

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
eingereicht von Prof. Dr. med. F. T. Hufert

**Etablierung und Evaluation eines vereinfachten,
speziesunabhängigen
Anti-RVSV-Nukleoprotein-ELISAs**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Uurtsaikh Schmidt, geb. Balchin

aus

Bayantsagaan, Mongolei

Göttingen 2019

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen im Zeitraum von November 2011 bis März 2013 im Institut für Mikrobiologie und Virologie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. F. T. Hufert angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent: Prof. Dr. med. F. T. Hufert

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. S. Pöhlmann

Datum der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Etablierung und Evaluation eines vereinfachten, speziesunabhängigen Anti-RVfV-Nukleoprotein-ELISAs“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 30.06.2020

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Zoonosen.....	5
1.1.1 Ordnung <i>Bunyavirales</i>	7
1.1.2 Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV).....	9
1.2 Grundlagen der Immunabwehr	11
1.2.1 Spezifische (adaptive) Immunabwehr.....	11
1.2.2 RVFV-Impfstoffe	13
1.3 Labormethoden zum Nachweis von Virusinfektionen.....	14
1.3.1 ELISA	14
1.3.2 Bewertung von Nachweismethoden: Sensitivität und Spezifität	17
1.4 Zielsetzung	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Standardmaterialien	20
2.2 Biochemische Methoden	21
2.2.1 Protein-Expression in <i>E. coli</i>	21
2.2.2 Reinigung des Proteins über die Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose.....	23
2.2.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese.....	24
2.2.4 Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran (Western Blot)	26
2.2.5 Dialyse der eluierten RVFV-N-Proteinlösung	27
2.2.6 Färbung von Proteingelen	28
2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.2.8 RVFV-N/HRP-Konjugation mit HRP	29
2.2.9 Messung der HRP-Aktivität	30
2.2.10 Speziesunabhängiger RVFV-N-ELISA	31
2.3 Speziesunabhängiger RVFV-Gn-ELISA	33
2.3.1 Cut-off-Berechnung nach Frey	34
2.4 Virologische Methoden.....	35
2.4.1 Anzucht von RVFV-Klon-13 in Zellkultur	35
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	36

2.5.1	RNA-Isolierung aus Viruspartikeln	36
2.5.2	Spektrometrische Konzentrationsmessung von RNA	37
2.5.3	Reverse Transkription	38
2.5.4	Touchdown PCR	39
2.5.5	Agarosegelelektrophorese und -extraktion	41
2.5.6	TA-Klonierung: Ligation und Transformation.....	43
2.5.7	Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien	46
2.5.8	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	47
2.5.9	Sequenzierung.....	48
2.6	Immunfluoreszenztest als Referenzmethode.....	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Etablierung des speziesunabhängigen, nichtkompetitiven ELISAs zur Detektion von RVFV-Nukleoprotein-Antikörpern.....	50
3.1.1	Expression und Aufreinigung des RVFV-Nukleoproteins	50
3.1.2	Konjugation des RVFV-Nukleoproteins mit HRP	51
3.1.3	Durchführung des ELISAs	53
3.2	Vergleich mit anderen Nachweismethoden	53
3.2.1	Anpassung eines kommerziell verfügbaren RVFV-IFT als Referenzmethode.....	54
3.2.2	Ergebnisse der Serodiagnostik	54
3.3	Entwicklung eines ELISAs zur Kontrolle des Impfschutzes.....	58
3.3.1	Herstellung des Plasmids pCRII-RVFV-Gn über TA-Klonierung	59
3.3.2	Subklonierung von RVFV-Gn-cDNA in pQE9	60
3.3.3	Expression des RVFV-Gn-Proteins.....	61
3.3.4	Erprobung des Gn-ELISAs	62
4	Diskussion	64
4.1	Erfolgreiche Etablierung eines speziesunabhängigen RVFV-N-ELISAs.....	64
4.2	Spezielle Aspekte der Verwendung eines ELISAs bei geimpften Tieren.....	66
5	Zusammenfassung	68
6	Literaturverzeichnis	69

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CPE	zytopathischer Effekt
ddH₂O	ultrafiltriertes deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEPC-H₂O	mit DEPC behandeltes und daher RNasefreies Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAO	Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FKS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl- α -D-Thiogalactopyranosid
kbp	Kilo-Basenpaare
Lsg.	Lösung
MEM	Minimum Essential Medium
MOI	infektiöse Viruspartikel pro Zelle
mRNA	Boten-RNA
MW	Mittelwert

NICD	National Institute for Communicable Diseases
NK	natürliche Killerzellen
NS-Protein	Nichtstruktur-Protein
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
RVFV	Rift-Valley-Fever-Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelstrang
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TCID₅₀	Kulturinfektionsdosis 50%
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VP	virales Protein
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Zoonosen

Der Begriff Zoonose erscheint erstmalig 1874 im Handbuch der allgemeinen Pathologie von Ernst Wagner (Wagner 1874). 1958 definierte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Zoonosen als Infektionskrankheiten, die bei Wirbeltieren natürlicherweise vorkommen und zwischen Tier und Mensch sowie umgekehrt übertragen werden (Krauss et al. 2004). Der Begriff leitet sich aus den griechischen Wörtern *zoon* (Lebewesen) und *nosos* (Krankheit) ab. Zu den Zoonosen gehören die ältesten bekannten Krankheiten wie Tuberkulose, zahlreiche lebensmittelbedingte Krankheiten wie Salmonellose, Krankheiten, die durch Vektoren übertragen werden wie Borreliose und Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), durch resistente Keime wie den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) ausgelöste Erkrankungen, aber auch neue Krankheiten wie das Schwere Akute Respiratorische Syndrom (SARS). Durch schnelles Bevölkerungswachstum, zunehmende Mobilität, veränderte Tierzucht durch steigende Nachfrage nach tierischen Produkten sowie Klimaveränderungen gewinnen Zoonosen immer mehr an Bedeutung (Zoonosen.net 2019). Weltweit erkranken pro Jahr durch die 56 häufigsten Zoonosen 2,5 Milliarden Menschen, 2,7 Millionen sterben an den Folgen der Infektion. Am stärksten betroffen sind die Kontinente Afrika und Asien. Neu auftretende Zoonosen sind vor allem in Westeuropa und dem Osten der USA registriert worden (ILRI 2012).

Bei einer 2001 durchgeführten Studie zeigte sich, dass es 1415 infektiöse Organismen und Partikel gibt, die beim Menschen Erkrankungen auslösen können: 217 Viren und Prionen, 538 Bakterien und Rickettsien, 307 Pilzarten, 66 Protozoen und 287 Helminthen. Es können bemerkenswerte 61 Prozent der Erkrankungen beim Menschen als zoonotischen Ursprungs charakterisiert werden (Taylor et al. 2001). Doch die Inzidenz und Prävalenz ist nicht genau erfassbar, da die Erkrankungen nicht alle meldepflichtig sind oder erst gar nicht diagnostiziert werden. Die Gefahr einer Infektion besteht bei häufigem und direktem Kontakt mit infizierten Tieren. Bestimmte Berufsgruppen wie Tierärzte und Landwirte sind, bedingt durch das häufige Zusammentreffen mit Vektoren, eher gefährdet als die

Stadtbevölkerung. Immungeschwächte Menschen, wie alte Menschen, Kinder, Schwangere und Föten, sind auch leichter durch Infektionskrankheiten angreifbar. Das Infektionsrisiko kann durch das Vermeiden von Kontakt mit infizierten Nutz- und Haustieren und deren Produkten verringert werden. In einigen afrikanischen Ländern, wie Ägypten und Sudan, finden grenzüberschreitende Zuchttier- und Schlachtviehtransporte statt, die kaum oder gar nicht auf Tierseuchen überwacht werden. Der Zusammenarbeit von Human- und Veterinärmedizinern kommt bei der Eindämmung zoonotischer Erkrankungen ein besonderer Stellenwert zu, so beispielsweise bei der unerlässlichen Impfung von Nutztieren und Menschen.

Virale Zoonosen verursachen durch den Verlust der Nutztiere regional und national enorme ökonomische Kosten, u. a. durch eine verringerte Milch- und Fleischproduktion (Hartley et al. 2011). Dies trifft in besonderem Maße auf endemische Krankheiten wie zum Beispiel das Rift Valley Fever (RVF) zu, welches mit relevanten Krankheitsausbrüchen vornehmlich auf dem afrikanischen Kontinent und der arabischen Halbinsel vorkommt. Die Erkrankung wird durch Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV), einem Mitglied der Familie *Phenuiviridae* aus der Ordnung Bunyavirales, verursacht (Abbildung 1). In afrikanischen Staaten südlich der Sahara wie zum Beispiel Tansania hat das RVF eine hohe Seroprävalenz von bis zu 29,3 Prozent. Die RVFV-IgG-Seroprävalenz in Tansania ist mit hohem Alter, geringem sozioökonomischem Status, Besitz von Rindern, naher Distanz zum Malawisee, erhöhter Vegetationsdichte und geringen Temperaturschwankungen assoziiert. Die RVFV-Antikörperpräsenz bei jungen Leuten weist auf eine aktuell stattfindende oder kürzlich erfolgte Viruszirkulation hin. (Heinrich et al. 2012). Durch die heutzutage vorherrschende Mobilität durch das Fliegen besteht ein potentiell weltweites Verbreitungsrisiko. So besteht beispielsweise ein Einführungspotential für das RVF in die USA, da im Süden der USA ähnliche klimatische Bedingungen herrschen wie in den afrikanischen Ursprungsländern. Lediglich die niedrigen Temperaturen im Winter stehen dort dem Heimischwerden der RVFV übertragenden Moskitoarten entgegen (ViralZone 2019). In Europa wurde das RVF bisher noch nicht beobachtet. In Deutschland gilt das RVF als anzeigepflichtige Tierseuche, des Weiteren sind RVF-Erkrankungen und Todesfälle beim Menschen nach dem Infektionsschutzgesetz IfSG meldepflichtig. Wegen der epidemiologischen Charakteristika, der klinischen Bedeutung

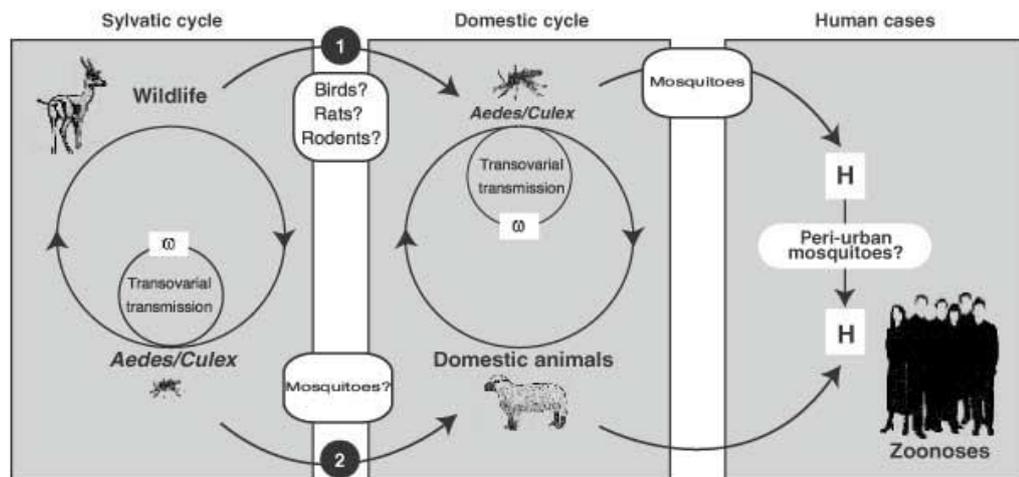


Abbildung 1: Theoretischer Zyklus der RVF-Virus Übertragung (Mondet 2003). Mit freundlicher Genehmigung der FAO.

und der Auswirkung auf die Landwirtschaft eines Landes wird das RFFV als potentielle biologische Waffe eingestuft (Kasari et al. 2008).

1.1.1 Ordnung *Bunyvirales*

Die Ordnung *Bunyvirales* umfasst zwölf Virusfamilien mit 287 taxonomisch gesicherten Virusarten. Die Ordnung umfasst Pflanzenviren, Viren, die nur Invertebraten infizieren, Viren, die sowohl Invertebraten (Arthropoden) als auch Säugetiere infizieren, sowie Viren, die nur Säugetiere (einschließlich des Menschen) infizieren. Der Begriff *Bunyvirales* leitet sich von dem Ort Bunyamwera in Uganda ab, wo das Bunyamweravirus, das innerhalb der Familie *Perybunyviridae* zur Gattung *Orthobunyavirus* gezählt wird, erstmals isoliert wurde.

Die Virusarten der Familien *Peribunyviridae*, *Hantaviridae*, *Nairoviridae*, *Phenuiviridae* und *Tospoviridae* besitzen prinzipiell denselben Aufbau: Es sind behüllte Viren, die als Genom eine einzelsträngige, dreifach segmentierte RNA mit negativer Polarität besitzen. Bunyaviren weisen eine sphärische Form mit einem Durchmesser von 100 bis 120 nm auf, die Spikes der Virushüllmembran bestehen aus einem Komplex zweier unterschiedlicher Glykoproteine Gn und Gc. Das Ribonukleokapsid ist von helikaler Symmetrie. Das Virusgenom setzt sich aus drei Segmenten bestehend aus einzelsträngigen RNAs mit negativer Polarität zusammen, die nach ihrer Größe mit large (L), middle (M) und small (S)

bezeichnet werden (Abbildung 2). Das L-Segment kodiert das L-Protein, das eine RNA abhängige RNA-Polymerase darstellt. Das M-Segment enthält Informationen zu den für Infektion und Krankheitsentwicklung wichtigen Glykoproteinen Gn und Gc sowie dem Nichtstrukturprotein NSm. Das S-Segment kodiert das Nukleokapsidprotein N und das Nichtstrukturprotein NSs (Abbildung 3). Das NSs entsteht während der Virusreplikation und akkumuliert im Fall von RVFV im Kern infizierter Zellen. Es stellt einen wichtigen Virulenzfaktor dar, da das Protein die Interferonproduktion im RVFV-infizierten Organismus hemmt. Das Nukleoprotein N umhüllt die drei viralen Genomsegmente L, M und S.

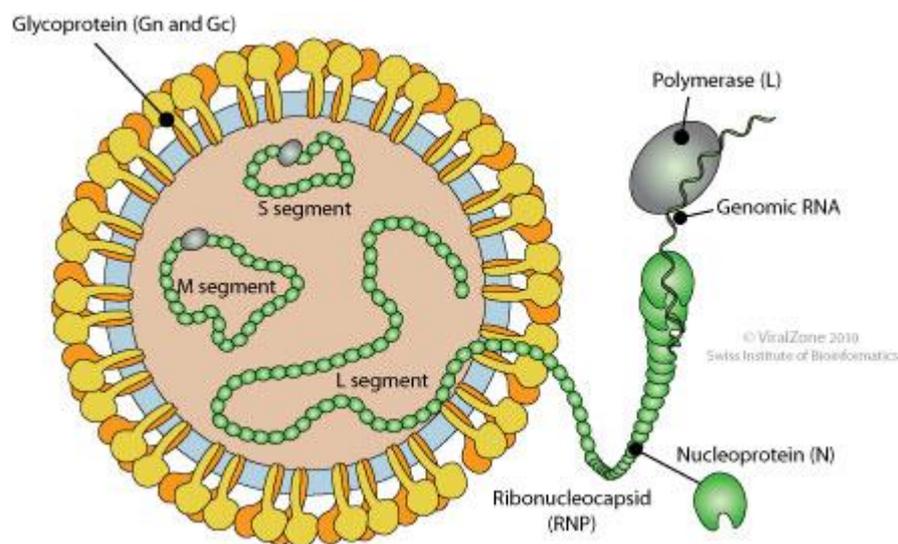


Abbildung 2: Virion (ViralZone 2019). Lizenziert unter CC BY-NC-ND 4.0.

Während das L- und M-Segment die für Bunyaviren typische negative Polarität aufweisen, besitzt das S-Segment eine Ambisense-Kodierung. Im Gegensatz zum Nukleoprotein-Gen, das negative Polarität besitzt, ist das Nichtstrukturprotein-Gen in positiver Polarität kodiert. Da die viralen Genom-Segmente kein 5'-Cap besitzen, kann der zelluläre Translationsapparat das NSs-Gen jedoch nicht direkt translatieren. Die auf dem L-Segment kodierte virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (L-Protein) kann Genom-Segmente bzw. Gene mit negativer Polarität in mRNA umschreiben (Abbildung 3), die von der infizierten Zelle dann translatiert werden. Um das mit positiver Polarität kodierte NSs-Gen zu transkribieren, muss die virale Polymerase zunächst das komplette genomische S-Segment in ein antigenomisches S-Segment umschreiben. Auf diesem antigenomischen Segment

liegt das NSs-Gen nun in negativer Polarität vor und kann somit von der viralen Polymerase transkribiert (Abbildung 3) und anschließend von der infizierten Zelle translatiert werden (Flint et al. 2004). Desweiteren dienen die antigenomischen Gen-Segmente auch als Vorlage zur Herstellung neuer genomischer Genom-Segmente durch die virale Polymerase im Verlauf der Virusreplikation. Daher werden von der viralen Polymerase nicht nur das S-Segment, sondern auch die M- und L-Segmente in die jeweiligen antigenomischen Segmente umgeschrieben.

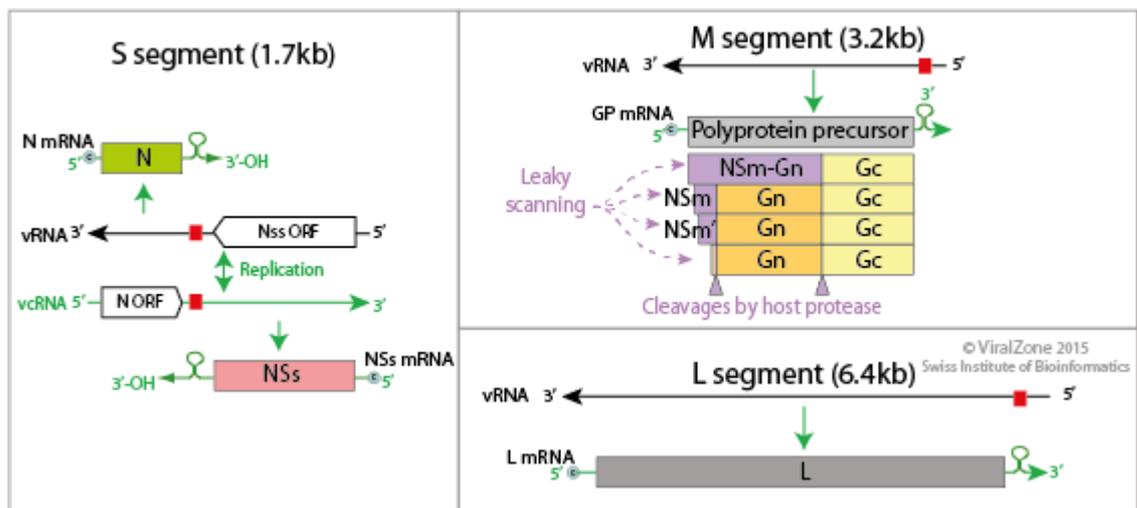


Abbildung 3: Das Genom des Rift-Valley-Fieber-Virus, ein Vertreter der Phenuiviren (ViralZone 2019).
Lizenziert unter CC BY-NC-ND 4.0.

Bunyaviren der Familien *Peribunyaviridae*, *Nairoviridae* und *Phenuiviridae* vermehren sich in Vertebraten und Arthropoden. Da die Replikation in Arthropoden- im Gegensatz zu Vertebratenzellen kaum zytolytisch verläuft, verbreiten Arthropoden das Virus als Vektor (Modrow et al. 2010).

