



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Sciences

**Neue Antigene für die Dengue-Virus Diagnostik
durch separate Expression der E-Protein Domänen 1 und 2**

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Deniz Lehnert

2019949

Hamburg, 23. September 2015

1. Gutachter: Prof. Dr. Wacker, Claus-Dieter

HAW Hamburg

2. Gutachter: Dr. Schreiber, Michael

Bernhard-Nocht-Institut

Die Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt in den Laboren des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Abteilung Virologie, Hamburg.

“Diese Alchimisten sind immer nur damit beschäftigt, irgendwelches Zeug zu mischen und sich zu fragen 'He, was passiert, wenn wir einen Tropfen von diesem gelben Zeug hinzutun?'. Und dann laufen sie zwei Wochen lang ohne Augenbrauen herum. ”

- Terry Pratchett (“Voll im Bilde”)

Inhalt

1.	Einleitung	8
1.1	Ziel der Arbeit	8
1.2	Dengue-Virus	9
1.2.1	Genom und virale Proteine	10
1.2.2	Reifung zu infektiösen Partikeln	10
1.2.3	Serotypen	13
1.2.4	Humorale Immunantwort	13
1.3	E-Protein	14
1.3.1	Domäne 1-Konstrukte	16
1.3.2	Domäne 2-Konstrukte	19
1.4	Expression und Proteinaufreinigung	19
1.5	Diagnostische Methoden	20
1.6	Vorarbeiten	21
2.	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Puffer und Medien	22
2.1.2	Detektionsantikörper	24
2.1.3	DENV-positive Patientenseren aus Kolumbien	24
2.1.4	Enzyme	24
2.1.5	Molekulargewichtsstandards	25
2.1.6	Kits	25
2.1.7	Antibiotika	25

2.1.8	<i>E. coli</i> -Stämme	25
2.1.9	Plasmide und Oligonukleotide	26
2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.1	<i>Assembly</i> PCR	28
2.2.1.2	Kolonie-PCR	30
2.2.1.3	Mutagenese-PCR	31
2.2.2	Restriktionsverdau	32
2.2.3	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.4	Gibson Assembly	34
2.2.5	Transformation in chemokompetente Bakterien	34
2.2.6	Plasmid-Präparation	35
2.2.7	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.7.1	Analytisches Gel	36
2.2.7.2	Präparatives Gel	37
2.2.8	DNA-Sequenzierung	37
2.3	Mikrobiologische Methoden	37
2.3.1	Herstellung Medium und Agarplatten	37
2.3.2	Herstellung chemokompetenter Bakterien	37
2.3.3	Expression rekombinanter Fusionsproteine	38
2.3.4	Cytoplasmatischer Zellaufschluss	39
2.3.5	Periplasmatischer Zellaufschluss	39
2.4	Proteinbiochemische Methoden	40
2.4.1	Aufreinigung der Fusionsproteine/ Affinitätschromatografie	40
2.4.2	Proteinkonzentrierung/ Ultrafiltration	40

2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.4.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	42
2.4.5	<i>dot</i> Blot	42
3.	Ergebnisse	44
3.1	Sequenzdesign für Dengue-Antigene	44
3.1.1	E-Protein Domäne 1-Konstrukte	44
3.1.2	E-Protein Domäne 2-Konstrukte	48
3.2	Herstellung rekombinanter Dengue-Antigene	53
3.2.1	Expression und Aufreinigung in <i>E. coli</i>	53
3.2.1.1	E-Protein Domäne 1-Konstrukte	53
3.2.1.2	E-Protein Domäne 2-Konstrukte	56
3.2.2	Periplasmatischer Zellaufschluss ED2-Konstrukte	59
3.2.3	Aufkonzentrierte Antigene im Vergleich	62
3.3	Immunologischer Reaktivitätstest der Antigene	68
3.3.1	E-Protein Domäne 1-Konstrukte	71
3.3.2	E-Protein Domäne 2-Konstrukte	75
3.3.3	Dengue-negativ-Seren	76
4.	Diskussion	82
5.	Zusammenfassung	91
5.1	Summary	92
6.	Literaturverzeichnis	93
II	Anhang	99

