2012“ in Orvieto, Italien

2012 Fachtagung mit Posterpräsentation:
„22nd Annual Meeting of Society for Virology“ in Essen

2011 Teilnahme:
„Workshop: Bead-Based-Array-Technologies“ RKI Berlin

2010 Teilnahme: *„Cytokine Workshop“* in Göttingen

2010 Teilnahme: *„BSL3/BSL4 Training Course“* in Göttingen

Berufspraxis

4/2010 bis 4/2014 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
Universitätsmedizin Göttingen (UMG),
Abteilung für Virologie Arbeitsgruppe Hufert