1.1.2 Rift-Valley-Fever-Virus (RVFV)

Das RVFV konnte erstmalig 1931 in dem gleichnamigen Tal (Rift Valley) in Kenia aus moribunden Schafen isoliert werden (Daubney et al. 1931). Bereits 1930 kam es im Osten Afrikas zur ersten großen Epidemie. Seither ist das Virus endemisch und epidemisch in ganz Afrika, zum Beispiel in Ägypten, Madagaskar und den Komoren (Heinrich et al. 2012). 1978 erkrankten in Ägypten 200.000 Menschen an Rift-Valley-Fever-Viren, wovon 600 starben, im Jahr 2000 erkrankten mehr als 20.000 in Saudi-Arabien und Jemen, mit einer ähnlich

hohen Mortalitätsrate (Madani et al. 2003). Der Ausbruch in Saudi-Arabien und Jemen und damit auf der arabischen Halbinsel war der erste außerhalb des afrikanischen Kontinents. In neuerer Zeit wurden Epidemien z. B. 2008 in Madagaskar und 2010 in Südafrika gemeldet (Corso et al. 2008; NICD 2018). Das RVFV befällt hauptsächlich Wiederkäuer wie Schafe, Ziegen, Rinder, Kamele und Antilopen, dazu auch Pferde, Esel und verschiedene Vogelarten. Während einer Epidemie treten Erkrankungen auch beim Menschen auf (Abbildung 1), eine Mensch-zu-Mensch Übertragung ist bisher jedoch nicht beobachtet wurden. Das Virus kann durch Aerosole, durch direkten Kontakt mit infizierten Tieren bei der Schlachtung oder durch verschiedene Stechmückenarten, wie *Aedes* und *Culex*, auf den Menschen übertragen werden. Klinisch dominieren bei Wiederkäuern gastrointestinale Symptome mit Fieber mit bis zu 70% Letalität. Bei trächtigen Tieren kommt es zu Fehl- bzw. Totgeburten mit einer Rate von bis zu 100%, den sogenannten „abortion storms“. Erkrankungen beim Menschen sind oft subklinisch oder ähneln nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Tagen einer Grippe mit hohem Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen, retroorbitalen Schmerzen und Photophobie. Tödliche Verläufe mit Raten bis zu 15% werden regelmäßig nach Hämorrhagien, Meningitis, Enzephalitis und Retinitis beobachtet. Vor allem bei *Aedes*-Mücken bleibt das Virus durch transovariable Übertragung als Reservoir erhalten. Durch den Stich der Mücke gelangt das Virus in die Blutbahn des Wirts und infiziert Monozyten, Makrophagen und andere Zellen. Die Virämie erreicht schließlich Zielorgane wie die Leber, das Zentralnervensystem und bei trächtigen Tieren den Fetus. Das Bild der infektiösen Hepatitis und Lebernekrose und damit das klinische Bild des Ikterus treten bei der Erkrankung von Tieren nicht auf, beim Menschen jedoch besonders oft. Eine antivirale Therapie mit Ribavirin kombiniert mit Interferon wurde bisher nicht bei Menschen angewendet, daher ist die Expositionsprophylaxe gegen Insektenstiche sehr anzuraten. In Experimenten mit RVFV infizierten Mäusen und Affen erwies sich die kausale Therapie als effizient (Peters et al. 1986). Tiere und Menschen, die bereits an RVF erkrankt waren, weisen eine andauernde und schützende Immunität auf (Modrow et al. 2010).

1.2 Grundlagen der Immunabwehr

Bei den Wirbeltieren stellt das Immunsystem einen wesentlichen Bestandteil der Abwehr von Krankheitserregern wie Viren, Bakterien, Pilzen, Parasiten und deren Toxinen dar (Raem et al. 2007; Warrington et al. 2011). Es besteht aus einer Vielzahl an verschiedenen Zellen und Molekülen und ist in der Lage, zwischen körperfremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden. Körperfremde Strukturen, die in den Organismus eindringen und eine Immunantwort hervorrufen können, werden als Antigene bezeichnet. Es gibt zwei Abwehrmechanismen, den erregerspezifischen, angeborenen, und den erregerspezifischen, adaptativen. Beide Mechanismen greifen ineinander. Das angeborene Immunsystem schützt beim ersten Kontakt mit den Krankheitserregern. Dazu gehören physiologische Barrieren, wie Schleimhäute und lytische Enzyme in den Körperflüssigkeiten. Gelangen Mikroorganismen trotz dieser Barrieren in den Körper, werden sie durch Zellen des angeborenen Abwehrsystems angegriffen. Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten und neutrophile Granulozyten erkennen Antigene anhand typischer Strukturmerkmale ihrer Oberflächen und zerlegen sie schließlich intrazellulär in Einzelmoleküle. Auf diese Weise werden Krankheitserreger unschädlich gemacht oder zumindest ihre Vermehrung und Ausbreitung im Organismus gebremst. Durch Signalstoffe, die diese Immunzellen sezernieren, können Entzündungen und Fieber auftreten, gleichzeitig werden noch ruhende Immunzellen mobilisiert. Makrophagen präsentieren auf ihren MHC-Rezeptoren Bruchstücke der zerlegten Antigene und leiten so eine Reaktion der Immunzellen der spezifischen Abwehr ein. Parallel dazu werden Antigen-markierte Antikörper von der unspezifischen Abwehr aus dem Organismus entfernt.

1.2.1 Spezifische (adaptive) Immunabwehr

Bei der adaptativen Abwehr reagiert das Immunsystem mit Anpassung, d. h. es werden auf einen individuellen Krankheitserreger abgestimmte Abwehrmaßnahmen eingeleitet. Insbesondere werden Oberflächenmerkmale von Antigenen von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) identifiziert, die diese Information dann an Abwehrzellen weiterreichen, um einen gezielten Angriff einzuleiten. Dies geschieht mittels T- und B-Lymphozyten. Nach Heranreifung der T-Lymphozyten im Thymus gewährleisten diese die zellvermittelte

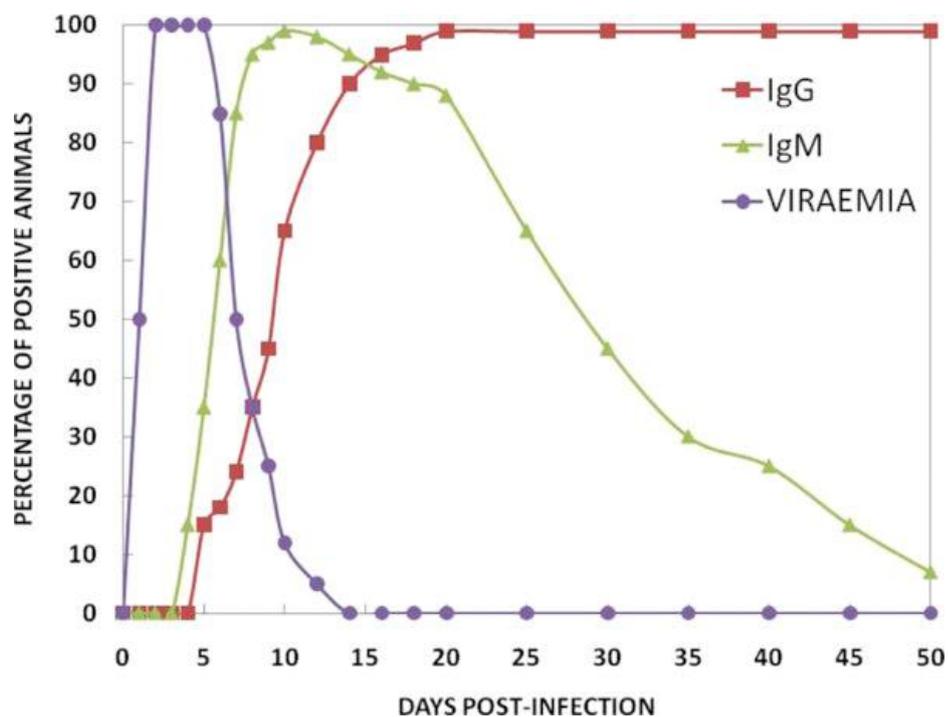


Abbildung 4: Verlauf der Virämie und Antikörperantwort bei RVFV (Pepin et al. 2010). Lizenziert unter CC BY-NC 3.0.

Immunantwort, indem sich einige T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen umwandeln und infizierte Zellen direkt angreifen. B-Lymphozyten dagegen befinden sich nach ihrer Bildung hauptsächlich in Lymphknoten und Milz und wandeln sich als Teil der antikörpervermittelten, humoralen Immunantwort zu Plasmazellen um. Diese produzieren spezielle lösliche Antikörper, die in der Lage sind, bestimmte Antigene extrazellulär nach dem Schlüssel- und Schloss-Prinzip zu erkennen und an sie zu binden und verhindern so ihre Verbreitung im Körper (Neutralisierung). Diese Antikörper können so z. B. das Anheften von Viren an körpereigene Zellen verhindern, indem sie an Proteine auf der Virusmembran binden und diese so blockieren. Bei der Opsonisierung markieren Antikörper Antigene, wodurch Makrophagen zum Phagozytieren angeregt werden. Antikörper der Klasse IgG und IgM sind zudem auch in der Lage, das Komplementsystem, das einen Teil der angeborenen Immunität darstellt, zu aktivieren. Durch den Antigen-Antikörper-Komplex wird der C1-Protein-Komplex in der Kaskade des Komplementsystems aktiviert, was letztlich zur Lyse des Erregers führt. Durch die Bildung von Gedächtniszellen aus B-Lymphozyten reagiert das Immunsystem schneller und wirksamer auf bekannte Antigene.

Die durch die adaptive Immunabwehr produzierten Antikörper sind frühestens vier bis acht Tage nach der Infektion mit RVFV messbar. Sie sind hauptsächlich gegen das virale Nukleoprotein N sowie die viralen Glykoproteine Gn und Gc gerichtet, in geringerem Ausmaß werden auch Antikörper gegen das Nichtstrukturprotein NSs gebildet. Da das NSs-Protein nicht Bestandteil des Viruspartikels ist, kann der gleichzeitige Nachweis von NSs-, N- und Gn/Gc-Antikörpern für die Unterscheidung von infizierten und geimpften Individuen (nur Nachweis von N und/oder Gn/Gc-Antikörpern) herangezogen werden (DIVA-Methode, differentiation of infected and vaccinated animals, Bird et al. 2009). Bei Verwendung von Lebendimpfstoffen funktioniert diese Unterscheidung aber nur bei Verwendung von attenuierten Viren, die kein NSs exprimieren, nicht aber beim Einsatz von älteren Varianten wie dem Smithburn-Stamm (1.2.2), dem ersten Lebendimpfstoff, der bei Nutztieren eingesetzt wurde. Wie bei den meisten Infektionserkrankungen sind die ersten nachweisbaren Antikörper im Verlauf einer RVFV-Infektion IgM-Antikörper. Sie sind bereits in der virämischen Phase gut nachweisbar, verschwinden aber ca. zwei Monate nach der Infektion wieder. Etwa zwei Wochen nach der Infektion werden IgG-Antikörper nachweisbar, die nach dem Abklingen der akuten Erkrankung persistieren und vor Reinfektion schützen (Abbildung 4, Pepin et al. 2010).

1.2.2 RVFV-Impfstoffe

Momentan sind zugelassene RVFV-Impfstoffe für den Menschen nicht verfügbar. Für Tiere sind Impfstoffe erhältlich, die aufgrund der sozioökonomischen Auswirkung des RVFV in den afrikanischen Ländern dringend gebraucht werden. Bei Mäusen versprach die Impfung mittels eines attenuierten Lebendimpfstoffs (Smithburn-Stamm), welcher schon über sechzig Jahre verwendet wird, Immunität für drei Jahre. Bei trächtigen Schafen, Kühen und Ziegen kam es jedoch durch die Utero-Transmission des geimpften Virusstammes in vielen Fällen zu Fehlgeburten und Teratogenität, da er seine Virulenz nicht vollständig verloren hat. Aus diesem Grund wird dieser hoch immunogene Impfstoff nur während eines Ausbruchs und bei nicht-trächtigen Tieren angewendet. Seitdem entwickelte Totimpfstoffe sind zwar sicherer aber weniger effektiv, und müssen zudem mehrfach appliziert werden (Ahmed Kamal 2011).

1.3 Labormethoden zum Nachweis von Virusinfektionen

RVF gehört zu den viralen hämorrhagischen Fiebererkrankungen wie Ebola, Marburg und Lassa, verläuft aber bei ausgewachsenen Tieren und Menschen oft subklinisch (Pepin et al. 2010). Im Falle eines klinischen Verlaufs besteht jedoch die Gefahr einer Organmanifestation und Hämorrhagie. Einer schnellen und zuverlässigen Diagnostik kommt eine Schlüsselfunktion bei der Früherkennung erkrankter Individuen zu, um diese rechtzeitig zu isolieren und so die Verbreitung des Virus einzudämmen. Weiterhin kann die Wahrscheinlichkeit von Folgeschäden, wie z. B. Erblindung, bei früh einsetzender Behandlung reduziert werden, auch wenn diese aufgrund fehlender zugelassener Medikamente gegen RVF derzeit nur auf die Linderung der Symptome abzielen kann.

Die Diagnose einer RVFV Infektion erfolgt direkt durch Virusproteinnachweis in infiziertem Gewebe oder durch Amplifizierung des Virusgenoms mittels PCR. Die quantitative RT-PCR ermöglicht während der akuten Phase der Infektion eine schnelle Identifikation des Virus. Diese Untersuchungen können nur in der virämischen Phase in den ersten zwei bis sieben Krankheitstagen erfolgen, was schwer zu bewerkstelligen und mit einem Infektionsrisiko verbunden ist. Da die Virämie bei infizierten Personen nicht lange besteht, sind gleichzeitige IgM- und IgG-Antikörpersuchtests für den indirekten Virusnachweis sinnvoll. Ab dem vierten Krankheitstag nach der Inkubationszeit ist es möglich, spezifische Antikörper gegen RVFV zu bestimmen (RKI 2007). Weitere serologische Möglichkeiten des RVFV-Infektionsnachweises sind Hämagglutinations- und Komplement-Fixations-Tests, Westernblots sowie ELISAs. Eine sichere Unterscheidung zwischen aktueller und abgelaufener Infektion lässt sich in der Serologie nur mit antikörperklassenspezifischen ELISAs als indirekter Nachweismethode erzielen (Pepin et al. 2010).

1.3.1 ELISA

Das Akronym ELISA, für Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, bezeichnet einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest, bei dem ein positiver Nachweis eines Analyten durch eine enzymatische Reaktion zur Umsetzung eines Farbstoffsubstrates erfolgt.

Vorläufer des ELISAs war der 1960 von Rosalyn Sussman Yalow und Solomon Berson entwickelte Radioimmunoassay (Yalow und Berson 1960). Die Radioaktivität dient dabei als Signal, ob in der Probe das gesuchte Antigen oder der gesuchte Antikörper vorliegt. Die Kopplung von Proteinen (Antikörper mit Enzym) wurde von Stratis Avrameas und G. B. Pierce etabliert. 1966 zeigten Wide und Jerker Porath die Möglichkeit der Immunglobulinadsorption an Kunststoffoberflächen. Mit diesen Voraussetzungen gelang 1971 Peter Perlmann und Eva Engvall aus der Stockholmer Universität in Schweden, sowie Anton Schuurs und Bauke van Weemen in den Niederlanden unabhängig voneinander die Entwicklung des Festphasen-Enzymimmunoassays EIA/ELISA (Key 2007).

Mit verschiedenen ELISA-Methoden können Viren bzw. Virusbestandteile und Antikörper (beides Proteine), Hormone, Toxine und Pestizide in Proben nachgewiesen werden. Im Folgenden wird zunächst auf den Nachweis von Antikörpern im Blutserum eingegangen, dem häufigsten Einsatzzweck des ELISAs. Das Nachweisverfahren beruht auf einer hochspezifischen Antigen-Antikörperbindung. Es existieren verschiedene ELISA-Methoden zum Antikörpernachweis. Im indirekten Assay bindet der nachzuweisende Antikörper an ein spezifisches Antigen, das zuvor (unspezifisch) auf einen festen Träger aufgebracht wurde. Dieser Komplex wird durch einen markierten Sekundärantikörper detektiert, der gegen den Fc-Teil des nachzuweisenden Antikörpers gerichtet ist. Vorteile dieses Tests sind die geringere Zahl an Inkubationsschritten, wodurch unspezifische Bindungen verringert werden, und die Signalverstärkung, da an jeden nachzuweisenden Antikörper mehrere Sekundärantikörper binden können.

Die Markierung des Detektionsantikörpers kann aus radioaktiven Isotopen, fluorogenen oder luminogenen Molekülen oder Enzymen bestehen. Bei der Umsetzung des Substrats durch ein Enzym, meistens Meerrettichperoxidase (englisch: horseradish peroxidase, HRP), welches ein sehr weit verbreitetes und ausgereiftes Verfahren darstellt, erfolgt eine Farbentwicklung und somit der Antikörpernachweis. Mit Hilfe eines Photometers ist es darüber hinaus möglich, die Antikörperkonzentration zu bestimmen. Vor allem in der klinischen Diagnostik lassen sich auf diese Weise viele Proben unter gleichen Bedingungen in kurzer Zeit mit wenigen Verbrauchsartikeln automatisch messen.

Bei einem kompetitiven ELISA fehlt der Detektionsantikörper. An seine Stelle tritt ein enzymmarkierter Kompetitionsantikörper, welcher mit dem Analyten (dem nachzuweisenden Antikörper) um denselben Bindungsplatz an dem immobilisierten Antigen konkurriert. Der Kompetitionsantikörper wird der Probe und einem Satz von Standards mit definierten Mengen des nachzuweisenden Antikörpers zugegeben, so dass die Konzentration des Analyten über eine Referenzkurve bestimmt werden kann. Das Signal ist dabei gegenläufig zur Analyt-Konzentration, d. h. die Farbreaktion verläuft umso stärker, je geringer der Analyt in der Probe konzentriert ist. Mit Hilfe eines solchen Assays lassen sich insbesondere Antikörper quantifizieren, die gegen niedermolekulare Analyten gerichtet sind, welche für eine gleichzeitige Bindung von zwei Antikörpern zu klein sind. Weiterhin ist der Antikörpernachweis mittels eines kompetitiven ELISAs speziesunabhängig, da für die gemessene Bindungskompetition nur die Spezifität, nicht aber die Spezies aus der der nachzuweisende Antikörper stammt, entscheidend ist. Nachteil dieses Verfahrens ist eine vergleichsweise hohe Mindestmenge an zu untersuchendem Analyten.

Bei einem Sandwich ELISA werden nicht Antikörper, sondern immunogene Substanzen im Serum (Antigene) nachgewiesen, insbesondere die infektiösen Erreger selbst bzw. deren Bestandteile wie z. B. Oberflächenproteine. Die Mikrotiterplatte wird hierzu mit einem spezifischen Antikörper beschichtet, an den das nachzuweisende Antigen bindet. Anschließend wird ein Detektionsantikörper zugegeben, welcher ebenfalls an das nun immobilisierte Antigen bindet. Das nachzuweisende Antigen muss über mindestens zwei unterschiedliche Epitope verfügen, damit zwei spezifische Antikörper binden können. Dies ist bei Makromolekülen, wie z. B. Proteinen, möglich. Der Detektionsantikörper ist entweder enzymmarkiert oder wird durch einen weiteren, enzymmarkierten Antikörper nachgewiesen. Durch Zugabe des Substrats wird mittels der enzymkatalysierten Farbstoffreaktion die Antigenkonzentration messbar. Durch Einsatz eines sekundären, enzymgekoppelten Antikörpers wird ein enzymgekoppelter, antigenspezifischer Antikörper vermieden. Der zweite Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper gegen den Fc-Bereich des ersten Antikörpers, er ist somit breiter einsetzbar und zudem auch kostengünstig.

Alle beschriebenen ELISA-Methoden sind heute sichere und einfach durchführbare Routineverfahren mit hoher Spezifität, und stellen ein wertvolles diagnostisches Mittel in einfach ausgestatteten Laboren insbesondere in weniger entwickelten Ländern dar. Die Vorteile der ELISA-Nachweisverfahren im Einzelnen nach Crowther (2000) sind: Einfachheit: Die Durchführung ist einfach und schnell zu erlernen. Das gefärbte Endprodukt kann auch mittels bloßen Auges abgelesen werden. Schnelligkeit: Der Test kann innerhalb von wenigen Stunden ausgeführt werden. Empfindlichkeit: Detektionskonzentrationen von 0,01 bis 1 µg/ml sind erzielbar. Vielseitigkeit: Es existieren verschiedene ELISA-Methoden. Dies ist wichtig bei der Entwicklung neuer Tests und in der Forschung. Kosten: Die Kosten der Reagenzien sind gering. Gefahrlosigkeit: Es kommen sichere, nicht mutagene Reagenzien zum Einsatz. Verfügbarkeit: ELISAs können überall durchgeführt werden, auch in weniger gut ausgestatteten Laboren. Die benötigten Reagenzien sind im Handel erhältlich. Standardisierbarkeit: Sie ist gegeben durch die gute Quantifizierbarkeit der Ergebnisse.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die leichte Handhabung, die schnelle photometrische Auswertung der Messergebnisse sowie die hohe Sensitivität den ELISA zu einem optimalen Screeningtest in der Routinediagnostik machen. Aufgrund der hohen Flexibilität und des großen Probendurchsatzes eignet sich dieses Nachweisverfahren insbesondere für seroepidemiologische Studien.