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Genomorganisation und Reifung des Virus-Partikels.	11
Abb. 2	Virusreproduktion in einer Zelle.	12
Abb. 3	Genomorganisation und Proteinstruktur des Dengue-E-Proteins.	15
Abb. 4	Schematische Darstellung der Herstellung von Domäne 1-Konstrukten.	17
Abb. 5	Schematische Darstellung der Herstellung von Domäne 2-Konstrukten.	18
Abb. 6	Schema einer <i>assembly</i> PCR.	29
Abb. 7	Domäne 1-Verlinkung als Schema und schematisch in Proteinstruktur.	46
Abb. 8	Alignment der Aminosäuresequenzen der ED1-Konstrukte.	47
Abb. 9	Domäne 2-Verlinkung als Schema und schematisch in Proteinstruktur.	49
Abb. 10	Alignment der Aminosäuresequenzen der ED2-Konstrukte.	50
Abb. 11	Expressionsvergleich DENV-1 ED1-Proteine in BL21(DE3) und DH5 α .	54
Abb. 12	Expressionsvergleich DENV-3 ED1-Proteine in BL21(DE3) und DH5 α .	55
Abb. 13	Expressionsvergleich DENV-1 ED2-Proteine in BL21(DE3) und DH5 α .	57
Abb. 14	Expressionsvergleich DENV-3 ED2-Proteine in BL21(DE3) und DH5 α .	58
Abb. 15	Periplasmatischer Zellaufschluss der DENV-1 ED2-Proteine.	60
Abb. 16	Periplasmatischer Zellaufschluss der DENV-3 ED2-Proteine.	61
Abb. 17	Aufkonzentrierte Elutionsfraktion aller ED1-Konstrukte im Vergleich.	65
Abb. 18	Aufkonzentrierte Elutionsfraktion aller ED2-Konstrukte im Vergleich.	67
Abb. 19	Anpassung der Konzentration aller DENV-3 ED1-Konstrukte.	69
Abb. 20	Häufigkeit und Intensität der Serum-Reaktionen mit ED1-Konstrukten.	73
Abb. 21	Verteilung der Reaktionsintensitäten der Domäne 1-Konstrukte.	74
Abb. 22	Häufigkeit und Intensität der Serum-Reaktionen mit ED2-Konstrukten.	77
Abb. 23	Verteilung der Reaktionsintensitäten der Domäne 2-Konstrukte.	78
Abb. 24	Reaktionshäufigkeit der Antigen Konstrukte mit Dengue-negativ-Seren.	79
Abb. 25	Originaldaten des <i>dot assays</i> für alle Domäne 1-Konstrukte.	80
Abb. 26	Originaldaten des <i>dot assays</i> für alle Domäne 2-Konstrukte.	81
Abb. 27	GPG- <i>turn motif</i> im Glykoprotein gp120 des HI-Virus als Proteinstruktur.	83
Abb. 28	Position der Disulfidbrücken als Schema und in Proteinstruktur.	86
Abb. 29	Ladung und Position der Aminosäuren die am GPG- <i>link</i> beteiligt sind.	89

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Auftragungsmenge der SDS-Proben.	42
Tab. 2	Übersicht der verknüpften Aminosäuren der Domäne 1-Konstrukte.	51
Tab. 3	Übersicht der verknüpften Aminosäuren der Domäne 2-Konstrukte.	52
Tab. 4	Konzentrationsbestimmung der Domäne 1 Fusionsproteine.	64
Tab. 5	Konzentration der Proteine bezogen auf das Expressionsvolumen.	64
Tab. 6	Häufigkeit und Intensität der erfolgten Reaktionen im <i>dot assay</i> .	72

Verzeichnis der Abkürzungen

AS	Aminosäure	(Es wurde der 1- und 3-Buchstaben-Code verwendet)
CV	<i>column volum</i> , Säulenvolumen	
DENV	Dengue-Virus	
DENV-1	Dengue-Virus Serotyp-1	
DENV-2	Dengue-Virus Serotyp-2	
DENV-3	Dengue-Virus Serotyp-3	
DENV-4	Dengue-Virus Serotyp-4	
DHF	hämorrhagisches Dengue-Fieber	
DNA	<i>Desoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure	
DSS	Dengue-Schock-Syndrom	
ED1	E-Protein Domäne 1	
ED2	E-Protein Domäne 2	
ED3	E-Protein Domäne 3	
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase	
IgG	Immunoglobulin G	
IgM	Immunoglobulin M	
JEV	Japanische Enzephalitis	
kb	Kilobasenpaare	
kDa	Kilodalton	
MBP	<i>maltose binding protein</i>	
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker	
ORF	<i>open reading frame</i> , Offener Leserahmen	
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion	
PDB	Protein Data Bank	
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure	
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	
TBEV	<i>tick-borne encephalitis</i> , Frühsommer-Meningoenzephalitis	
YFV	<i>yellow fever virus</i> , Gelbfieber	
YT	<i>yeast trypton</i> , Nährmedium	

1. Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Rekombinant hergestellte Antigene stellen wertvolle Werkzeuge für die Erforschung der humoralen Immunantwort auf das Dengue-Virus (DENV) dar. Diese Antigene können zudem genutzt werden, um eine preisgünstige und schnelle Methode zur Detektion einer asymptomatisch verlaufenden Dengue-Infektion zu entwickeln. Es existieren vier unterschiedliche Dengue-Serotypen, DENV-1 bis DENV-4. Einige Antikörper, die als Reaktion auf eine Infektion mit einem der vier Serotypen gebildet werden, zeigen neutralisierende Eigenschaften gegen den infizierenden Virustyp, weisen jedoch keine Immunität gegenüber den andern Serotypen auf (Schieffelin *et al.*, 2010). Die meisten Epitope dieser Antikörper bietet das virale Oberflächenprotein E. Es besteht aus drei Proteindomänen, die Epitope für Antigene enthalten, die bisher allerdings nicht vollständig definiert werden konnten. Domäne 1 (ED1) wird durch drei Sequenzabschnitte kodiert und Domäne 2 (ED2) durch zwei Sequenzabschnitte, die nicht kontinuierlich auf dem Genom vorliegen. Domäne 3 (ED3) hingegen wird durch eine kontinuierliche Sequenz kodiert und wurde daher bereits rekombinant als Protein hergestellt und als diagnostisches Antigen eingesetzt (Ludolfs *et al.*, 2002; Emmerich *et al.*, 2013). Bisher wurden keine Versuche durchgeführt, die Domänen separat voneinander zu exprimieren und als diagnostische Antigene in einem Test einzusetzen. In Vorarbeiten der Laborgruppe wurden die ED1- und ED2- Sequenzabschnitte jeweils mit den drei Aminosäuren Glycin, Prolin und Glycin (GPG) verknüpft und dadurch separat exprimiert. Ein anschließender Reaktivitätstest mit Patientenseren ergab, dass die Konstrukte der Serotypen DENV-1 und DENV-3, im Gegensatz zu den anderen Serotypen, kaum Reaktion gezeigt haben. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, die ED1- und ED2-Sequenzen neu zu verknüpfen, um reaktive Antigen-Konstrukte für die Serotypen DENV-1 und DENV-3 herzustellen. Es gilt dabei, den Einfluss der Position des GPG-*links* auf die Expression und die Reaktivität festzustellen. Zudem soll untersucht werden, ob die neu erstellten Antigen-Konstrukte bessere Reaktivitäten als die Konstrukte der Vorarbeiten zeigen. Dementsprechend ist das erste Ziel dieser Arbeit verschiedene Antigen-Konstrukte zu erstellen und diese in Expressionsplasmide zu klonieren. Das zweite Ziel ist die Expression dieser Antigen-Konstrukte als MBP-Fusionsproteine in

E. coli. Die Expression soll in zwei verschiedenen Bakterienstämmen durchgeführt werden, um den Einfluss auf die Proteinausbeute zu untersuchen. Zudem sollen die Proteinausbeuten der Antigen-Konstrukte untereinander verglichen werden. Das dritte Ziel ist es die exprimierten und aufgereinigten Antigene in einem diagnostischen Test einzusetzen, um die Reaktivität mit Dengue positiven Patientenseren zu ermitteln. Eventuell eignen sich diese Antigene für eine allgemeine Dengue-Diagnostik und können für weitere Studien verwendet werden.