1.3.2 Bewertung von Nachweismethoden: Sensitivität und Spezifität

Mit Sensitivität und Spezifität werden zwei grundlegende Leistungsmerkmale bezeichnet, die zur Bewertung eines Testverfahrens herangezogen werden (Abbildung 5). Die bei der

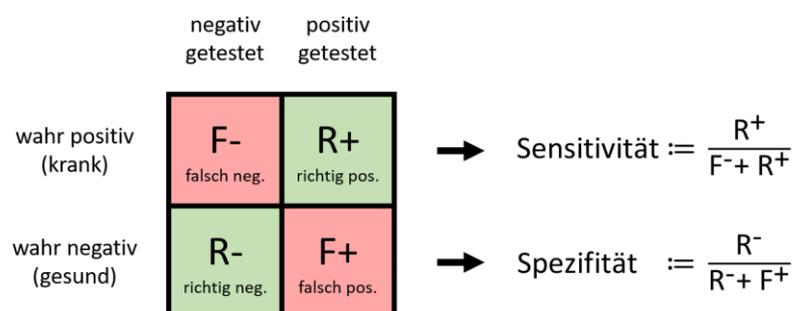


Abbildung 5: Definition von Sensitivität und Spezifität

Testmessung eines bekannten Probensatzes erreichte Sensitivität berechnet sich aus der Zahl der korrekt positiven Ergebnisse, geteilt durch die Gesamtzahl aller tatsächlich positiven Proben ($R^+ + F^-$, Abbildung 5). Sensitivität ist ein Maß für das Nachweisvermögen einer Methode: Je geringer die Konzentration eines Stoffes in einer zu untersuchenden Probe ist, die noch vom Leerwert unterschieden werden kann, desto sensitiver ist diese Methode. In die Sensitivität fließt jedoch nicht die Zahl der falsch positiv detektierten Proben ein, diese werden über die Spezifität erfasst.

Die bei der Testmessung eines bekannten Probensatzes erreichte Spezifität berechnet sich aus der Zahl der korrekt negativen Ergebnisse, geteilt durch die Gesamtzahl aller tatsächlich negativen Proben ($R^- + F^+$, Abbildung 5). Eine hohe Spezifität erlaubt die qualitative oder quantitative Erfassung einer einzigen Substanz unter Ausschluss anderer Komponenten. Die Spezifität macht jedoch keine Aussage darüber, ob tatsächlich auch alle positiven Proben erfasst werden. Eine Kombination von 100% Sensitivität (alle positiven Proben werden korrekt erfasst) und 100% Spezifität (alle negativen Proben werden korrekt erfasst) ist in der Praxis nicht erreichbar.

1.4 Zielsetzung

Das RVF ist in zahlreichen Ländern, insbesondere Afrikas, endemisch. Es tritt bei Menschen und Nutztieren epidemisch auf und stellt daher eine große human- und veterinärmedizinische Herausforderung dar. Zudem fehlt momentan ein Testverfahren, mit dem sowohl Patienten- als auch Nutztierseren speziesunabhängig und zuverlässig auf RVFV-Infektionen getestet werden können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Etablierung eines speziesunabhängigen ELISAs hoher Sensitivität und Spezifität zur Detektion von RVFV-Antikörpern. Derzeit werden zur Detektion von RVFV mittels ELISA zwei Testverfahren eingesetzt: Ein indirekter ELISA, bei dem speziesspezifische Antikörper verwendet werden müssen, sowie ein kompetitiver ELISA, der zwar speziesunabhängig funktioniert, jedoch viel Serum benötigt und relativ unempfindlich ist. Der neu entwickelte Test soll die Vorteile des kompetitiven ELISAs (Speziesunabhängigkeit) und des indirekten ELISAs (hohe Sensitivität und Spezifität) durch

Verwendung eines enzymgekoppelten Antigens anstelle des enzymgekoppelten Sekundärantikörpers miteinander verbinden. Die Sensitivität und Spezifität des neuen Tests sollen mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalyse als Referenzmethode ermittelt und mit den etablierten ELISA-Verfahren verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Standardmaterialien

Im Folgenden sind regelmäßig in den Versuchen verwendete Materialien aufgelistet, die als Standardmaterialien bezeichnet werden:

Tabelle 1: Standardmaterialien

Geräte	
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Inkubator	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Kühlschrank (5 °C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland
Varifuge RI	Heraeus Instruments GmbH, Hannover, Deutschland
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Megafuge 1.0R)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Mehrkanalpipette 50-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsartikel	
Gewebekulturflaschen mit Filter (75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Handschuhe (Latex)	Mikroflex Corporation, Wien, Österreich
Mikroschraubgefäße (2,0 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten mit Spitzen (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter (0,1-10 µl, 1,0-100 µl, 101-1000 µl)	Starlab GmbH, Ahrensberg, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vernichtungsbeutel (300 mm x 200 mm)	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, Deutschland
Labortücher (20,5 cm x 20,0 cm)	Kimberly- Clark Europe Limited, Kings Hill, UK

Medien und Puffer

DMEM	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland
DMEM (gebrauchsfertig)	500 ml DMEM, 50 ml FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 526,6 mg/l Glutamin
PBS	c.c.pro GmbH, Oberdorla, Deutschland

2.2 Biochemische Methoden**2.2.1 Protein-Expression in *E. coli*****Tabelle 2: Materialien**

Standardmaterialien	Siehe Seite 20
Geräte	
Bakterienbrutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hannover, Deutschland
Schüttelinkubator (Certomat H)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Nano Drop ND-1000 Spektralphotometer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Sonden-Ultraschallgerät (Branson Sonifier 250)	Branson
Verbrauchsartikel	
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
Chemikalien	
Ampicillin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Bacto-Agar	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bacto-Tryptone	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Puffer, Lösungen, Medien	
Luria-Bertani Medium (LB-Medium)	5 l 1% NaCl, 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt (20 min bei 120 °C autoklavieren)
LB-Agar mit Amp	10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast Extract, 10 g NaCl, 1 ml Ampicillin [100 µg/ml], 15 g Bacto-Agar, ad 1 l H ₂ O
LB-Medium mit Amp	10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast Extract, 10 g NaCl, 1 ml Ampicillin [100 µg/ml], ad 1 l H ₂ O
LB-Medium mit Amp und Kana	10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast Extract, 10 g NaCl, 1 ml Ampicillin [100 µg/ml], 1 ml Kanamycin (100 µg/ml) ad 1 l H ₂ O
IPTG-Lösung (100 mM)	24 g IPTG, ad 1 l H ₂ O

Zur Anzucht der Bakterien und Induktion werden transformierte *E. coli* (M15) aus Glycerolstock mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, auf LB-Amp-Kana-Nährmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Ein Klon der mit pQE9-RVFV-His-N transformierten Bakterien in M15 wird mit 5 ml LB-Amp-Kana-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C bei ca. 200 rpm geschüttelt. Anschließend wird 1 ml der Übernachtskultur in 50 ml LB-Amp-Kana-Medium überimpft und 24 h bei 28 °C inkubiert.

2.2.1.1 Induktion mittels IPTG

Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) ist ein Galactose-Thioglycosid (S-Glycosid), welches als künstlicher Induktor des Lactose-Operons in *E. coli* genutzt wird, um die rekombinante Expression von klonierten Genen zu einem bestimmten Zeitpunkt zu starten. Dazu werden die gewünschten Gene in Plasmid-Vektoren kloniert, deren Promoter vom Lac-Operon gefolgt wird. Dieses dient dem Lac-Repressor-Protein als Bindestelle, wodurch die Transkription des Gens zunächst verhindert wird. IPTG bindet an den Lac-Repressor, wodurch dieser einer Konformationsänderung unterzogen wird, die seine Wechselwirkung mit dem Lac-Operon inhibiert und so die Expression des Gens startet.

Dazu wurde 10 ml der 24 h-Kultur in 500 ml LB-Amp-Kana-Medium über den Tag bei 28 °C inkubiert bis eine OD von 0,5-0,7 erreicht wird. Die Messung erfolgt am Nanodrop. Vor der Induktion wird 1 ml Kultur abgefüllt, abzentrifugiert und für die Gelauftragung eingefroren. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von 5 ml IPTG-Lösung für eine Endkonzentration von 1 mM IPTG. Nach der Induktion wird die Flüssigkultur über Nacht bei 28 °C und ca. 200 rpm geschüttelt.

2.2.1.2 Ernte der Bakterien

Zur Ernte der Bakterien wird die Übernachtskultur 20 min bei 4000 g abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei -20 °C eingefroren. Die Bakterien werden mittels Ultraschalles aufgeschlossen. Dazu wird das *E. coli*-Pellet in 5 ml Puffer 1b (Tabelle 3) resuspendiert. Der Aufschluss wird mit dem Sonden-Ultraschallgerät durchgeführt. Um eine Überhitzung der Zellen zu verhindern, wird das Röhrchen zunächst auf Eis gestellt und dann sieben Mal für 30 s beschallt. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 12000 g und 4 °C für 25 min. Der Überstand wird in 15 ml Falcon Röhrchen abpipettiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Reinigung des Proteins über die Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose

Tabelle 3: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Rotator	Snijders, Tilburg, Niederlande
Verbrauchsartikel	
Chromatographie Säule Poly-Prep 0,8 x 4 cm	Bio-Rad
Chemikalien	
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Puffer, Lösungen, Medien	
Puffer A für 1 l	50 mM Tris (pH 8,0) - 50 ml 1 M Tris-Stammlösung (pH 8,0) 500 mM NaCl - 100 ml 5 M NaCl-Stammlösung 5 mM MgCl-Einwaage: 1,016 g 10% Glycerin 100 ml 0,1% NP-40 Alternative 1 ml 2 mM Imidazol-Einwaage: 0,136 g
Ansatz direkt vor Gebrauch	Puffer 1: 40 ml Puffer A + 19,6 µl β-Mercaptoethanol 1a: ohne PMSF 1b: 20 ml Puffer 1 + 20 µl PMSF (Stock: 100 mM) auf Eis (!) Puffer 2: 20 ml Puffer A + 9,8 µl β-Mercaptoethanol + 560 µl Imidazol-Stammlösung (1 M)
Elutionspuffer: für 500 ml	20 mM Tris (pH 8,0) 10 ml Stammlösung 100 mM NaCl 10 ml Stammlösung 5 mM MgCl Einwaage: 0,508 g 20% Glycerin 100ml 0,1% NP-40 Alternative - 0,5 ml
Ansatz direkt vor Gebrauch	Puffer 3a: 100 ml Elutionspuffer + 200 µl Imidazol (Stammlösung) Puffer 3b: 100 ml Elutionspuffer + 1,7 g Imidazol (= 270 mM)

Die Affinitätschromatographie ist eine Methode zur Isolation eines Stoffes aus einer Lösung mit Hilfe einer spezifischen Ligand/Analyt-Wechselwirkung. Im Falle der eingesetzten Nickelchelate-Affinitätschromatographie werden Proteine mit Polyhistidinpeptid-Schwanz an eine stationäre Phase aus quervernetztem Agarosegel mittels eines Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure-Chelats (Ni-NTA) spezifisch gebunden. Zur Aufreinigung des mit einem C-terminalen Hexahistidinpeptid-Schwanz versehenen RVFV-N-Proteins (His-tagged RVFV-

N-Protein) aus 2.1.1 wird das Protein-Agarosegel-Gemisch auf eine Trennsäule gegeben. Mehrere Waschschrte dienen der Entfernung unspezifisch gebundener Stoffe, die mit dem Ni-NTA-Liganden keine Bindung eingehen. Die abschließende Elution des gebundenen RVFV-N-Proteins wird durch Verdrängung der Polyhistidinreste durch Imidazol erreicht.

Zur Reinigung der 1,4 ml Ni-NTA-Agarose wird vorbereitend pro 0,5 l Übernachtkultur 2x mit je 10 ml Bidest gewaschen, danach 2x mit 10 ml Puffer 1a. Anschließend wird die Agarose jeweils für 4 min bei 400 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Der Überstand der zentrifugierten Bakteriensuspension wird auf die äquilibrierte Agarose gegeben und mind. 2 h im Kühlraum über Kopf geschwenkt.

Daraufhin erfolgt die Zentrifugation der Bakteriensuspension für 4 min bei 400 rpm, der Überstand wird verworfen und die Agarose mit 1 ml Puffer 2 resuspendiert und in eine Biorad-Leersäule überführt. Die Puffer werden verworfen und die Säule zunächst mit 20 ml Puffer 2, anschließend mit 10 ml Puffer 3a gewaschen. Abschließend erfolgt die Elution jeweils mit 8x 500 µl Puffer 3b. Es folgt die Lagerung der Eluate bei 4 °C.

2.2.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tabelle 4: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Proteingelkammer	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Nukleotide, Standards	
Molekulargewichtsmarker (10-170 kDa)	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
Chemikalien	
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (40%)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Amidoschwarz	TMC- Bio Products, Rockland, USA
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Puffer, Lösungen, Medien

Amidoschwarzlösung	50 mg Amidoschwanz gelöst in 112 ml Methanol, 113 ml H ₂ O
APS [10%]	1 g Ammoniumperoxodisulfat (APS), ad 100 ml H ₂ O
Laufpuffer (SDS-PAGE)	100 ml TGS [10x], 10 ml SDS [10%], ad 1 l H ₂ O
Sammelgel [12%] (SDS-PAGE)	0,25 ml Acrylamid-Bis [40%], 0,325 ml Tris pH 6,8 [1 M], 1,85 ml H ₂ O, 25 µl SDS [10%], 25 µl APS [10%], 2,5 µl TEMED
SDS [10%]	100 g SDS, ad 1 l H ₂ O
Trenngel [12%] (SDS-PAGE)	2 ml Acrylamid-Bis [40%], 1,88 ml Tris pH 8,8 [1 M], 1,03 ml H ₂ O, 50 µl SDS [10%], 50 µl APS [10%], 5 µl TEMED
Tris pH 6,8 [1 M]	121,14 g Tris, ad 1 l H ₂ O, pH-Wert einstellen mit HCl
Probenpuffer	Laemmli Sample Buffer 190 µl mit 10 µl β-Mercaptoethanol
Tris pH 8,8 [1 M]	121,14 g Tris, ad 1l H ₂ O, pH-Wert einstellen mit HCl

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, um Proteine ihrer molekularen Größe und Ionenladung nach aufzutrennen. Dabei wandern im statischen elektrischen Feld die positiv geladenen Moleküle in einer Pufferlösung durch die Maschen einer Gelmatrix zur Anode und die negativ geladenen Moleküle zur Kathode. Proteine als Zwitterionen verhalten sich im elektrischen Feld zunächst neutral, d. h. sie bleiben stationär. Durch das Beladen mit negativer Ladung mittels Natriumdodecylsulfat (SDS, ca. 1,4 g SDS pro 1 g Protein) wird die positive Eigenladung der Proteine bedeckt, so dass diese als nunmehr negativ geladene Moleküle aufgetrennt werden können.

Die SDS-PAGE ist eine diskontinuierliche Gelelektrophorese. Die Gelmatrix besteht aus Sammelgel und Trenngel, die Diskontinuität besteht im unterschiedlichen pH-Wert der Puffer (Gelpuffer, Elektrodenpuffer) und der Porengröße der Gele. Die Wandergeschwindigkeit der Moleküle im Separationsgel ist abhängig von ihrem Molekularradius, große Moleküle durchqueren das Gel langsamer als kleine. Um die beste Auftrennung zu erhalten, sollten die kleinsten, mobilsten Moleküle das Ende des Gels erreicht haben.

Mehrere Proben (Banden) können parallel durch das Gel laufen. Zur präzisen Bestimmung des Molekulargewichts dienen Molekularmassenstandards. Für reproduzierbare Ergebnisse müssen Temperatur und Konzentration der Pufferlösungen konstant gehalten werden.

Zur Probenvorbereitung die Proben (1-8) mit Probenpuffer 1:1 verdünnen (10 µl Probe + 10 µl Probenpuffer), 10 min bei 95 °C aufkochen und kurz abzentrifugieren, danach auf Eis stellen. Anschließend pro verwendetem Gel-Slot 20 µl Probe bzw. 5 µl des Protein-Markers (Page-Ruler) mittels Hamilton-Spritze einfüllen. Die Proben mit einer Spannung von 60 V in das Sammelgel laufen lassen, ab dem Trenngel die Spannung auf 100 V erhöhen. Die Gesamtlaufzeit des Gels beträgt 2 h.

2.2.4 Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran (Western Blot)

Tabelle 5: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Chemidoc XRS System	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Westernblotkammer	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Wippe	Schuett24 GmbH, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsartikel	
PVDF-Membran (0,3 x 3,0 m Rolle)	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Filterpapier	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Chemikalien	
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Difo Magermilchpulver	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Puffer, Lösungen, Medien	
Blockierungspuffer (Western Blot)	12 g Magermilchpulver, 120 ml Waschpuffer (Western Blot)
Transferpuffer (Western Blot)	3 g Tris, 14,4 g Glycin, ad 1 l H ₂ O
Waschpuffer (Western Blot)	100 ml PBS [10X], 5 ml Tween 20, ad 1 l H ₂ O
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien

Zum immunologischen Nachweis werden Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE (2.2.3) auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) transferiert. Diese werden mittels primären Antikörper und sekundären mit Enzym gekoppelten Antikörper spezifisch nachgewiesen. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase, (horseradish-peroxidase, HRP) katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, dessen Lumineszenz detektiert wird.

Dazu werden das Filterpapier und die PVDF-Membran auf Trenngel-Größe zurechtgeschnitten, die Membran in Methanol eingeweicht und mit Wasser abgespült. Die Transferapparatur wird in einer Schale mit Transferpuffer wie folgt von Kathode nach Anode zusammengesetzt: Schwarze Seite der Transferkassette - Schwamm - Filterpapier - Gel - PVDF-Membran - Filterpapier - Schwamm - durchsichtige Seite der Transferkassette. Anschließend wird die Kassette geschlossen und der Farbe entsprechend eingehängt. Der Transfer erfolgt bei 350 mA für 1 h unter Rühren und Kühlen des Puffers. Zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wird die Membran in Blocking Lösung für 1 h bei RT auf einem Taumler inkubiert und anschließend bei 4 °C über Nacht gelagert. Am darauffolgenden Tag erfolgt die Färbung der Membran:

Dazu wird die Membran 1x mit Waschpuffer gespült, dann mit 10 ml Primär-Ak-Lösung (Anti-RVFV-N aus Ziege 1:250 in Blocking Lösung) 1h bei RT inkubiert und anschließend 3x10 min auf dem Taumler gewaschen.

Dann erfolgt die Inkubation der Membran mit 10 ml Sekundär-Ak-Lösung (Anti-goat-IgG 1:250 in Blocking Lösung) für 1 h bei RT. Anschließend wird die Membran 3x10 min auf dem Taumler gewaschen.

Die Detektion der Antikörper-markierten Banden erfolgt mittels ECL Plus Western Blotting Detektionsreagenzien (GE Healthcare) nach Vorgabe des Herstellers. Die Aufnahme und Auswertung erfolgte dabei mit Hilfe eines Biorad Chemidoc XRS Imagers, sowie des zugehörigen Programms Quantity One.

2.2.5 Dialyse der eluierten RVFV-N-Proteinlösung

Dialyse bezeichnet den Austausch gelöster Stoffe über eine semipermeable Membran. Zum Ersetzen des RVFV-N-Eluationspuffers durch PBS wird eine Slide-A-Lyzer Dialysierkassette mit einem Fassungsvermögen von 0,5-3 ml und einer Ausschlussgrenze (Molecular Weight Cut Off, MWCO) von 3500 Da verwendet.

Dazu werden die Eluate 2 bis 5 in die vorhydratisierte Kassette luftblasenfrei pipettiert und bei RT dialysiert. Hierbei wird zunächst 2x nach je 2 h der PBS Puffer gewechselt, und die

Dialyse anschließend bei 4 °C über Nacht fortgesetzt. Darauffolgend wird die Proteinlösung mit einer Pipette vorsichtig aus der Kassette entnommen und bei 4 °C gelagert.

2.2.6 Färbung von Proteingelen

Tabelle 6: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Wippe	Schuett24 GmbH, Göttingen, Deutschland
Puffer, Lösungen, Medien	
Coomassie-Färbelösung	0,1% (w/v) Serva blue R (Coomassie brilliant blue R-250), 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 65% (v/v) ddHO
Entfärbelösung	50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) ddH ₂ O

Der Farbstoff „Coomassie brilliant blue R-250“ bindet an die Proteine, dadurch werden die Proteine durch blaue Banden sichtbar. Der Messbereich beträgt 0,1-5,0 mg/ml Protein. Für geringere Proteinkonzentration ist dieses Verfahren nicht geeignet. Die Probe sollte detergenzienfrei sein, da sonst die Bildung des Farbkomplexes behindert wird. Mittels der Coomassie-Färbung können in Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine mit einer Nachweisgrenze von 0,1 µg detektiert werden.

Dazu werden die Gele 1 h lang in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt, anschließend in Entfärbelösung inkubiert und über Nacht in ddH₂O äquilibriert. Die Trocknung der Gele erfolgt für 3 h in Cellophan-Folie im Gelrockner.

2.2.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Tabelle 7: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Microplate-Reader, Fluostar Optima	BMG Labtech
Verbrauchsmaterialien	
96 Kavitäten-Platte Microlon	Greiner, F Boden
Reagenziensätze	
BCA Protein Assay Kit „High-Range“	Pierce

Der BCA Test ist für die Bestimmung von Proteinmengen im Bereich von 20-2000 $\mu\text{l/ml}$ geeignet. Im Reagenz befinden sich Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung, die durch Proteine zu Cu^{1+} im Zuge einer Biuret-Reaktion reduziert werden. Die Cu^{1+} -Ionen bilden in einem zweiten Schritt mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Komplex. Die Proteinkonzentration kann somit über eine Absorptionsmessung ermittelt werden.

Zur Bestimmung der genauen Proteinkonzentration wird eine Standard-BSA Reihe mittels Pierce BCA Protein Assay Kit „High-Range“ aufgetragen. Die Durchführung erfolgt in 96-Kavitäten Platte mit klarem Flachboden. Die BSA-Standards S1-S8 und Working-Reagents nach Gebrauchsanleitung vorbereiten. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgt die Messung der Absorption bei 560 nm. Die Auswertung erfolgt über eine Standard-Kurve, der Messbereich ist von 20-2000 $\mu\text{l/ml}$ und die Proteinkonzentration ist in den Proben direkt in Einheiten von $\mu\text{g/ml}$ ablesbar.

2.2.8 RVFV-N/HRP-Konjugation mit HRP

Tabelle 8: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Reagenziensätze	
EZ-Link Plus Activated Peroxidase	Thermo Scientific

Zur Gewinnung eines enzymatisch aktiven Konjugats wird das Enzym Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) an das RVFV-N-Protein gebunden. Zu diesem Zweck wird Aldehyd-aktiviertes HRP eingesetzt, das bereits eine reaktive Aldehyd-Gruppe (R-CHO) besitzt, die mit primären Aminen (R-NH₂) des N-Proteins zunächst eine Schiff'sche Base bilden. Diese wird daraufhin mittels Natriumcyanoborohydrid (NaCNBH₃) zu einer stabilen sekundären Amin-Brücke reduziert.

Zur Proteinkonjugation wird 1 ml RVFV-N (Proteinkonzentration 250 μg pro ml) der lyophilisierten Peroxidase zugegeben, anschließend 10 μl NaCNBH₃ unter dem Abzug hinzugefügt und 1 h bei RT inkubiert. Abschließend erfolgt die Reaktion mit 20 μl Quenching Puffer für 15 min bei RT. Die Lagerung des Konjugates erfolgt bei 4 °C.

Im Anschluss an die Kopplungsreaktion zwischen RVFV-N-Protein und HRP erfolgt die Aufreinigung des konjugierten Proteins über Ni-NTA-Agarose (2.2.2) sowie die Bestimmung seiner Konzentration mittels BCA (2.2.7).

2.2.9 Messung der HRP-Aktivität

Tabelle 9: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Microplate-Reader, Fluostar Optima	BMG Labtech
Verbrauchsmaterialien	
Mikrotiter-Platte, Microcolon	Greiner, F Boden
Substrat, TMB	Sigma
Lösungen, Medien und Puffer	
Stopplösung, Schwefelsäure 1 M	Sigma
PBS [1x]	100 ml PBS [10X], ad 900 ml H ₂ O

Zunächst wird farbloses TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin) dem Eluat zugegeben. Durch die Peroxidase erfolgt nun die enzymatische Reaktion, mittels derer eine dunkelblaue Färbung entsteht. Diese Farbreaktion wird durch die Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, die das Enzym (HRP) denaturiert. Aus der Veränderung des pH-Wertes resultiert ein zweiter Farbumschlag von blau nach gelb. Die Absorption der Lösung wird photometrisch bestimmt.

Für jedes Eluat wird ein Doppelansatz in 1:50 Verdünnung in PBS angesetzt, hierbei werden je 50 µl pro Kavität pipettiert. Nach Zugabe von jeweils 50 µl Substrat wird der Ansatz 5 min lang inkubiert. Schließlich wird die Farbreaktion mittels Zugabe von 100 µl Schwefelsäure gestoppt und die Probe mittels eines Spektralphotometers ausgewertet.

Für die Langzeitlagerung des RVFV-N-HRP-Konjugats wird die Konjugatlösung mit Glycerol im Verhältnis 1:1 gemischt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Speziesunabhängiger RVFV-N-ELISA

Tabelle 10: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Waschgerät	Tecan
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Fluostar Optima (BMG Labtech)
Verbrauchsmaterial	
Safe-Lock-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotiter-Platte	Microlon von Greiner, F-Boden
Chemikalien	
Substrat	TMB (Sigma)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lösungen, Medien und Puffer	
Stopplösung	Schwefelsäure (Sigma)
PBS [1X]	100 ml PBS [10X], ad 900 ml H ₂ O
Waschpuffer	1x PBS mit 0,01% Tween
Probenpuffer	Waschpuffer + 10% Skim Milk + 5% BSA
Blockingpuffer	Anti- <i>E. coli</i> -Ak 1:1000 in Probenpuffer (für eine ganze Platte: 20 µl Ak + 20 ml Probenpuffer)
Seren	
127 Humanseren (anonymisiert)	OFA Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
71 Rinderseren	Abdelyahman Said, Institut für Virologie, FU Berlin
20 Rinderseren (geimpfte Tiere), 20 Schafseren (geimpfte Tiere)	Prof. Mohamed A. M. Shalaby, Universität Kairo

Die Kavitäten von Mikrotiterplatten werden über Nacht mit aufgereinigtem RVFV-N-Protein beschichtet. Restverunreinigungen der N-Protein-Lösung durch Proteine des verwendeten (*E. coli*) Expressionssystems können dabei zu unspezifischen Bindungsstellen führen, welche mit entsprechenden (Anti-*E. coli*-)Antikörpern abgesättigt werden.

Die Beschichtung der Mikrotiter-Platte mit His-tagged-RVFV-N-Protein in Verdünnung 1:250 in PBS (bei einer Ausgangskonzentration von 0,25 µg/µl) erfolgt jeweils mit 200 µl pro Kavität. Anschließend folgt die Inkubation 1 h bei RT, danach über Nacht bei 4 °C. Daraufhin wird die Mikrotiter-Platte 5x mit ca. 300 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 1 h bei RT mit 200 µl Blockingpuffer pro Kavität geblockt.

Im ersten ELISA-Inkubationsschritt binden die nachzuweisenden Anti-RVfV-N-Antikörper aus positiven Tier- bzw. Patientenseren an die RVfV-N-Proteinschicht. Durch eine vergleichsweise niedrig eingestellte Konzentration der Antigenbeschichtung der Mikrotiterplatte wird sichergestellt, dass statistisch gesehen lediglich ein einzelner Arm eines jeden Antikörpers eine Antigen-Bindung eingehen kann: Die Mikrotiterplatte wird 5x gewaschen, anschließend erfolgt die Inkubation in Doppelansatz (100 µl pro Kavität) von 1:100 in Probenpuffer verdünnten Proben (Seren, Blank, Positiv-/Negativkontrolle) für 1 h bei RT.

Im zweiten ELISA-Inkubationsschritt werden die gebundenen Anti-RVfV-N-Antikörper mit verdünntem RVfV-N-HRP-Konjugat markiert, das an den jeweils freien zweiten Arm der Antikörper bindet. Der Einsatz des konjugierten Antigens eliminiert die Notwendigkeit eines an HRP gekoppelten zweiten Antikörpers, der gegen den spezieabhängigen Fc-Abschnitt des ersten Antikörpers gerichtet ist: Nach 5x waschen erfolgt die Konjugation. Dazu wird die RVfV-N-HRP 1:50 in Probenpuffer verdünnt und 100 µl pro Kavität für 1 h bei RT inkubiert.

Im dritten ELISA-Inkubationsschritt erfolgt mit Hilfe des gebundenen RVfV-N-HRP-Konjugats eine Farbreaktion. Die Absorption der gefärbten Lösung ist proportional zur Anti-RVfV-N-Antikörper-Konzentration im Probenserum: Die Mikrotiterplatte wird abschließend 5x gewaschen, und 100 µl gebrauchsfertiges Substrat pro Kavität zeitgleich zugegeben. Die Inkubation beträgt 15 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wird die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure pro Kavität gestoppt und die Absorption innerhalb von 5 min mittels Microplate-Reader gemessen.

2.3 Speziesunabhängiger RVFV-Gn-ELISA

Tabelle 11: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Waschgerät	Tecan
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Fluostar Optima (BMG Labtech)
Verbrauchsmaterial	
Safe- Lock-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrotiter-Platte	Microlon von Greiner, F-Boden
Chemikalien	
Substrat	TMB (Sigma)
Stopplösung	Schwefelsäure (Sigma)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lösungen, Medien und Puffer	
PBS [1X]	100 ml PBS [10X], ad 900 ml H ₂ O
Waschpuffer	1x PBS mit 0,01% Tween
Probenpuffer	Waschpuffer + 10% Skim Milk + 5% BSA
Blockingpuffer	anti- <i>E. coli</i> -Ak 1:1000 in Probenpuffer (für eine ganze Platte: 20 µl Ak + 20 ml Probenpuffer)
Seren	
48 Humanseren (anonymisiert)	OFA Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München
15 Rinderseren (geimpfte Tiere), 20 Schafseren (geimpfte Tiere)	Prof. Mohamed A. M. Shalaby, Universität Kairo

Die Kavitäten von Mikrotiterplatten werden über Nacht mit aufgereinigtem RVFV-Gn-Protein beschichtet und unspezifische Bindungsstellen mit anti-*E. coli*-Antikörpern abgesättigt.

Die Beschichtung der Mikrotiter-Platte mit His-tagged-RVFV-Gn Protein in Verdünnung 1:50 in PBS (bei einer Ausgangskonzentration von 0,136 µg/µl) erfolgt jeweils mit 200 µl pro Kavität. Anschließend folgt die Inkubation 1 h bei RT, danach über Nacht bei 4 °C. Daraufhin wird die Mikrotiter-Platte 5x mit ca. 450 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation für 1h bei RT mit 200 µl Blockingpuffer pro Kavität geblockt.

Im ersten ELISA-Inkubationsschritt binden die nachzuweisenden Anti-RVfV-Gn-Antikörper aus positiven Tier- bzw. Patientenseren an die RVfV-Gn-Proteinschicht: Die Mikrotiterplatte wird 5x gewaschen, anschließend erfolgt die Inkubation in einem Doppelansatz (100 µl pro Kavität) von 1:100 in Probenpuffer verdünnten Proben (Seren, Blank, Positiv-/Negativkontrolle) für 1 h bei RT.

Im zweiten ELISA-Inkubationsschritt werden die gebundenen Anti-RVfV-Gn-Antikörper mit den speziesabhängigen Fc-Abschnitt des ersten Antikörpers gebunden: Dazu wird der zweite Antikörper 5x gewaschen und mit HRP Konjugat 1:8000 in Probenpuffer verdünnt. Die Konjugation erfolgt bei Inkubation von 100 µl pro Kavität für 1 h bei RT.

Im dritten ELISA-Inkubationsschritt erfolgt mit Hilfe des gebundenen Sekundäntikörper-
HRP-Konjugats eine Farbreaktion. Die Absorption der gefärbten Lösung ist proportional zur Anti-RVfV-Gn-Antikörper-Konzentration im Probenserum: Die Mikrotiterplatte wird dazu abschließend 5x gewaschen und 100 µl gebrauchsfertiges Substrat pro Kavität zeitgleich zugegeben. Die Inkubation beträgt 15 min bei RT im Dunkeln. Anschließend wird die Reaktion mit 100 µl Schwefelsäure pro Kavität gestoppt und die Absorption innerhalb von 5 min mittels Microplate-Reader gemessen.

2.3.1 Cut-off-Berechnung nach Frey

Für die Auswertung der Ergebnisse von Immunoassays sind nur für wenige Virusproteine definierte Positiv-Standards verfügbar. Sind diese nicht vorhanden, was auch auf RVfV-Proteine zutrifft, wird typischerweise ein Endpunkttiter bestimmt. Dieser Titer ist definiert als Kehrwert der höchsten Analytverdünnung, die noch ein Signal hervorruft, das über dem sogenannten Cut-off-Wert liegt. Es gibt jedoch keine allgemein akzeptierte Regel, um den Cut-off-Wert zu bestimmen. Bei ELISAs wird hierzu oftmals der Mittelwert der Hintergrundabsorption bzw. der Absorption der Negativkontrollen gebildet und die dreifache Standardabweichung addiert. Teilweise ist der Cut-off lediglich ein reiner Erfahrungswert, dem keine reproduzierbare Methodik zugrunde liegt. Diese Verfahren liefern keine statistisch aussagefähigen Informationen bezüglich des Risikos der Übertitration oder falsch niedriger Titer. Daher wird in dieser Arbeit zur Bestimmung des

Cut-off-Wertes die Methode nach Frey et al. (1998) verwendet. Hierbei erfolgt die Berechnung des Cut-off-Wertes durch Bestimmung der oberen Vorhersagegrenze für die Absorptionswerte negativer Seren mit Hilfe der Student-t-Verteilung. Hierzu wird für alle Seren, bei denen mittels IFT keine RVFV-Antikörper nachweisbar sind, der Absorptionswert (x_i) im ELISA bestimmt und der Mittelwert (\bar{X}) gebildet. Der Cut-off berechnet sich daraus nach folgender Formel:

$$\text{Cut-off} = \bar{X} + \text{SD} \cdot f, \text{ mit } f = t \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \text{ und } \text{SD} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

wobei SD die Standardabweichung und f ein Gewichtungsfaktor ist. Im Faktor f ist mittels t das Konfidenzintervall $(1-\alpha)$ berücksichtigt, für das der Cut-off Wert berechnet wird. Dabei stellt t das $(1-\alpha)$ -Quantil der einseitigen t-Verteilung mit $n-1$ Freiheitsgraden dar, das z. B. aus statistischen Tabellen oder durch die Excel-Funktion T.INV zugänglich ist.

2.4 Virologische Methoden

2.4.1 Anzucht von RVFV-Klon-13 in Zellkultur

Tabelle 12: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Zelllinien	
Vero E6	Epithelzellen aus der Niere der Äthiopischen Grünmeerkatze, ATCC, Manassas, USA
Viren	
RVFV-Clone-13	Rift Valley Fever Virus, apathogenes RVFV-Isolat mit Deletion im NSs-Gen (Lopez et al. 1995)
Lösungen, Medien und Puffer	
NTE	10 mM Tris, pH 6,5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

Je $5 \cdot 10^5$ Vero-E6-Zellen werden in zwei 25-cm²-Gewebekulturflaschen in 5 ml Medium ausgesät und bis zum Erreichen einer ca. 50%igen Konfluenz bei 37 °C inkubiert. Die Infektion erfolgt nach 4 Tagen. Dazu wird der Überstand aus den Gewebekulturflaschen verworfen und die Zellen mit 20 µl Virussuspension (RVFV-Klon-13) für 1 Stunde unter 5% CO₂ bei 37 °C inkubiert. Auf Grundlage der ausgesäten Zellzahl wird die für die Infektion optimale MOI berechnet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Volumen mit 25 ml

Medium (DMEM) aufgefüllt und die Zellen bis zum Auftreten eines zytopathischen Effekts (CPE) über Nacht unter 5% CO₂ bei 37 °C inkubiert. Die Ernte des Überstands mit abgelösten, infizierten Zellen erfolgt bei Erreichen des CPE, nach etwa 2 Tagen.

Zur Virusernte werden 27 ml des geernteten Überstands für 7 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Rest bei -80 °C zur Lagerung tiefgefroren. Der Überstand der Zentrifugation wird abpipettiert, mit 1,48 ml 5 M NaCl + 10,8 ml 30% PEG 8000 in NTE gegeben und für 30 min bei 4 °C invertiert. Nun wird die Probe erneut für 60 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das gewonnene Pellet zur Lagerung bis zur folgenden RNA-Isolation (2.5.1) auf -80 °C tiefgefroren.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung aus Viruspartikeln

Tabelle 13: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Spektralphotometer NanoDrop	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Chemikalien	
2-Propanol (Isopropanol)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol abs.	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD RNA-TriFast	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Es wird nach der peqGOLD RNA-TriFast-Arbeitsanleitung von Peqlab gearbeitet. Die Methode basiert auf Flüssigphasen-Separation. Das Reagenz beinhaltet Guanidinisothiocyanat zur Lyse von Viren und Inaktivierung von RNAsen sowie Phenol, in dem sich Proteine und DNA lösen. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation findet die Phasentrennung statt. Die Proteine befinden sich in der Phenolphase, DNA in der Interphase und RNA in der oberen, wässrigen Phase. Nun folgen die RNA-Präzipitation mittels Isopropanol und die abschließende Resuspendierung der RNA in Wasser.

Das in (2.4.1) gewonnenen Pellet wird unter Zugabe von 2 ml TriFast Lysepuffer für 5 min aufgetaut und per Vortex aufgeschüttelt, bis es sich vollständig gelöst hat. Nun wird 0,4 ml Chloroform zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Abschließend wird 10 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Es entstehen zwei makroskopisch sichtbare Phasen, diejenige mit klarer Flüssigkeit wird abgenommen und auf Eis gestellt. 4 µl Glykogen (35 µg/µl) und 1 ml Isopropanol werden zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert und darauffolgend für 20 min bei 6000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird 2x mit 1 ml 75% EtOH gewaschen und erneut für 20 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird für 30 min trocknen gelassen, dann in 50 µl ddH₂O resuspendiert und die RNA Konzentration mittels eines Spektralphotometers gemessen (2.5.2). Die isolierte RNA wird bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Spektrometrische Konzentrationsmessung von RNA

Tabelle 14: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Spektralphotometer NanoDrop	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Chemikalien	
ddHO ultrafiltriertes, deionisiertes Wasser	

Die Konzentration wässriger DNA- oder RNA-Lösungen kann direkt mittels Lichtabsorption in einem Spektralphotometer gemessen werden. Die Basen der Nukleinsäuren besitzen bei einer Messwellenlänge von 260 nm ihr Absorptionsmaximum. Aromatische Aminosäuren und Phenole absorbieren dagegen bei 280 nm, so dass durch die Messung der Absorption (als Optische Dichte, OD) bei diesen Wellenlängen eine Abschätzung der Reinheit der Nukleinsäurelösung möglich ist. Nach der Eichung des Photometers auf den entsprechenden Probenpuffer werden zur Messung 1,5 µl Probenvolumen eingesetzt.

2.5.3 Reverse Transkription

Tabelle 15: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Chemikalien	
ddH ₂ O ultrafiltriertes, deionisiertes Wasser	
DEPC-Wasser	Carl Roth GmbH & CoKG, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Enzyme, Nukleotide	
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) 100 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Random Hexamer Primer	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Superscript III	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Puffer	
5X First-Strand Buffer	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA

Reverse Transkription beschreibt die Übersetzung eines RNA-Genoms in cDNA. Dazu ist das Enzym Reverse Transkriptase notwendig, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Zunächst wird ein RNA-DNA-Hybridstrang gebildet, wobei die RNA in DNA geschrieben wird. Anschließend wird die RNA durch den Rnase-Anteil des Enzyms abgebaut und der DNA-Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang ergänzt. Durch den Einsatz des rekombinant hergestellten Enzyms Superscript III wird die RNA nicht abgebaut und kann so wiederholt abgelesen werden, die Herstellung eines DNA-Doppelstrangs unterbleibt. Unter Verwendung von randomisierten Primern wird die RNA komplett in einzelsträngige DNA übertragen.

Zur Durchführung einer Reverse Transkription werden an einer Sterilbank pro Probe zunächst 1 µl Random Hexamer Primer (100 ng) mit 1 µl dNTP und 11 µl Bidest vermischt, dann 1 µl RNA hinzugefügt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wird die Probe für 1 min auf Eis gestellt. Daraufhin werden 4 µl First Strand Puffer, 1 µl DTT (0,1 M) und 1 µl Superscript III zugegeben, die Probe in einen Thermocycler überführt und das

Inkubations-Programm gestartet (5 min/25 °C, 60 min/50 °C, 15 min/70 °C, Endtemperatur 8 °C). Die Lagerung der erzeugten cDNA erfolgt tiefgefroren bei -20 °C.