1.2 Dengue-Virus

Die Familie der *Flaviviridae* unterteilt sich in die drei Gattungen Hepacivirus, Pestivirus und Flavivirus (Fauquet *et al.*, 2005). Zu den Flaviviren gehören weltweit verbreitete humanpathogene Viren, wie das Gelbfiebervirus (YFV), die Frühsommer-Meningoenzephalitis (*tick-borne encephalitis*, TBE), Japanische Enzephalitis (JEV) und das Dengue-Virus (DENV). Alle Flaviviren enthalten einen (+)-RNA-Einzelstrang als Genom und weisen Ähnlichkeiten in Bezug auf ihre Genomorganisation, die Virusreproduktion und die Struktur der viralen Partikel auf (Lindenbach *et al.*, 2007). Sie werden auch als Arboviren (*arthropod-borne virus*) bezeichnet, da Arthropoden, wie Mücken und Zecken, die Viren übertragen.

Das Dengue-Virus (DENV) wurde vom Affen, dem ursprünglichen Wirt, über einen Vektor auf den Menschen übertragen. Infektionskrankheiten, die auf natürlichem Wege vom Tier auf den Menschen übertragen werden können, werden als Zoonose bezeichnet. Es existieren vier verschiedene Dengue-Serotypen (DENV-1 bis DENV-4), die inzwischen in 69 Ländern endemisch sind. Die Übertragung des Virus erfolgt hauptsächlich durch Mücken der Arten *Aedes aegypti* und *Aedes albopictus* (Guzman *et al.*, 2010). Dengue verursacht weltweit jährlich etwa 50 bis 270 Millionen Infektionen, die zu Fiebererkrankungen und Hämorrhagien führen können (Laoprasopwattana *et al.*, 2007; Ferreira, 2012). Laut WHO kam es in den letzten Jahren zu einem starken Anstieg der Dengue-Infektionen (WHO 2015). Mit der Ausbreitung der Mückenarten breitet sich auch das Virus aus, wodurch inzwischen 3,6 Milliarden Menschen (ca. 50 % der Weltbevölkerung) dem Dengue-Virus exponiert sind (Ferreira, 2012). Ein hohes Infektionsrisiko besteht in tropischen und subtropischen Gebieten. Die Infektion kann asymptomatisch oder symptomatisch verlaufen. Beim asymptomatischen Verlauf zeigen

die infizierten Personen keine Symptome, bilden jedoch trotzdem Antikörper gegen das Virus. Beim symptomatischen Verlauf löst das Virus eine Fiebererkrankung aus, die sich zum hämorrhagischen Dengue-Fieber (DHF) und Dengue-Schock-Syndrom (DSS) entwickeln kann. Das Risiko dieser Verlaufsformen ist bei einer Zweitinfektion mit einem anderen Serotypen im Vergleich zur Erstinfektion erhöht (Guzman *et al.*, 2010). Die Infektion wird symptomatisch behandelt, da keine DENV-spezifische, antivirale Therapie existiert. Ein Impfstoff ist zurzeit ebenfalls noch nicht vorhanden.

1.2.1 Genom und virale Proteine

Das Genom des Dengue-Virus ist ein RNA-Einzelstrang mit (+)-Polarität. Deshalb kann die RNA direkt an den Ribosomen abgelesen und zu Protein translatiert werden. Das Genom enthält ein offenes Leseraster (*open reading frame*, ORF) von 10,7 kb, welches von der 5' untranslatierten Region (UTR) und der 3' UTR flankiert wird. Die Translation des ORF führt zu einem einzigen Polyprotein. Dieses wird anschließend von zellulären und viralen Proteasen prozessiert, sodass die einzelnen Dengue-Proteine vorliegen (Kurosu, 2011). Es entstehen drei virale Strukturproteine: Kapsid (*capsid*, C), Membranprotein mit Vorläufer Peptid (*pre membrane*, prM) und Hüllprotein (*envelope*, E). Zusätzlich entstehen sieben Nichtstrukturproteine (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, NS5), die unter anderem an der Virusreproduktion beteiligt sind (vergl. Abb. 1 A, S. 11).