2.5.4 Touchdown PCR

Tabelle 16: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
PCR-Bank	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien	
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Chemikalien	
Destilliertes Wasser für PCR	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Enzyme, Nukleotide	
Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) 100 mM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	PRIME GmbH, Hamburg, Deutschland
Puffer	
PCR Puffer [10x]	PRIME GmbH, Hamburg, Deutschland

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist die Amplifizierung eines bestimmten DNA-Abschnitts (Templates) in vitro möglich. Dabei finden mehrere Zyklen von Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase statt.

Das Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs (Denaturierung) in Einzelstränge erfolgt bei 95 °C, es folgt die spezifische, komplementäre Anlagerung der Oligonukleotide (Primer) an die DNA bei 58 °C (Primerhybridisierung), anschließend werden die Einzelstränge mit neuen, freien Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase bei 68 °C verlängert (Elongation, Tabelle 17). Durch Wiederholung der drei Schritte der PCR wird das Ausgangsprodukt exponentiell vervielfältigt. Die hier verwendete, hitzestabile Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* besitzt keine Korrekturlesefähigkeit, stattdessen eine hohe Produktivität und Amplifikationsgeschwindigkeit. Weiterhin dient sie der Vorbereitung des PCR-Produkts auf die folgende

Tabelle 17: Herstellung eines um die für die TA-Klonierung notwendigen A-Enden verlängerten, spezifischen PCR-Produktes mit Taq-Polymerase.

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes (49 µl)

35 µl Bidest, 5 µl MgCl₂, 5 µl 10x PCR-Puffer, 1 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Primer for (10 µM), 1 µl Primer rev (10 µM), 1 µl Taq-Polymerase und 1 µl Template.

Template: RVFV Klon 13 cDNA, für Negativkontrolle durch Wasser ersetzen

Primerpaar: RVFV-GnS-for / RVFV-GnS-rev

Thermocycler-Profil: Touchdown

	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s] /(Wiederholungen)
1	Denaturierung	95	120
2	Denaturierung	95	30 (10x)
3	Primer Annealing	58	30 (10x)
4	Elongation	68	90 (10x)
5	Denaturierung	95	30 (25x)
6	Annealing	53	30 (25x)
7	Elongation	68	90 (25x)
8	Finale Elongation	68	300
9		10	bis Entnahme

TA-Klonierung (2.5.6). Weitere Bestandteile der PCR sind dNTPs für die Anlagerung an den DNA-Strang und Magnesiumchlorid, das Einfluss auf die Primer-DNA-Bindungsstabilität hat und für die Polymerase spezifische Puffer.

Bei der Touchdown PCR ist das Thermocycler-Profil gegenüber der Standard-PCR abgewandelt, um die Amplifikatsmenge unter Erhalt hoher Spezifität zu steigern. Durch eine zunächst hohe Annealing-Temperatur nur knapp unterhalb der Denaturierungstemperatur ist die Bindung des Primers an das DNA-Template höchst spezifisch, allerdings typischerweise auch wenig effizient. Dies wird durch das Absenken der Annealing-Temperatur im nächsten Schritt kompensiert. Aufgrund des bereits im ersten Schritt erzeugten spezifischen Amplifikats ist die Bindung des Primers an ein korrektes Template nun statistisch bevorzugt, wodurch die übermäßige Amplifikation unspezifischer DNA-Sequenzen vermieden wird. Bei der hier durchgeführten PCR wurde cDNA als Template verwendet, welche zuvor durch Reverse Transkription aus RNA hergestellt wurde.

2.5.5 Agarosegelelektrophorese und -extraktion

Tabelle 18: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Geräte	
ChemiDoc XRS System	Bio Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gel-Elektrophoresekammer (groß)	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Mikrowellengerät	AFK Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Verbrauchsartikel	
Skalpell	
Nitril-Handschuhe	GE Healthcare Europe NV, Brüssel, Belgien
Chemikalien	
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Nukleotide, Standards	
6x Orange Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
DNA-Längenstandard (100 bp, Ultra Low Range)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Puffer, Lösungen, Medien	
Agarosegel (0,8%ig)	100 ml TAE, 0,83 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid-Lösung
Agarosegel (1%ig)	100 ml TAE [1x], 1 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid-Lösung
Agarosegel (3%ig)	100 ml TAE [1x], 3 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid-Lösung
TAE [1x]	40 ml TAE [50x] add. 1969 ml H ₂ O
TAE [50x]	242 g Tris: 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
Reagenziensätze	
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymoclean Research Corporation, Orange, USA

Zur Bestimmung der Länge von Nukleinsäure-Strängen (DNA oder RNA) kommt die Agarosegelelektrophorese zum Einsatz. Agarosegele bestehen aus vernetzten Agarosepolymeren, deren Porengröße konzentrationsabhängig ist. Je konzentrierter das Gel, desto kleiner sind die Poren. Agarosegele sind mit einer Porengröße von ca. 100 nm großporiger als Acrylamidgele mit ca. 10 nm. Die negativ geladenen Nukleinsäurestränge können in solch einem Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Länge nach aufgetrennt und mit bekannten Strängen verglichen werden (2.2.3).

Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wird dem Agarosegel Ethidiumbromid zugesetzt, ein Farbstoff, der mit den Basen der DNA interkaliert. Interkaliertes Ethidiumbromid

fluoresziert unter UV-Bestrahlung im sichtbaren Spektrum (Emissionsmaximum 580-590 nm) wodurch leuchtende Banden im Agarosegel entstehen. Die Menge der aufgetrennten DNA kann durch die Fluoreszenzintensität der entsprechenden Banden abgeschätzt werden. Für präparative Gele sollte die DNA möglichst kurz mit UV-Licht beleuchtet werden, um Schäden an der DNA zu vermeiden.

Zum Gießen des Agarosegels wird die Agarose mit TAE im Mikrowellengerät aufgeköcht, bis alle Klümpchen verschwunden sind und anschließend bis auf ca. 60 °C abkühlen gelassen. Währenddessen werden Mini-Gelkammern (100 x 70 x 0,5 mm) für kleine Gele aufgebaut, dann das Gel mit Ethidiumbromid versetzt und luftblasenfrei in den Gelträger gegossen. Nach 10 min hat das Gel seine Endfestigkeit erreicht. Nun wird die Elektrophoresekammer mit Gelträger, vorbereiteten Proben, Laddermarker und Laufpuffer gefüllt. Die Laufzeit beträgt 60 min bei 100 V über der Kammer angelegter Spannung. Anschließend wird das Gel auf einen UV-Transilluminator überführt und fotografiert.

Zur Gelextraktion werden 3 Taschen des Kamms zusammengeklebt und die Gelschale (125 x 80 x 7,5 mm für ein großes Gel) verwendet. 45 µl des Amplifikats werden mit 9 µl 6x Orange Dye versetzt und 50 µl der resultierenden Lösung eingefüllt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wird mit einem Skalpell die Bande unter UV-Licht eng ausgeschnitten und mittels des Zymoclean-Gel-DANN-Recovery-Kits gereinigt:

Dazu wird das Gel mit der 3-fachen Menge ADB Puffer versetzt und bei 55 °C für 10 min inkubiert, bis es sich gelöst hat. Anschließend wird es in eine Zymo-Spin-Säule transferiert. Die Zentrifugation erfolgt bei 10.000 g für 30 s, dann wird der Filter (Zymo-Spin) 2x mit 200 µl Wash-Puffer jeweils bei 10.000 g für 30 s gewaschen. Zur Eluation der DNA aus dem Filter werden 6 µl Bidest hinzugefügt und abschließend bei 10.000 g für 60 s zentrifugiert. Die Lagerung der gereinigten DNA erfolgt bei 4 °C.

2.5.6 TA-Klonierung: Ligation und Transformation

Tabelle 19: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Verbrauchsmaterial	
LB-Amp-Platten	
Puffer, Lösungen, Medien	
One Shot INVαF	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
X-Gal	40 mg/ml in Dimethylformamid
SOC-Medium	25 ml: 0,05% NaCl, 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 20 mM Glucose, 2,5 mM KCl und 10 mM MgCl ₂ ad 25 ml mit H ₂ O bidest auffüllen
Enzyme	
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Plasmide	
pCRII (4kb TA-Klonierungsvektor)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Bakterienstämme	
INVαF' (Genotyp F' <i>endA1 recA1 hsdR17 (rk-, mk+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1 φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 λ-</i>)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Reagenziensätze	
Dual Promotor TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
One Shot INVαF' Competent Cells	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Die TA-Klonierung ist ein schnelles Klonierungsverfahren, das ohne den Einsatz von Restriktionsenzymen auskommt (Abbildung 6). Dabei wird das zu klonierende PCR-Produkt um ein einzelnes Desoxyadenosin-Nukleosid (A) am 3-Hydroxy-Ende (3') verlängert, typischerweise durch Einsatz einer Taq-Polymerase während der PCR. Ein derart vorbereitetes Insert kann daraufhin direkt in einen vorbereiteten, linearisierten Vektor (Abbildung 7) ligiert werden, an dessen 3'-Enden sich jeweils ein Desoxythymidin-Nukleosid (T) befindet (Abbildung 6). Während der Ligation mittels einer DNA-Ligase werden die 3'-Enden mit den 5-Phosphat-Enden (5') der Nukleinsäuresegmente durch Ausbildung von Phosphodiesterbindungen verknüpft und der Plasmidring dabei geschlossen.

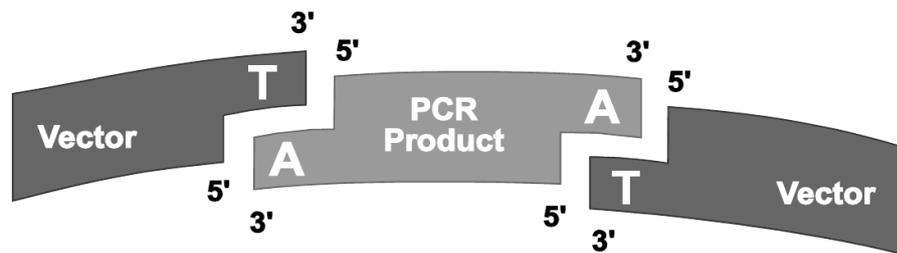


Abbildung 7: Prinzip der TA-Klonierung

Das verwendete Plasmid pCRII erlaubt eine schnelle Unterscheidung von transformierten, Kanamycin-resistenten *E. coli* Kolonien, die das gewünschte Plasmid mit Insert tragen, von solchen, die das unveränderte Plasmid aufgenommen haben über die Methode der Blau-Weiß-Selektion. Grundlage hierfür ist das bakterielle Enzym β -Galaktosidase, welches aus zwei Untereinheiten (α und ω) besteht, die unabhängig voneinander exprimiert werden können und anschließend zum aktiven Enzym assoziieren. Dieses kann das artifizielle Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl spalten. Letzteres oxidiert spontan zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, welches eine tiefblaue Farbe besitzt.

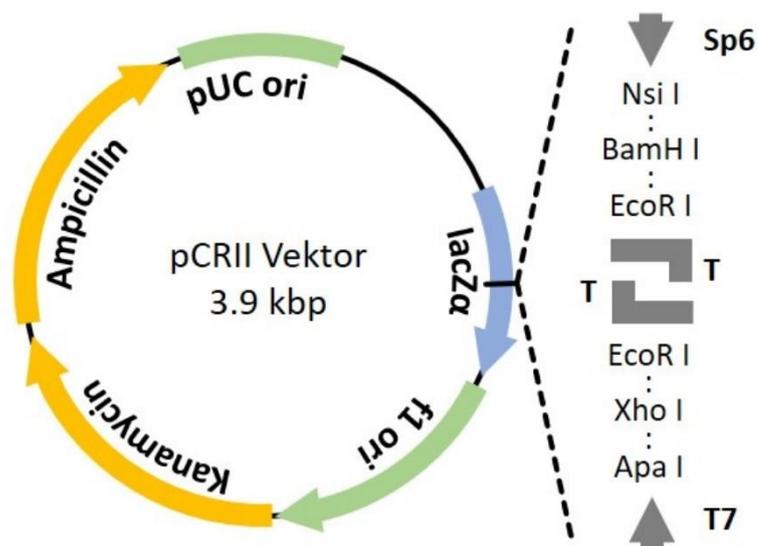


Abbildung 6: TA-Klonierungsplasmid pCRII.

Die genetische Information für die α -Untereinheit (lacZ α) der β -Galaktosidase befindet sich auf dem Plasmid pCRII, die genetische Information für die ω -Untereinheit ist Teil des

Genoms der zu transformierenden Bakterien. Die TA-Klonierungsstelle des Plasmids pCRII befindet sich innerhalb des lacZ α Gens. Wird hier cDNA eingefügt, wird der Leserahmen der α -Untereinheit zerstört, d. h. nach Transformation kann in den Bakterien keine α -Untereinheit und somit keine funktionelle β -Galaktosidase gebildet werden. Solche Bakterienkolonien erscheinen auf Selektionsagar, der das Selektionsmedium Kanamycin und das chromogene Substrat X-Gal enthält, weiß. Bakterien, die dagegen das unveränderte Plasmid pCRII aufgenommen haben, können funktionelle α -Untereinheiten exprimieren, die dann mit den ω -Untereinheiten zur enzymatisch aktiven β -Galaktosidase assoziieren (sog. Transkomplementation). Solche Bakterienkolonien erscheinen auf dem Selektionsagar blau und können somit leicht von den gewünschten weißen Kolonien unterschieden werden.

Nach Ligation der Insert-DNA in die linearisierte Vektor-DNA erfolgt die Transformation des Ligationsproduktes in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen. Durch einen Hitzeschock werden die Bakterienzellen zur Aufnahme des Plasmids gebracht. Zuvor wird die Zellmembran mit Calciumchlorid behandelt, wodurch sich die abstoßenden Kräfte der DNA und der Bakterienzellmembran verringern. Die so entstehenden Poren in der Membran ermöglichen die Aufnahme der DNA innerhalb weniger Minuten.

Aufgrund der Antibiotikaresistenz und der Färbung (Blau-Weiß-Selektion) werden die Transformanten selektiert und die Plasmide durch eine Plasmid-DNA-Minipräparation isoliert. Abschließend werden die rekombinanten Plasmide über einen analytischen Restriktionsverdau identifiziert.

2.5.6.1 Durchführung der Ligation

Zur Ligation werden 3 μ l frisch gereinigtes PCR-Produkt, 1 μ l 10x Ligationspuffer, 2 μ l pCRII Vektor, 3 μ l Bidest und 1 μ l T4 DNA-Ligase gemischt und bei 14 °C über Nacht inkubiert.

2.5.6.2 Durchführung der Transformation

Zur Transformation werden kompetente Bakterien (INV α F') etwa 10 min auf Eis aufgetaut und SOC-Medium auf RT gebracht. 2 μ l Ligationsansatz werden zur Bakteriensuspension

pipettiert, vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt bei 42 °C für 30 s, woraufhin 250 µl SOC-Medium zugegeben werden und die Flasche für 1 h bei 37 °C und 300 rpm leicht geschüttelt wird. Währenddessen werden 2 LB-Amp-Platten vorbereitet: Um ein Blau-Weiß-Screening durchführen zu können, wird je Platte 40 µl X-Gal Lösung ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.6.3 Auswertung der gewonnenen Klone

Die gewachsenen Klonkolonien werden nach Anzahl und Farbe differenziert. Alle weißen Kolonien enthalten das Insert, die blauen nicht. 10 Klone werden gepickt und überprüft, ob sie das Plasmid enthalten. Dazu werden die einzelnen Klone in 4 ml LB-Amp-Medium 37 °C über Nacht auf dem Schüttelinkubator kultiviert. Gleichzeitig wird eine Referenzplatte angelegt.

2.5.7 Isolation der Plasmid-DNA aus Bakterien

Tabelle 20: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Reagenziensätze	
peq GOLD Plasmid Miniprep Kit I	peQlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymoclean Research Corporation, Orange, USA

Die in einer Transformation erzeugten Klone werden mittels einer Plasmid-Minipräparation und anschließendem Restriktionsverdau im Hinblick auf die Länge der enthaltenen Plasmid-DNA untersucht. Durch Alkalibehandlung werden dabei sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA zunächst denaturiert und ausgefällt. Im daraufhin eingesetzten Hochsalzpuffer renaturiert ausschließlich Plasmid-DNA und geht wieder in Lösung, wonach sie von chromosomaler DNA, RNA und Proteinen per Zentrifugation getrennt werden kann. Die Plasmid-DNA aus dem Überstand wird gewaschen, eluiert und der DNA-Gehalt an einem Spektralphotometer gemessen.

Die Minipräparation von Plasmid-DNA mit peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Zur Anzucht der Bakterien wird die Übernachtskultur angeimpft, es folgen die alkalische Lyse der Bakterien und die Neutralisierung des Lysats. Die Bindung der DNA an die Silikamembran erfolgt durch Beladen der HiBind-DNA-Säule. Nach Waschen und Zentrifugation der Säule erfolgt zur Entfernung zellulärer Bestandteile und anderer Kontaminationen mit speziellen Puffern. Anschließend wird die Säule trocken zentrifugiert und die Elution der DNA erfolgt mit Bidest. Dann folgt die Messung des DNA-Gehalts am Spektralphotometer und die Lagerung der Proben bei 4 °C.

2.5.8 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Tabelle 21: Materialien

Standardmaterialien	siehe Seite 20
Enzyme	
FastDigest BamHI	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
FastDigest NdeI	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
PowerScript DNA Polymerase	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Zur Untersuchung des Restriktionsmusters eines rekombinanten Plasmids werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Diese aus verschiedenen Bakterienstämmen synthetisierten Enzyme schneiden die Phosphodiesterbindungen der DNA an bekannten, spezifischen Stellen, woraus aus der ringförmigen Plasmid-DNA eine linearisierte Form entsteht. Die Aktivität und Spezifität der Enzyme werden durch pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration und den Gehalt an Kationen (vor allem Mg^{2+}) beeinflusst. Die Länge der DNA-Fragmente, die durch den Restriktionsverdau entstehen, wird durch Gelelektrophorese bestimmt.

Der Ansatz eines typischen analytischen Doppelverdaus von rekombinanten Plasmiden setzt sich wie folgt zusammen: 1 µl Plasmid-Minipräparations-DNA, 1 µl 10x FD-Puffer, 1 µl FastDigest Nde I, 1 µl FastDigest BamHI, 6 µl ddH₂O. Dieser wird für 20 min bei 37 °C auf einem Thermoblock inkubiert. Abschließend werden zu 10 µl Restriktionsansatz 2 µl 6x-Auftragungspuffer zugegeben und 10 µl davon in einem analytischen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.5.5).

2.5.9 Sequenzierung

Als DNA-Sequenzierung wird die Bestimmung der Nukleotidabfolge in einem DNA-Molekül bezeichnet. Dies erfolgt nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977), wobei fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide verwendet werden. Diese Technik nutzt die Eigenschaft der DNA, aus einem Doppelstrang zu bestehen, der in zwei Einzelstränge aufgetrennt werden kann, woraufhin sich mit Hilfe von Primer und DNA-Polymerase die komplementären Basen anlagern.

Nach Reinigung der Plasmid-DNA mittels pegGOLD-Plasmid-Miniprep-Kit-I erfolgt die Kontroll-Sequenzierung durch ein externes Labor (SeqLab, Göttingen). Dazu wird ein Sequenzierungsansatz (Tabelle 22) verschickt, der die verwendeten Primer miteinschließt.

Tabelle 22: Sequenzierungsansatz (7 µl)

1,7 µl	Template DNA (ca. 600 ng)
2,0 µl	Primer (10 pmol/µl)
3,3 µl	ddH ₂ O

2.6 Immunfluoreszenztest als Referenzmethode

Ein Immunfluoreszenztest (IFT) ist ein einfach zu handhabendes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern, das die am häufigsten angewendete, standardisierte Methode zur Sicherung einer klinischen Verdachtsdiagnose darstellt. Dabei wird eine Probe künstlich infizierter Zellen mit dem zu testenden Serum inkubiert, so dass alle antigenspezifischen, im Serum vorhandenen Antikörper an infizierte Zellen binden. In einem zweiten Schritt werden gebundene Antikörper nun mit einem sekundären Antikörper, der gegen die Serumspezies gerichtet und mit einem Fluoreszenzmarker versehen ist, nachgewiesen.

Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei das Kriterium für die Bewertung des Serums als positiv oder negativ. Die Auswertung erfolgt unter dem Mikroskop und unterliegt der Subjektivität des Betrachters. Mit einem gewissen Maß an Übung ist die Klassifikation eines typischen Fluoreszenzbildes (Abbildung 8) jedoch ausreichend sicher und reproduzierbar. Im Gegensatz zum ELISA ist der IFT ein Verfahren, das meistens nur qualitative Ergebnisse liefert. Quantitative Daten sind nur mit großem Aufwand durch das Auszählen positiver Zellen zu erheben, was fehleranfällig ist.

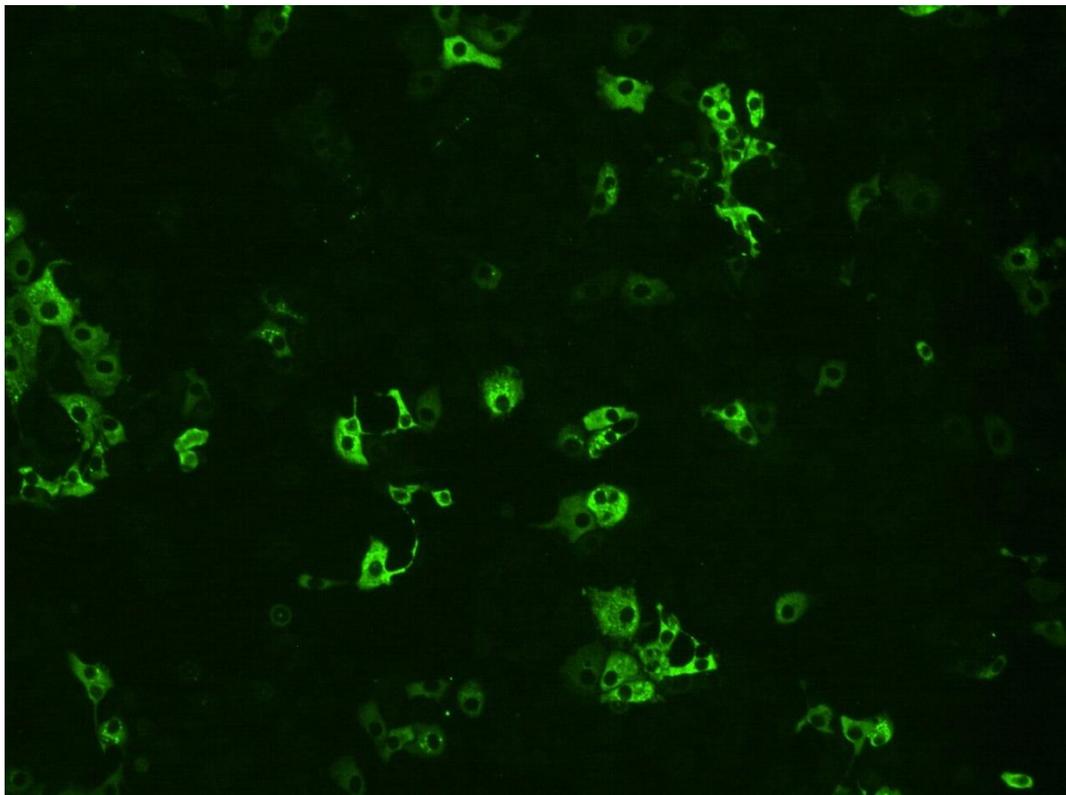


Abbildung 8: Das Immunfluoreszenzbild von mit RVFV-Antikörper-positivem Humanserum behandelten fixierten Testzellen zeigt die typische, starke zytosolische Färbung.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des speziesunabhängigen, nichtkompetitiven ELISAs zur Detektion von RVFV-Nukleoprotein-Antikörpern

Zur Etablierung eines speziesunabhängigen ELISAs zur Detektion von RVFV-Nukleoprotein-Antikörpern mit verbesserter Spezifität soll ein enzymmarkiertes Antigen anstatt eines enzymmarkierten Antikörpers eingesetzt werden. Dazu wird rekombinantes RVFV-N-Protein benötigt, das zum einen auf der ELISA-Mikrotiterplatte als Antigencoating aufgebracht wird und zum anderen als HRP-Konjugat für die speziesunabhängige Detektion zum Einsatz kommt (3.1.3).

3.1.1 Expression und Aufreinigung des RVFV-Nukleoproteins

Zur Herstellung des RVFV-N-Proteins wurde auf einen bei -80 °C tiefgefrorenen Stock an genveränderten Darmbakterien der Gattung *Escherichia coli* (*E. coli*) zurückgegriffen, die das künstliche Plasmid pQE9-RVFV-N enthalten. Dabei handelt es sich um ein Plasmid mit induzierbarem Promoter, auf dem die Sequenz des um ein N-terminales His-Tag ergänzten N-Proteins kodiert ist (Abbildung 9).

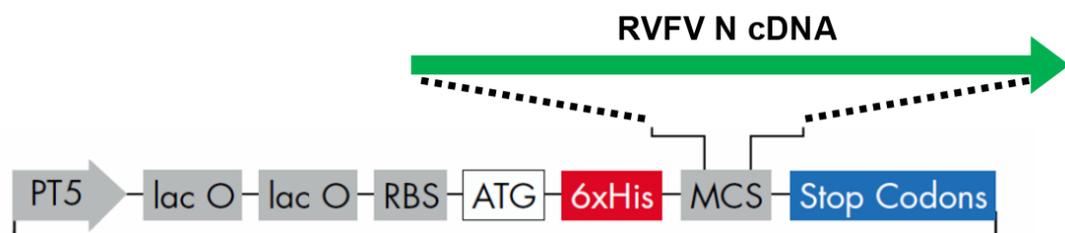


Abbildung 9: Expressionskassette des Plasmids pQE9-RVFV-N für die RVFV-Nukleoproteinexpression in *E. coli* M15 (pREP4).

Nach Auftauen und Vermehren eines Teils dieses Stocks wurde die Proteinexpression mittels IPTG-Induktion initiiert (2.2.1.1). Nach exponentiellem Wachstum wurden die Bakterien geerntet, lysiert und zentrifugiert, wonach sich das N-Protein frei im Überstand befand. Mittels Affinitätschromatographie (Ni-NTA) wurden die gewünschten Proteine von sonstigen zellulären Proteinen, anderen Biomolekülen und unspezifischen Stoffen getrennt,

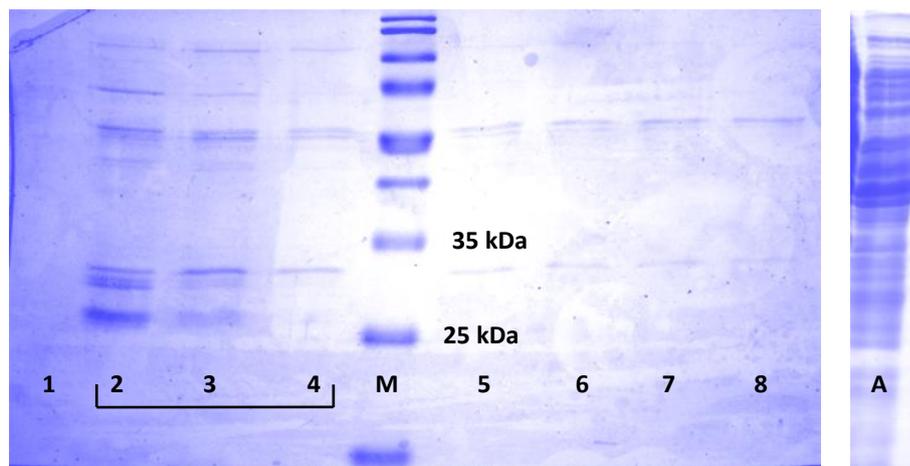


Abbildung 10: SDS-Gel zur Proteinkonzentrationsbestimmung mit Coomassie-Blau gefärbt.

Es wurden acht Fraktionen auf das SDS-Gel aufgetragen (1-8). RVFV-N Monomere sind bei 25 kDa, RVFV-N-Multimere ab 35 kDa zu sehen. M: Molekulargewichtsmarker (10-170 kDa), Fraktionen 2-4 sind die gepoolten Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration. A: Ausgangsmaterial, *E. coli* Lysat.

angereichert und anschließend per SDS-PAGE (Abbildung 10) und Western Blot (Abbildung 11) analysiert (2.2.3, 2.2.4). Zur Identifikation der gesuchten RVFV-N-Monomere mit einem Molekulargewicht von 25 kDa wurde ein Molekulargewichtsmarker verwendet, der als Referenz für Moleküle im Bereich von 10-170 kDa dient. Bei drei von acht untersuchten Eluatfraktionen (Abbildung 10, Fraktionen 2-4) waren Banden an der richtigen Position zu erkennen. RVFV-N Multimere sind entsprechend größere Moleküle (oberhalb 35 kDa), die langsamer durch das Separationsgel wandern und im oberen Bereich des Gels zu finden sind (Abbildung 10). Durch den Nachweis mit Anti-His-tag-Antikörpern im Western Blot konnten die RVFV-N Monomere schließlich bestätigt werden (Abbildung 11).

3.1.2 Konjugation des RVFV-Nukleoproteins mit HRP

Der nächste Schritt zu einem funktionalen N-ELISA ist die Kopplung des Enzyms HRP an das RVFV-Nukleoprotein (2.1.8), um die Detektion von RVFV-Nukleoproteinantikörpern per Farbstoffreaktion zu ermöglichen. Dazu wurde der RVFV-N-Proteinlösung lyophilisierte Peroxidase, Cyanoborohydrid und ein Quenching-Puffer zugegeben. Nach der Inkubation

des Konjugats wurde die Protein-Enzymlösung erneut mittels Ni-Affinitätschromatographie gereinigt, um sie von nicht gebundenem HRP zu befreien.

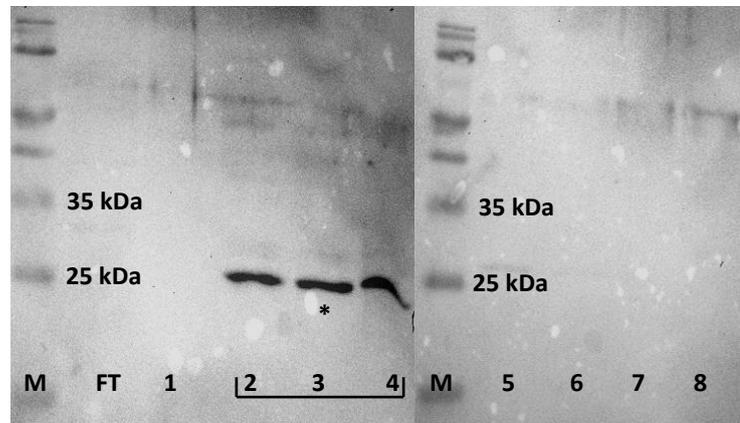


Abbildung 11: Western Blot des exprimierten RVFV-N-Proteins. Nachweis der His-RVFV-N-Banden (*) mittels Anti-His-tag-Antikörpern. M: Molekulargewichtsmarker (10-170 kDa), FT: Flow-Through nach beladen der Säule, Fraktionen 1-8, mit gepoolten Fraktionen 2-4.

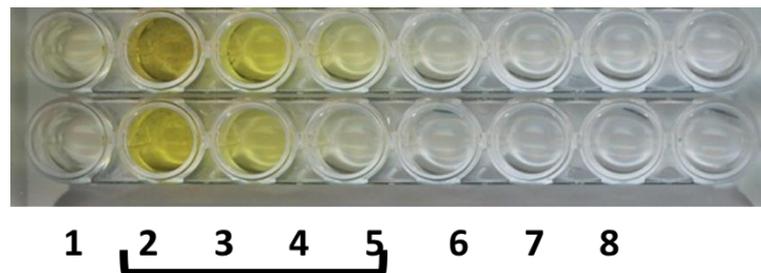


Abbildung 12: HRP gekoppelter RVFV-Nukleoproteine. Es wurden die vier Fraktionen (2-5, aus acht) mit der höchsten HRP-Aktivität vereinigt.

Nach der Konjugation des RVFV-Nukleoproteins mit HRP ließ sich das gekoppelte Enzym per Western Blot zunächst nicht nachweisen, woraufhin die Messung der HRP-Aktivität als alternatives Verfahren zum Einsatz kam. Dazu wurde jedes Eluat in PBS verdünnt, jeweils Substrat zugegeben und die einsetzende Farbreaktion anschließend mit Schwefelsäure gestoppt. Der Grad der Färbung als Maß für die Enzymaktivität wurde mittels eines Spektralphotometers gemessen. Die vier Fraktionen mit der höchsten Aktivität (Abbildung 12) wurden vereinigt, um ein Konjugat mit hoher Enzymaktivität zu erhalten. Durch Dialyse wurde die Pufferlösung durch PBS ausgetauscht und schließlich die Proteinkonzentration mittels BCA bestimmt. Der gemessene Wert betrug 200 µg/ml.

3.1.3 Durchführung des ELISAs

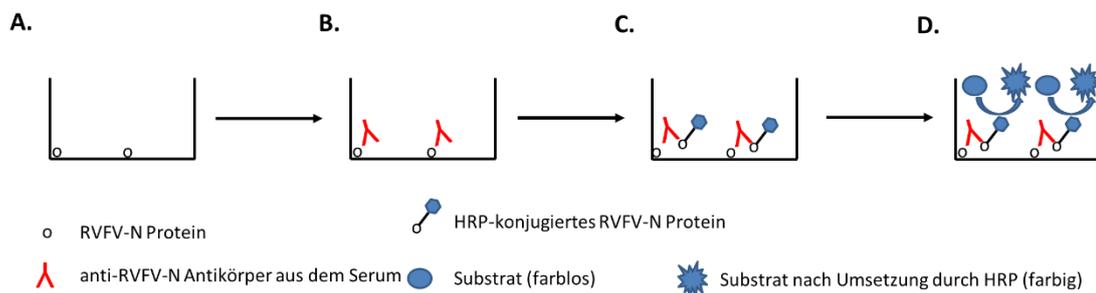


Abbildung 13: Aufbau des neuentwickelten, speziesunabhängigen N-ELISAs.

Das Protokoll zur Durchführung des N-ELISAs ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt. Zunächst werden Mikrotiterplatten mit RVFV-N-Proteinen als Antigen beschichtet (A). Nach Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen binden spezifische Anti-RVFV-N Antikörper mit nur einem Arm an das N-Protein (B), was durch die niedrig eingestellte Konzentration der Antigenbeschichtung erreicht wird. Das RVFV-N-HRP-Konjugat bindet an den zweiten Arm des nachzuweisenden Antikörpers (C). Der Gebrauch des konjugierten Antigens eliminiert dabei den üblichen zweiten, HRP konjugierten, speziesabhängigen Antikörper, der gegen den Fc-Bereich des ersten Antikörpers gerichtet wäre. Durch Substratzugabe kommt es bei positivem Serum zum Farbumschlag (D), wobei die Absorption proportional zur Konzentration des Antikörpers ist.

3.2 Vergleich mit anderen Nachweismethoden

Zur Bewertung des in dieser Arbeit entwickelten N-ELISAs wurde er mit bereits verfügbaren ELISAs verglichen: Ein speziesabhängiger Sandwich-ELISA (s-ELISA) zum Test von Mensch- und Nutztierseren, der bereits zuvor in der Abteilung Virologie, UMG, entwickelt wurde, sowie der einzige kommerziell erhältliche RVFV-ELISA (ID Screen RVF, IDvet, im Folgenden bezeichnet als k-ELISA). Dabei handelt es sich um einen speziesunabhängigen, kompetitiven ELISA, dessen Zulassung aber auf Nutztierseren beschränkt ist und der somit nicht zum Test von Humansen für diagnostische Zwecke eingesetzt werden darf.

Als Referenzverfahren zur Detektion von RVFV-Antikörpern wurde ein IFT (Euroimmun) herangezogen und alle Testseren in einer Verdünnung von 1:10 anhand ihres

Fluoreszenzbildes beurteilt. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Werte für Sensitivität und Spezifität der verwendeten Nachweisverfahren wurden gemäß der Definition dieser Größen in Abschnitt 1.3.2 berechnet. Die Ergebnisse des IFT dienten dabei als Wahr-positiv- bzw. Wahr-negativ-Referenz.

3.2.1 Anpassung eines kommerziell verfügbaren RVFV-IFT als Referenzmethode

Der in dieser Arbeit verwendete, kommerziell verfügbare RVFV-IFT (Euroimmun) ist nur für Tests mit Humanseren geeignet. Er wurde daher für die Detektion von Antikörpern aus Schaf- und Rinderseren durch Verwendung der entsprechenden FITC-markierten, speziesspezifischen Sekundärantikörper angepasst. Auf diese Weise führten Positivseren aller getesteten Spezies zu einem charakteristischen Fluoreszenzbild und hoben sich deutlich von Negativseren ab, bei denen lediglich eine schwache, unspezifische Hintergrundfärbung auftrat. Die korrekte Zuordnung aller Seren war somit mit hoher Sicherheit gegeben (Abbildung 8).

3.2.2 Ergebnisse der Serodiagnostik

Die Leistungsfähigkeit des N-ELISAs bei der Klassifikation von Humanseren wurde anhand einer Gruppe von 127 anonymisierten Seren aus Tansania (Heinrich et al. 2012) im Vergleich zum s-ELISA ermittelt (Abbildung 14).

Die Lagerung und Anonymisierung der Proben erfolgte dabei durch die Projektpartner. Für den experimentellen Teil dieser Arbeit wurden vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr Aliquots der anonymisierten Seren (durchnummeriert) zur Verfügung gestellt, die ausschließlich zum Testen auf RVFV-Antikörper mittels ELISA bestimmt waren.

Zur Berechnung des Cut-off Werts für ein Konfidenzniveau von 99% ($\alpha=0,01$) wurden $n=73$ IFT-negative Seren herangezogen. Es ergab sich für die Absorption der negativen Seren ein durchschnittlicher Mittelwert (\bar{X}) von 0,026 mit einer Standardabweichung (SD) von 0,037. Nach der Methode von Frey (2.3.1) ergab sich mit $t(0,99; n-1)=2,379$ ein Cut-off von 0,115.

Damit galten Humanseren mit gemessenen optischen Dichten bzw. Extinktionswerten von über 0,115 als positiv, darunter oder gleich als negativ.

Beide Tests erreichten bei einer Probenverdünnung von 1:100 eine Sensitivität von 87%. In Bezug auf seine Spezifität schneidet der N-ELISA mit 99% gegenüber dem s-ELISA mit 90% wesentlich besser ab, da er die Zahl der falsch-positiven Ergebnisse um zwei Drittel reduziert. Im direkten Vergleich weichen die Einzelergebnisse der beiden ELISAs in 10 Fällen voneinander ab, wobei es sich fast ausschließlich um falsch-positive Ergebnisse des s-ELISA handelt.

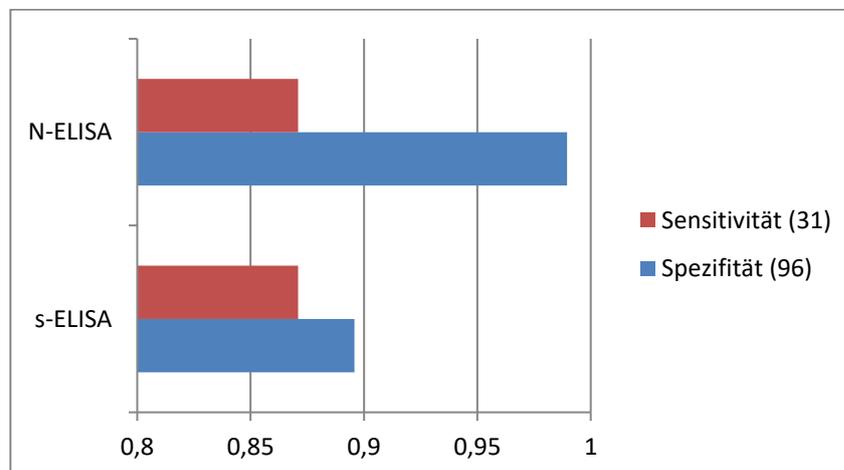


Abbildung 14: Vergleich des N-ELISAs mit einem zuvor in der Abteilung Virologie, UMG, entwickelten, speziesabhängigen Sandwich-ELISA (s-ELISA) anhand von Humanseren. In Klammern ist die Anzahl an Seren angegeben, die in die Berechnung von Sensitivität und Spezifität eingeflossen sind.