1.2.2 Reifung zu infektiösen Partikeln

Das Dengue-Virus bildet kugelförmige Virionen mit einem Durchmesser von 50 nm aus. Das Genom befindet sich im Inneren des Kapsids, welches durch mehrere Kopien des C-Proteins gebildet wird. Es ist umgeben von einer Lipiddoppelschicht, in welche die zwei Oberflächenproteine prM und E eingelagert sind (Modrow *et al.*, 2010). Auf der Oberfläche eines Partikels befinden sich jeweils 180 Kopien dieser Proteine, deren Konformation die Infektiosität des Partikels bestimmt (Abb. 1 B, S. 11). Bei unreifen Partikeln (nicht-infektiös) bilden die beiden Proteine (prM und E) Heterodimere, von denen sich je drei zu insgesamt 60 *spike*-ähnlichen Strukturen zusammenlagern.

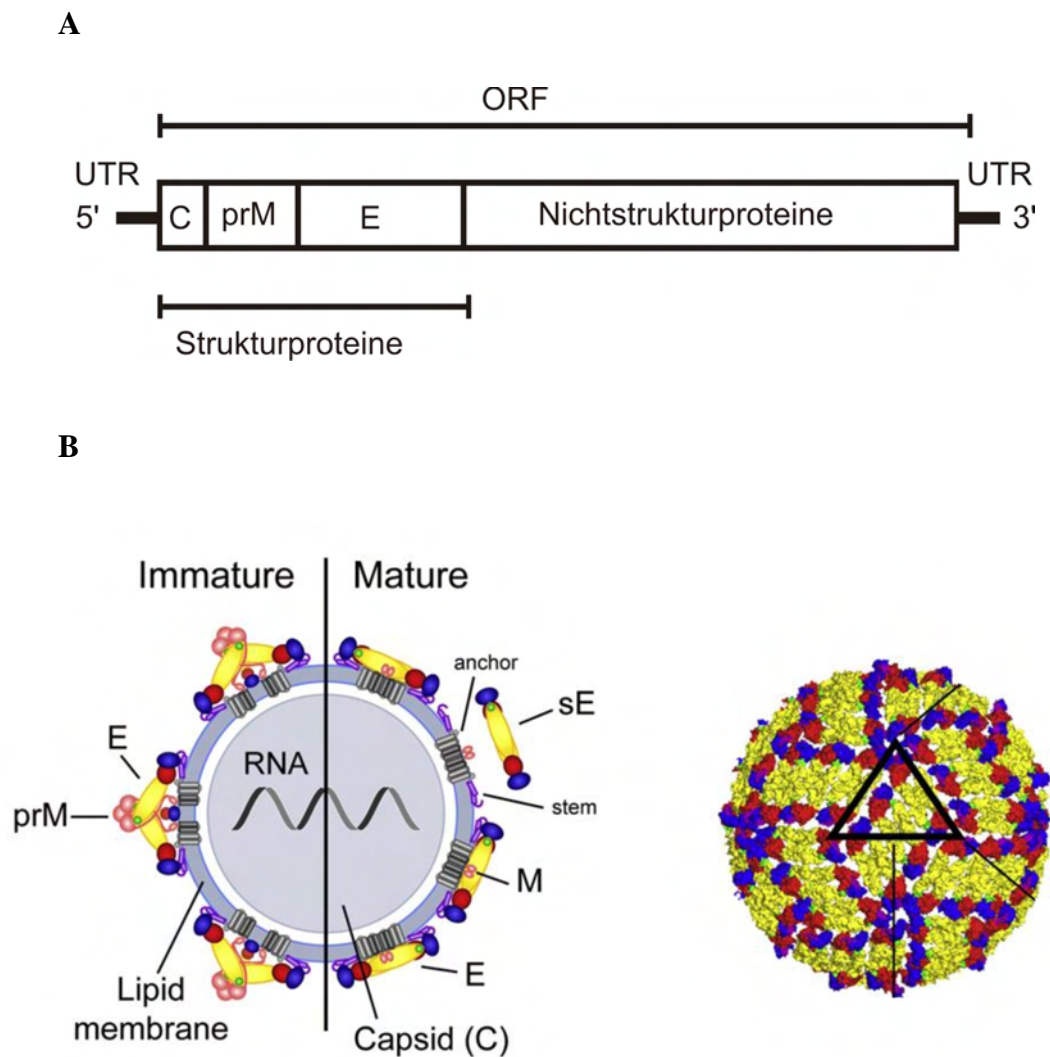


Abb. 1 Genomorganisation und Reifung des Virus-Partikels.