Die Leistungsfähigkeit des N-ELISAs in Bezug auf Nutztiere wurde im Vergleich zum kommerziellen k-ELISA anhand von 71 Rinderseren ermittelt, die 2004 während einer Feldstudie in Ägypten zusammengetragen und seitdem fortwährend bei 4 °C gelagert wurden. Zusätzlich wurde auf Daten einer externen Querschnittsuntersuchung zurückgegriffen, die mittels eines indirekten ELISAs (i-ELISA) erhoben wurden (Abbildung 15). Die genannten Seren und Daten wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. A. Said, Institut für Virologie, FU Berlin.

Zur Bestimmung des Cut-off Wertes für ein Konfidenzniveau von 99% ($\alpha=0,01$) standen $n=48$ IFT-negative Seren zur Verfügung. Es ergab sich für die Absorption der negativen Seren ein durchschnittlicher Mittelwert (\bar{X}) von 0,075 mit einer Standardabweichung (SD) von 0,038. Nach der Methode von Frey (2.3.1) ergab sich mit $t(0,99; n-1)=2,408$ ein Cut-off-Wert von 0,167. Damit galten Tierseren mit gemessenen optischen Dichten bzw. Extinktionswerten von über 0,167 als positiv, solche mit Werten darunter oder gleich als negativ.

Bei der Analyse der Rinderseren schnitt der k-ELISA in Punkto Sensitivität mit 85% am besten ab, da er alle bis auf zwei IFT-positive Proben korrekt detektierte. Sowohl N- als auch i-ELISA schnitten mit 54% bzw. 15% schlechter ab. Mit 100% erreicht der N-ELISA die höchste Spezifität (Abbildung 16), gefolgt von k-ELISA (91%) und i-ELISA (83%).

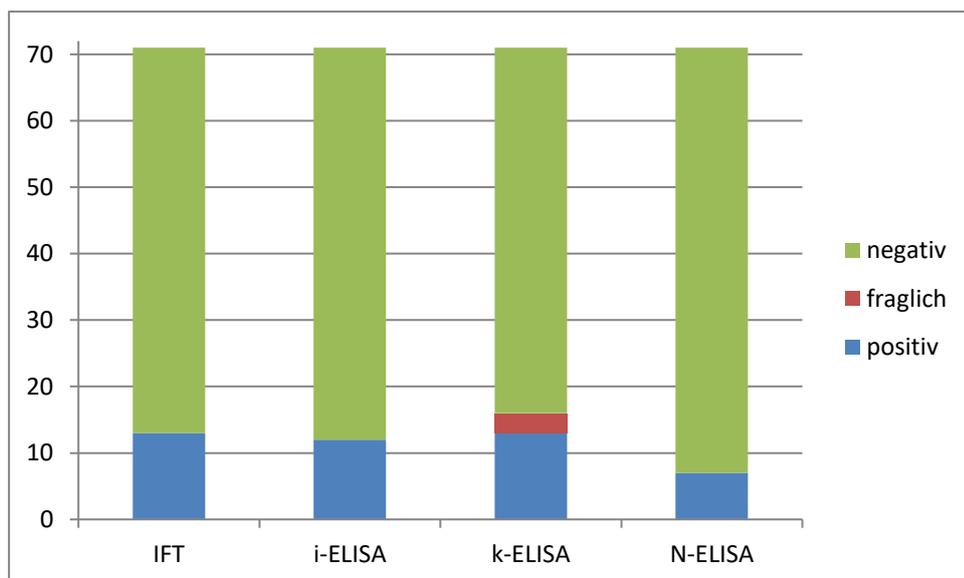


Abbildung 15: Aggregierte Messergebnisse der verwendeten Testverfahren an einer Gruppe von 71 Rinderseren. Immunfluoreszenztest (IFT), indirekter ELISA (i-ELISA), kommerzieller, kompetitiver ELISA ID Screen RVF (IDvet, hier: k-ELISA) und der Gegenstand dieser Arbeit (N-ELISA).

Um die Auswirkungen einer erfolgten Impfung auf die Testergebnisse zu untersuchen, wurden weitere Gruppen von je 20 Seren geimpfter Rinder und Schafe getestet, die freundlicherweise von Prof. M. A. H. Shalaby, Universität Kairo, zur Verfügung gestellt wurden. Auf der Gruppe der geimpften Rinder versagten beide Tests. Weder mit N- noch mit k-ELISA konnten Antikörper nachgewiesen werden. Auch eine Steigerung des im N-ELISA eingesetzten Serumvolumens auf 5 µl vermochte nichts an diesem Ergebnis zu ändern.

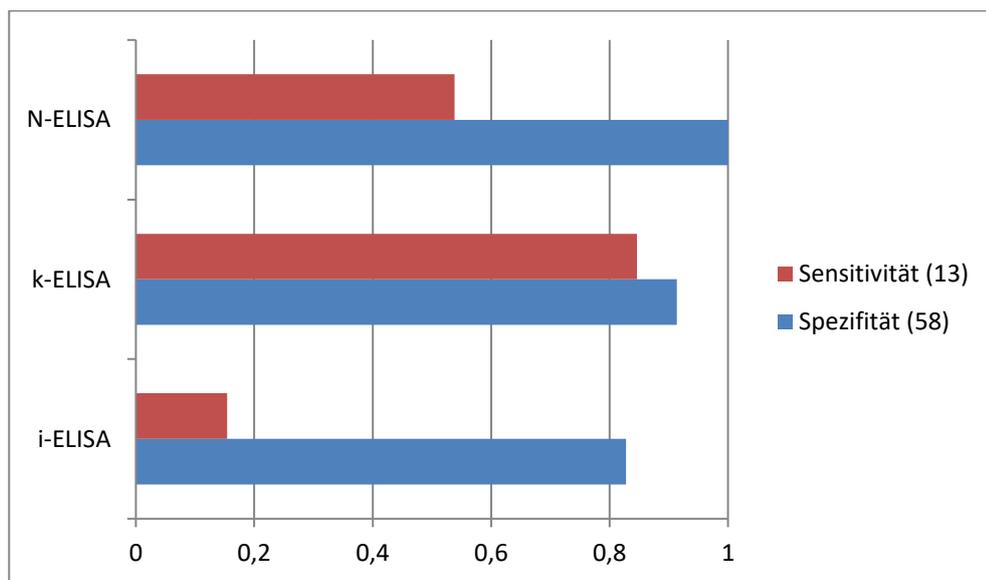


Abbildung 16: Vergleich des N-ELISAs mit dem kompetitiven, kommerziellen Verfahren ID Screen RVF (IDvet, hier: k-ELISA) sowie einem indirekten Sandwich-ELISA (i-ELISA) anhand von Rinderseren. In Klammern angegeben ist die Anzahl an Seren, die in die Berechnung von Sensitivität bzw. Spezifität der Verfahren eingeflossen sind.

Dagegen wurden auf der Gruppe von Schafseren 25% Sensitivität im k-ELISA (bei 50 µl) und 55% im N-ELISA (5 µl) erzielt. Aufgrund der großen Ergebnisschwankungen zwischen Rindern und Schafen stellt sich die Frage nach der Robustheit der Tests. Dazu wurden alle Schafseren einer zusätzlichen Verdünnungsreihe unterzogen und erneut getestet. Es zeigte sich, dass die Sensitivität des k-ELISAs bereits bei einer Verdünnung von 0,1 auf null abfiel, wo sie hingegen beim N-ELISA erst ab einer Verdünnung von 0,05 auf 20% sank (Abbildung 17).

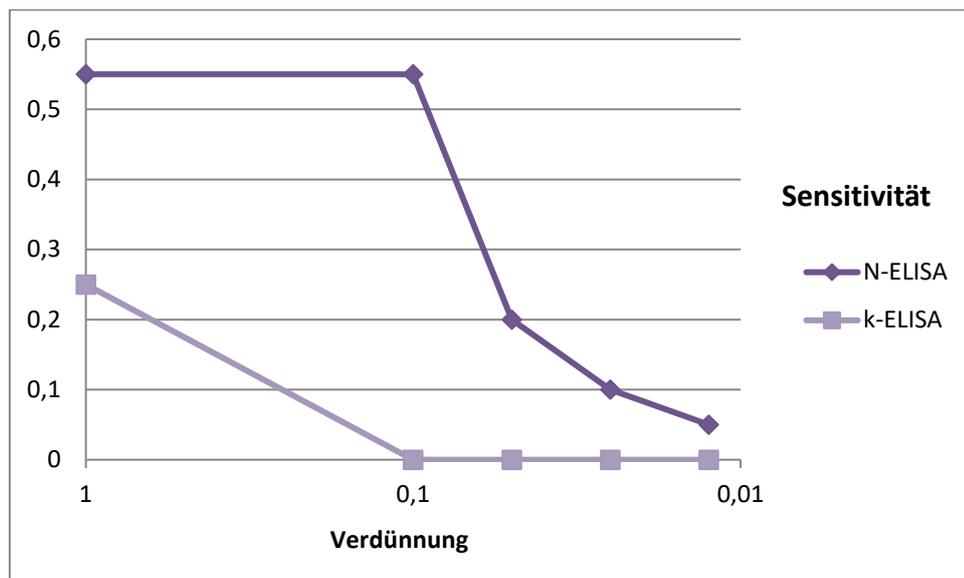


Abbildung 17: Sensitivität des N-ELISAs auf Nukleoprotein-Antikörper in Seren von geimpften Schafen bei zunehmender Verdünnung, im Vergleich zum kommerziellen Verfahren IDvet (k-ELISA).

3.3 Entwicklung eines ELISAs zur Kontrolle des Impfschutzes

Zur Kontrolle eines Impferfolges wird ein ELISA benötigt, der spezifisch jene Antikörper detektiert, die langfristigen Schutz vor einer RVFV-Infektion verleihen (4.2). Dies sind in der Regel diejenigen Antikörper, die gegen das Gn/Gc-Protein auf der Virushülle gerichtet sind, da sie die Gn/Gc-vermittelte Bindung und das Eindringen des Virus in die Zelle und somit eine Infektion verhindern. Zu diesem Zweck wurde das RVFV-Gn-Protein kloniert und exprimiert, um es als Coating der Mikrotiterplatte eines RVFV-Gn-ELISAs einsetzen zu können.

Als Klonierungsstrategie wurde zunächst eine TA-Klonierung der RVFV-Gn-DNA in das pCRII-Plasmid gewählt, gefolgt von einer Umklonierung in das pQE9-Plasmid mittels Restriktionsenzymen. Dies erlaubt es, das RVFV-Gn-Protein induzierbar zu exprimieren und erleichtert die spätere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (2.2.2) über das in der pQE9-Expressionskassette enthaltene His-Tag (Abbildung 9).

3.3.1 Herstellung des Plasmids pCRII-RVFV-Gn über TA-Klonierung

3.3.1.1 Amplifikation der cDNA des RVFV-Gn-Oberflächenproteingens

Für die Expression des RVFV-Gn-Oberflächenproteins wurde zuerst RNA aus einer Kultur RVFV infizierter Säugierzellen isoliert (2.5.1), in DNA umgeschrieben (2.5.3), diese dann mit Hilfe von RVFV-Gn spezifischen Primern (RVFV-GnS-for und RVFV-GnS-rev) amplifiziert (2.5.4) und über ein präparatives Agarosegel isoliert (2.5.5). Die amplifizierten DNA-Fragmente hatten eine Größe von ca. 1300 Basenpaaren.

3.3.1.2 TA-Klonierung des pCRII-RVFV-Gn Plasmids

Die RVFV-Gn-DNA wurde mittels TA-Klonierung (2.5.6) in das pCRII-Plasmid eingebracht. Aufgrund der beschränkten Effizienz dieses Schrittes war es erforderlich, *E. coli*-Kulturen mit RVFV-cDNA von solchen zu trennen, die das unveränderte pCRII-Plasmid exprimieren. Dies erfolgte mit Hilfe der sogenannten Blau-Weiß-Selektion (2.5.6). Die entsprechenden Kulturen wurden auf diese Weise anhand der nicht vorhandenen Blaufärbung selektiert und in Flüssigkulturen vermehrt, woraus schließlich eine große Menge Plasmid-DNA isoliert werden konnte (2.5.7).

3.3.1.3 Kontrollverdau und Sequenzierung des hergestellten rekombinanten pCRII-RVFV-Gn Plasmids

Die Kontrolle des hergestellten rekombinanten Plasmids erfolgte per Verdau (2.5.8). Dazu wurden zehn Plasmidproben auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und durch Gelelektrophorese (2.5.5) aufgetrennt. Alle Probenspuren zeigen Banden der erwarteten Größen (Abbildung 18). Eine abschließende Sequenzierung (2.5.9) ergab das Vorliegen des fehlerfreien Inserts in der gewünschten Orientierung.

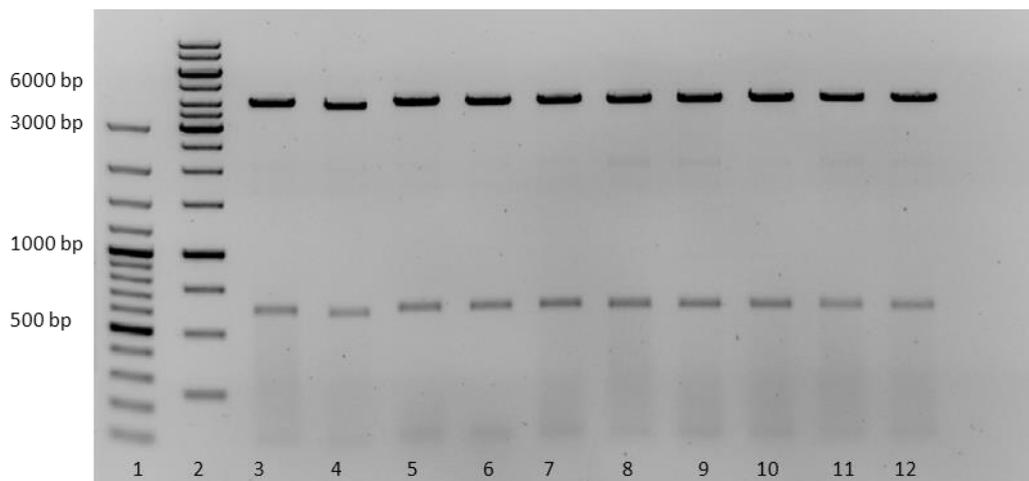


Abbildung 18: Agarosegel des Kontrollverdaus des hergestellten rekombinanten Plasmids. Spur 1: DNA-Längenstandard (100 bp), Spur 2: DNA-Längenstandard (1 kbp), Spur 3-12: Vektorbanden bei etwa 4 kbp und 100 bp, Insertbande bei 600 bp.

3.3.2 Subklonierung von RVFV-Gn-cDNA in pQE9

Zunächst wurde der Expressionsvektor pQE9 (Abbildung 19) in einem Doppelverdau mit BamHI und Sall innerhalb des Klonierungsbereichs geschnitten und linearisiert. Um eine Autoligation auszuschließen, wurde der Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt.

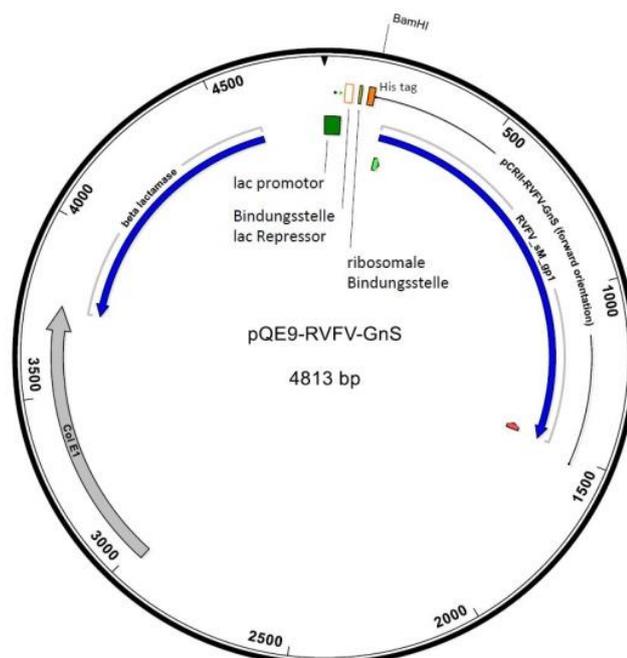


Abbildung 19: Das konstruierte Plasmid pQE9-RVFV-Gn.

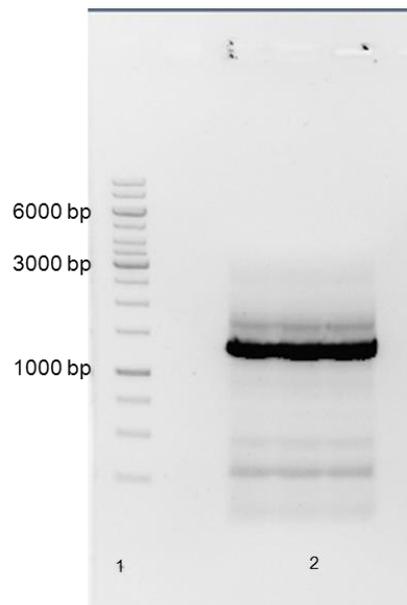


Abbildung 20: Elektrophoretische Auftrennung der RVFV-Gn-cDNA-Fragmente im Agarosegel. Spur 1: DNA-Längenstandard (1 kbp), Spur 2: RVFV-Gn (1300 bp).

Aus dem zuvor klonierten Vektor pCRII-RVFV-Gn wurde mit Hilfe eines BamHI/XhoI-Doppelverdau die RVFV-Gn-cDNA ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe eines präparativen Agarosegels isoliert (Abbildung 20). Für die anschließende Ligation wurden die Gn-cDNA im 1:4-Verhältnis zum Vektor eingesetzt. Nach erfolgter Reaktion wurden die Ligationsansätze in kompetente *E. coli* XL1 Blue transformiert (2.5.6.2). Analog zum Vorgehen in (3.3.1) wurden die Klonkolonien der Farbe nach differenziert, vermehrt und das rekombinante Plasmid isoliert. Die erreichte Konzentration des Plasmids wurde spektrophotometrisch (2.5.2) gemessen, eine Sequenzanalyse (2.5.9) ergab das Vorliegen des fehlerfreien Inserts in der gewünschten Orientierung.

3.3.3 Expression des RVFV-Gn-Proteins

Nach der erfolgreichen Herstellung des Expressionsplasmids für RVFV-Gn wurde das rekombinante Protein in *E. coli* exprimiert (2.2.1). Verschiedenen Proteinproben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.3). Als nächstes wurden diese Proben auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend im Western Blot mittels Chemilumineszenz-Reaktion (ECL) nachgewiesen (2.2.4).

Es wurden sechs Proteinfractionen auf das SDS-Gel aufgetragen anschließend aufgetrennt. Die Proteinkonzentration nimmt von Fraktion eins bis sechs ab. Die aufgereinigten Proteine wurden mittels zweier Immunoblots nachgewiesen, bei denen primäre Anti-RVfV-Antikörper aus Ziege mit sekundären, Peroxidase-markierten (HRP) Anti-Ziege-Antikörpern kombiniert (Abbildung 21) oder HRP-anti-His-tag Antikörper (Abbildung 22) zur Detektion verwendet wurden. Zur Dialyse für die weitere Verwendung des Proteins wurden die vier Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration vereinigt.

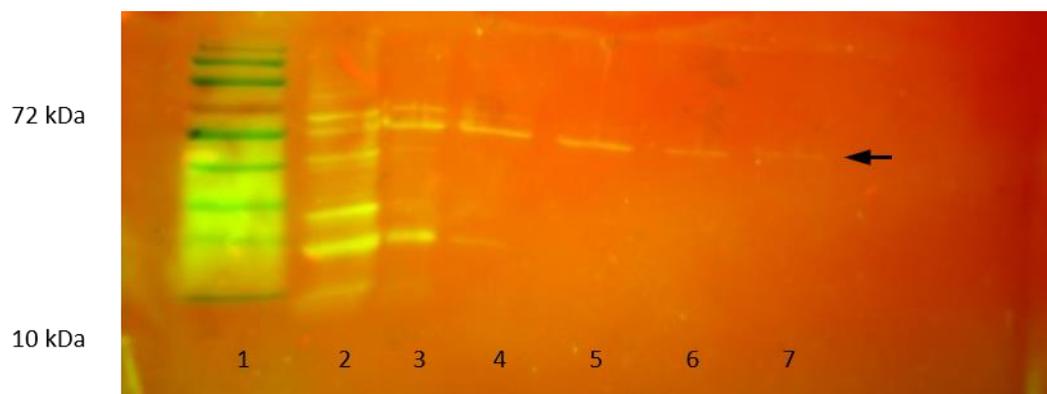


Abbildung 21: Nachweis des exprimierten RVFV-Gn-Proteins mittels Anti-RVfV-Antikörpern und Western Blot. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (10-170 kDa), Spuren 2-7, Pfeil: RVFV-Gn-Proteinfractionen (55 kDa) in abnehmender Proteinkonzentration.

3.3.4 Erprobung des Gn-ELISAs

Ein auf Basis des exprimierten RVFV-Gn-Proteins erstellter, speziesspezifischer RVFV-Gn-ELISA wurde anhand von 20 Seren geimpfter Schafe, 15 Seren geimpfter Rinder sowie 48 Humansenen erprobt, wobei entsprechende enzymmarkierte Sekundärantikörper zum Einsatz kamen (1.3.1). Sensitivität und Spezifität lagen dabei unter 30%. Als Referenz wurden die zuvor durchgeführten IFT Ergebnisse herangezogen. Als Ursache dieses schlechten Ergebnisses kommt eine unzureichende Reinheit des Gn-Proteins in Frage, die sich in überzähligen Banden im Western Blot manifestiert (Abbildung 22). Unspezifische Bindungen konnten bei einer Wiederholung des Versuchs unter Einsatz eines stärkeren Blockreagenz (Roti-Block anstelle von Magermilch/BSA) weitgehend ausgeschlossen werden, wobei jedoch keine Verbesserung der Ergebnisse eintrat. Ebenso wenig führte der

Ersatz der polyklonalen Anti-Human-Antikörper durch Human-IgG-spezifische Antikörper mit minimaler Kreuzreaktivität gegen tierische Serumproteine zum Ziel.

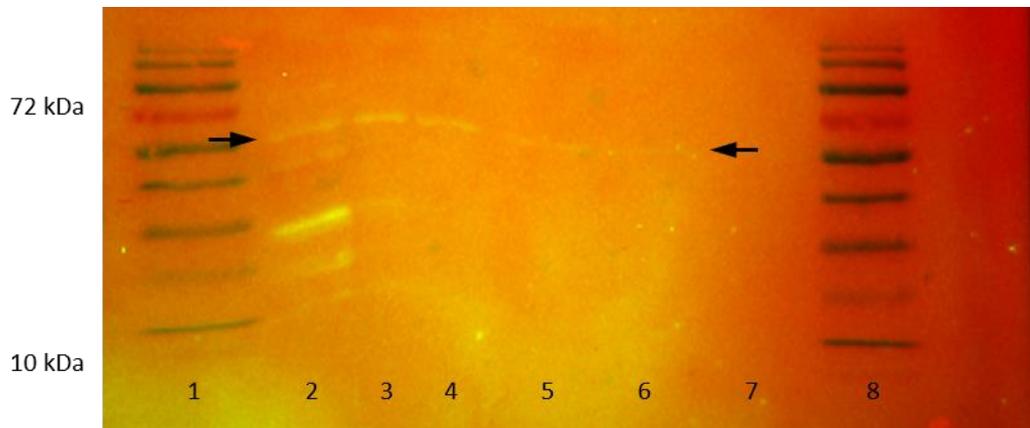


Abbildung 22: Nachweis des exprimierten RVFV-Gn-Proteins mittels Anti-His-tag-Antikörpern und Western Blot. Spur 1 und 8: Molekulargewichtsmarker (10-170 kDa), Spuren 2-7, Pfeile: RVFV-Gn-Proteinfraktionen (55 kDa) in abnehmender Proteinkonzentration.

4 Diskussion

4.1 Erfolgreiche Etablierung eines speziesunabhängigen RVFV-N-ELISAs

Das RVF-Phlebovirus gehört zur Familie der Phenuiviren. Es ist ein in Afrika weit verbreitetes Virus, welches sowohl Menschen als auch Säugetiere befällt und seit einigen Jahren auch auf der arabischen Halbinsel nachweisbar ist. Überträger sind dabei Mücken der Gattung *Aedes* und *Culex*. Zeitlich und örtlich wiederkehrende Infektionen beim Menschen, insbesondere bei Landwirten und Bauern, lassen sich oft mit einem infizierten Nutztierbestand in Verbindung bringen (vornehmlich Schafe und Rinder). Im Zuge der Infektion treten vor allem Gastroenteritiden auf, aber auch Meningitis, Enzephalitis, Rhetinitis und Hepatitis, die zu hoher Letalität führen (allein 600 Todesfälle in Ägypten 1978). Als potentiell tödlich verlaufende Infektionskrankheit ist RVF daher auch als biologische Waffe in Europa denkbar.

Bei klinischen Verdachtsfällen auf RVF wird in Ländern, in denen das RVF endemisch ist, der serologische Antikörpernachweis verwendet. Dieser Antikörpertest ist bei RVF bereits eine Woche post infectionem möglich (Abbildung 4). Im Gegensatz zu Erregerkultivierung ist die Serodiagnostik eine schnelle und ungefährliche Methode (1.3), die per Titerbestimmung zudem sowohl Aufschluss über den Verlauf der Infektion als auch die Abwehrlage des Patienten liefert.

Zum Nachweis einer RVF-Infektion stehen als Routinediagnostika bislang mehrere ELISA Systeme zu Verfügung, die, wie in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, Antikörper gegen den RVFV detektieren. Kommerziell verfügbar ist ein speziesunabhängiger, kompetitiver ELISA (ID Screen RVF, IDvet, hier: k-ELISA), dessen Zulassung aber auf Nutztierseren beschränkt ist und somit nicht zum Test von Humanseren herangezogen werden darf. Die Fähigkeit, mit denselben Reagenzien Seren von Menschen und Tieren zu testen, wäre aber in Ländern mit wenig entwickelten Gesundheitssystemen (wie z. B. Ägypten und dem Sudan) von besonderem Wert. Sowohl IFT als auch k-ELISA benötigen zudem große Probenvolumina.

Dies ist insbesondere in tropischen Ländern von Nachteil, da dort die notwendigen Kühlkapazitäten während der Probengewinnung und -lagerung oftmals knapp sind. 50 µl Serum für einen einzelnen Test wie im Falle des k-ELISAs sind dann wenig praktikabel. Aus den genannten Gründen ist es geboten, ein Verfahren zu entwickeln, das speziesunabhängig ist und bereits mit geringen Probenvolumina einen sicheren Nachweis erbringen kann.

Zur Entwicklung des in dieser Arbeit beschriebenen, speziesunabhängigen ELISAs, wurden die RVFV-Proteine N und Gn als Erfolg versprechende Antigene identifiziert. Im Gegensatz zum Gn-Protein ist das N-Protein kein Hüllenprotein, d. h. es befindet sich im Inneren des Viruspartikels. Aufgrund seiner hohen Abundanz im Viruspartikel wird davon ausgegangen, dass nach der Infektion mit RVFV insbesondere Antikörper gegen das N-Protein gebildet werden (Knipe und Howley 2007). Das Gn-Protein ist ein für den Eintritt des Virions in die Wirtszelle zentraler Bestandteil des äußeren Virus-Kapsids. Durch seine exponierte Lage ist es für die Zellen des Immunsystems unmittelbar zugänglich. Antikörper, die gegen das Gn-Protein gerichtet sind, schützen vor Reinfektionen mit RVFV, stellen also neutralisierende Antikörper dar. Beide Virusproteine wurden als Basis für die folgenden Experimente biotechnisch hergestellt.

Um hohe Sensitivität und Spezifität mit Speziesunabhängigkeit zu kombinieren, wurde ein ELISA auf Basis des RVFV-N Proteins entwickelt (N-ELISA), wobei einem Konjugat aus N-Protein und dem Enzym HRP eine Schlüsselfunktion zukommt. Durch die Verwendung dieses Konjugats entfällt die Abhängigkeit von einem speziesspezifischen Antikörper für die Detektion der Primärantikörper im Serum und damit auch ein Inkubationsschritt. Gleichzeitig sollte sich die Spezifität und Sensitivität erhöhen, da das HRP-konjugierte lösliche Antigen nicht an den Fc-Teil, sondern an eine antigenspezifische Bindungsstelle des zu detektierenden Antikörpers bindet.

Da für RVFV-ELISAs kein kommerzieller Positivstandard erhältlich ist, wurde ein Cut-off-Wert nach Frey berechnet (2.3.1), um eine Aussage über positive Seren treffen zu können. Alle Werte, die oberhalb des berechneten Grenzwertes liegen, gelten als positiver Nachweis von

Antikörpern im Serum. Mit dem so berechneten Grenzwert war es schließlich möglich, die unterschiedlichen ELISAs (s-, k- und N-ELISA) untereinander bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität zu vergleichen und den neu entwickelten Test auf diese Weise zu etablieren.

In Bezug auf Humanseren übertrifft der hier entwickelte N-ELISA das Vergleichsverfahren (s-ELISA) und nähert sich bezüglich seiner Leistung (Spezifität 99%, Sensitivität 87%, Abbildung 14) einem IFT, gegenüber dem der Verbrauch an Serum deutlich reduziert ist.

Die vergleichsweise geringe Sensitivität des N-ELISAs in Bezug auf Nutztiere (54%, Abbildung 16) liegt noch in einem für ELISA typischen Bereich und wird durch die Tatsache relativiert, dass für seine Durchführung bereits 2% der Menge an Serum (1 µl) ausreichend sind, die für den kommerziellen ELISA aufgewendet werden muss (50 µl, Sensitivität 85%).

4.2 Spezielle Aspekte der Verwendung eines ELISAs bei geimpften Tieren

Durch die konsistent verringerte Sensitivität aller verwendeten ELISAs bei geimpften Tieren stellt sich die Frage nach einem systematischen Effekt. Dazu ist festzustellen, dass N- und k-ELISA gegen das N-Protein gerichtete Antikörper detektieren. Nun handelt es sich bei den verwendeten Impfstoffen aber um Totimpfstoffe, die in vielen Fällen nur aus Teilen des Pathogens bestehen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der RVF-Impfstoff überwiegend aus Antigenen der Virushülle besteht und so N-Antikörper nur in geringen Titern (bei Schafen mehr als bei Rindern) induziert werden. Darüber hinaus kommt der eigentliche Impfschutz nicht durch N-spezifische Antikörper zustande, sondern durch solche, die gegen von außen zugängliche Proteine des Virus, wie das Gn-Protein, gerichtet sind. Nur diese sind in der Lage, intakte Viren zu neutralisieren und so die Infektion weiterer Wirtszellen zu verhindern. Durch die oftmals schwächere Immunantwort auf einen Totimpfstoff kann es notwendig werden, eine Impfung mehrfach zu wiederholen, um den Impfschutz zu garantieren. Zur Prüfung des potentiellen Impfschutzes scheint es daher sinnvoll, einen auf dem Gn-Protein basierenden ELISA zu entwickeln.

Zur Beurteilung des Impfschutzes von Nutztieren über die Bestimmung des Impftiters wurde der Versuch zur Etablierung eines speziesunabhängigen Anti-RVSV-Gn-ELISAs (Gn-ELISA) gestartet. Dieser Test funktionierte nicht (3.3.4), was nach Abschluss dieser Arbeit auf die mangelnde Zugänglichkeit der antigenen Epitope des exprimierten rekombinanten Gn-Proteins zurückgeführt werden konnte. Mittlerweile ist es gelungen, die 3D-Struktur des Proteins durch Denaturierung mit Guanidinium-Hydrochlorid abzuändern, so dass die antigenbindenden Strukturen (Epitope) für Antikörper zugänglich wurden. Mit dem in dieser Weise modifizierten Gn-ELISA konnten in ersten Messungen Gn-Antikörper in Seren von RVSV infizierten Kamelen aus dem Sudan nachgewiesen werden¹.

Ein weiterer praktischer Aspekt ist die sichere Unterscheidung von Infektion und erfolgter Impfung mittels eines Totimpfstoffes. Diese kann, unter der Annahme eines bestehenden Gn-Antikörpertiters, durch Nachweis von infektionsspezifischen Antikörpern erfolgen. Die Ergebnisse des N-ELISA zeigen, dass Anti-N-Antikörper dieses Kriterium zwar tendenziell erfüllen, ihr Titer aber zu großen Schwankungen unterliegt. Eine bessere Wahl wären daher Antikörper, die gegen das RVSV-NSs-Protein gerichtet sind. Das NSs-Protein ist nicht Bestandteil der Virionen, entsteht aber bei der Virusreplikation. Es sammelt sich im Nucleus an und hemmt durch seine Wirkung als Transkriptioninhibitor die Interferonproduktion im RVSV-infizierten Organismus. Dadurch wird die antivirale, immunstimulierende Wirkung des Typ-I-Interferons unterdrückt. Daher sollten nur Seren infizierter Tiere im NSs-ELISA positive Resultate ergeben, während es bei mit inaktivierten Viruspartikeln geimpften Tieren, gleich ob Lebend- oder Totimpfstoff, nicht zur Bildung von NSs-Antikörpern kommen kann. Somit würde ein NSs-ELISA eine sichere Unterscheidung von infizierten und geimpften Tieren erlauben.

¹ persönliche Mitteilung von Dr. M. Spiegel (2014)

5 Zusammenfassung

Das RVF-Phlebovirus gehört zur Familie der Phenuiviren und wird durch Insektenstiche auf Wild- und Nutztiere sowie den Menschen übertragen, zudem ist eine Übertragung von Nutztieren auf den Menschen möglich (Zoonose). Bei Menschen zählen Hepatitiden, hämorrhagisches Fieber und Enzephalitiden zu den möglichen schweren Symptomen der Erkrankung. Bei Nutztieren, insbesondere Rindern, verursacht die Infektion bei trächtigen Tieren Teratogenität, Abort und den Tod des Jungtiers. Die Erkrankung ist in vielen Gebieten der Subsahara, in Ägypten und der arabischen Halbinsel endemisch, wo es wiederholt zum Ausbruch von Epidemien gekommen ist.

Der RVFV-N-Antikörper-ELISA ist ein Screeningverfahren, das auch in schlecht ausgestatteten Laboren routinemäßig eingesetzt werden kann. Der nach Sensitivität und Spezifität bisher beste kommerziell verfügbare ELISA ist jedoch nicht speziesübergreifend anwendbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein neues ELISA-Verfahren entwickelt, das Speziesunabhängigkeit mit guter Sensitivität und Spezifität vereint. Als ein geeignetes Zielprotein wurde dazu das RVFV-Nukleoprotein identifiziert und das HRP-konjugierte N-Protein zur Detektion von RVFV-N-Antikörpern verwendet. Aus den so gewonnenen Erkenntnissen konnten Richtungsentscheidungen für die Etablierung von weiteren Zielproteinen (RVFV-Gn und -NSs) abgeleitet werden, die dem Ziel einer präzisen Klassifikation von geimpften und ungeimpften Tieren dienen.

6 Literaturverzeichnis

- Ahmed Kamal S (2011): Observations on rift valley fever virus and vaccines in Egypt. *Viol J* 8, 532
- Bird BH, Ksiazek TG, Nichol ST, Maclachlan NJ (2009): Rift Valley fever virus. *J Am Vet Med Assoc* 234, 883-93
- Corso B, Pinto J, Beltrain-Alcrudo D, De Simone L, Lubroth J: Rift Valley fever outbreaks in Madagascar and potential risks to neighbouring countries. *FAO EMPRES Watch*, April 2008, <http://www.fao.org/3/a-aj213e.pdf>; abgerufen am 28.12.2019
- Crowther JR: *The ELISA guidebook (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press, Totowa 2000
- Daubney R, Hudson JR, Graham PC (1931): Enzootic hepatitis of Rift Valley fever, an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *J Pathol and Bacteriol* 34, 545-579
- Flint SJ, Enquist LW, Racaniello VR, Skalka AM: *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses*. 2. Auflage; ASM Press, Washington, D.C. 2004
- Frey A, Di Canzio J, Zurakowski D (1998): A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *J Immunol Methods* 221, 35-41
- Hartley DM, Rinderknecht JL, Nipp TL, Clarke NP, Snowden GD (2011): Potential effects of Rift Valley fever in the United States. *Emerg Infect Dis* 17, e1
- Heinrich N, Saathoff E, Weller N, Clowes P, Kroidl I, Ntinginya E, Machibya H, Maboko L, Loscher T, Dobler G, et al. (2012): High seroprevalence of Rift Valley Fever and Evidence for Endemic Circulation in Mbeya region, Tanzania, in a Cross-Sectional Study. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1557
- ILRI (International Livestock Research Institute): Mapping of poverty and likely zoonoses hotspots. *Zoonoses Projects* 4. ILRI, o. O. 2012, cgspace.cgiar.org/handle/10568/21161; abgerufen am 28.12.2019
- Kasari TR, Carr DA, Lynn TV, Weaver JT (2008): Evaluation of pathways for release of Rift Valley fever virus into domestic ruminant livestock, ruminant wildlife, and human populations in the continental United States. *J Am Vet Med Assoc* 232, 514-29
- Key G: Labormethoden. In: Raem AM, Rauch PR (Hrsg.): *Immunoassays*. Elsevier, München 2007, 51-54
- Knipe DM, Howley P: *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2007
- Krauss H, Weber A, Appel M, Enders B, v. Graevenitz A, Isenberg HD, Schiefer HG, Slenczka W, Zahner H: *Zoonosen - Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten*. 3. Auflage; Deutscher Ärzteverlag, Köln 2004
- Lopez N, Muller R, Prehaud C und Bouloy M (1995): The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules. *J Virol* 69, 3972-9

- Madani TA, Al-Mazrou YY, Al-Jeffri MH, Mishkhas AA, Al-Rabeah AM, Turkistani AM, Al-Sayed MO, Abodahish AA, Khan AS, Ksiazek TG, et al. (2003): Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin Infect Dis* 37, 1084-92
- Modrow S, Falke D, Truyen U und Schätzl H: *Molekulare Virologie*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Mondet B, Theoretical cycle of RVF virus transmission. In: *FAO Animal Health Manual No. 17*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom 2003, www.fao.org/3/Y4611E/y4611e04.htm#bm4; abgerufen am 30.12.2019
- NICD (National Institute for Communicable Diseases): Outbreak of Rift Valley Fever. NICD, Johannesburg 2018, www.nicd.ac.za/outbreak-of-rift-valley-fever; abgerufen am 30.12.2019
- Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J (2010): Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res* 41, 61; lizenziert unter creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/
- Peters CJ, Reynolds JA, Slone TW, Jones DE, Stephen EL (1986): Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator. *Antiviral Res* 6, 285-97
- Raem AM, Goldmann C, Brandt B: *Biologische Grundlagen der Immunoassays*. In: Raem AM, Rauch PR (Hrsg.): *Immunoassays*. Elsevier, München 2007, 2
- RKI (Robert Koch Institut): Rift-Valley-Fieber: Ausbruch in den nordöstlichen und den Küsten-provinzen Kenias. RKI, Berlin 2007, edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/4344/23Jt4FXr1Tx6Q.pdf; abgerufen am 30.12.2019
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7
- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME (2001): Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 983-9
- Yalow RS, Berson SA (1960): Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39, 1157
- ViralZone: Phenuiviridae. Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne 2019, viralzone.expasy.org/7101; abgerufen am 30.12.2019, lizenziert unter creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/
- Wagner E: *Die Contagien und Miasmen*. In: Wagner E (Hrsg.): *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. 6. Auflage; Verlag Wigand, Leipzig 1874, 174-192
- Warrington R, Watson W, Kim HL, Antonetti FR (2011): An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 7 Suppl 1, S1
- Zoonosen.net: Nationale Forschungsplattform für Zoonosen, Münster 2019, zoonosen.net/überuns.aspx; abgerufen am 24.04.2012

Veröffentlichungen

Teile dieser Doktorarbeit wurden als Kongressbeitrag veröffentlicht:

Schmidt U, Paluschkiwitz A, Abd El Wahed A, Shalaby M, Dobler G, Heinrich N, Hufert FT, Spiegel M (2013): Establishment and evaluation of a simple, non-competitive, multi-species anti-RVSV nucleoprotein ELISA. Posterpräsentation im Rahmen des 23rd Annual Meeting of the Society for Virology, Kiel, 06.03.-09.03.2013

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. med. Frank Hufert danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Dissertation sowie die Möglichkeit, diese in der Abteilung Virologie am Zentrum Hygiene und Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen durchzuführen.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Martin Spiegel für die praktische Anleitung und wissenschaftliche Unterstützung sowie für die Korrektur der schriftlichen Arbeit, ebenso wie für die Geduld und stete Diskussionsbereitschaft.

Den Mitarbeitern des Labors, Dr. rer. nat. Meik Dilcher, Andrea Paluschkiwitz und Susanne Böhlken-Fascher, gilt ein herzliches Dankeschön für ihre Hilfsbereitschaft, für die praktische Anleitung und die Unterstützung im Labor.