A Dargestellt ist das offene Leseraster (ORF) des Dengue-Genoms. Es wird von zwei untranslatierten Regionen (UTR) flankiert. Das Genom kodiert für die drei Struktur-Proteine: Kapsidprotein (C), Membranprotein mit Vorläufer Peptid (prM) und Hüllprotein (E). Zudem kodiert das Genom für sieben Nichtstrukturproteine.

B Dargestellt ist die Konformationsänderung der Oberflächenproteine während der Reifung des Virus-Partikels (links). Die Strukturproteine prM und E bilden auf den nichtinfektiösen Partikeln (*immature*) Heterodimere aus. Durch eine Änderung des pH-Werts und die anschließende Abspaltung des pr-Peptids, formen die E-Proteine Homodimere, die zu einer glatten Oberfläche des infektiösen Partikels (*mature*) führen. Die Anordnung der Homodimere des E-Proteins auf der Oberfläche eines infektiösen Partikels ist rechts neben dem Schema dargestellt. Abb. von (Fritz *et al.*, 2008).

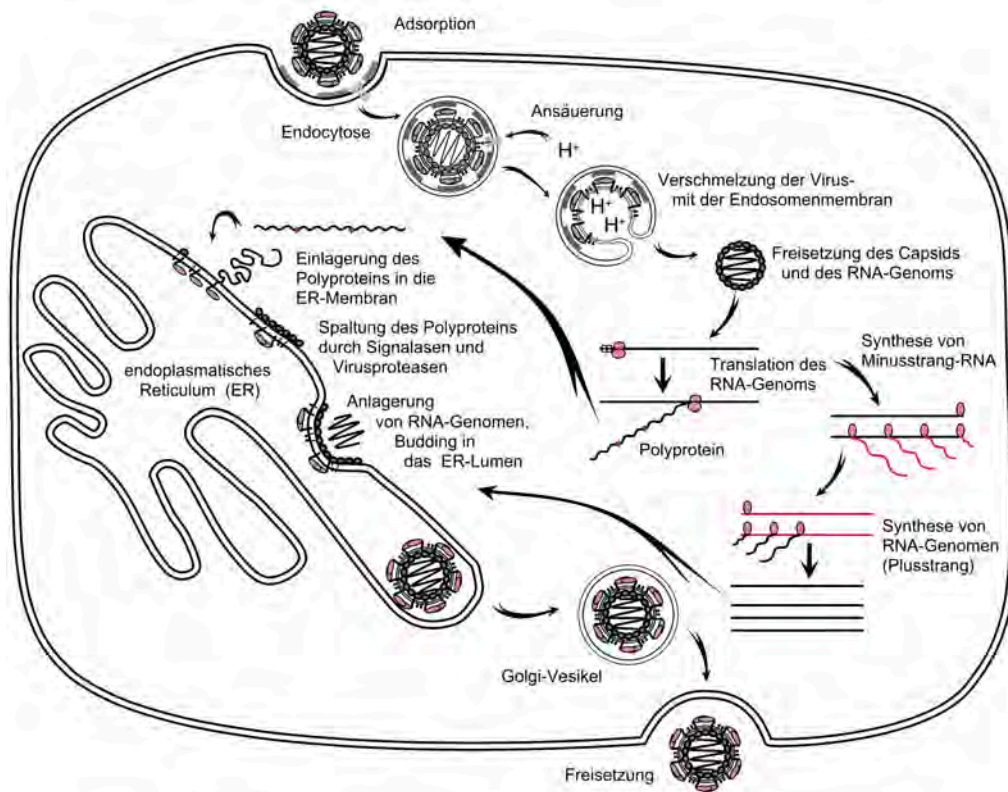


Abb. 2 Virusreproduktion in einer Zelle.

Das Virus adsorbiert an einem Rezeptor der Cytoplasmamembran und wird über Endocytose aufgenommen. Die Membranen von Virus und Endosom verschmelzen nach einer Ansäuerung des Endosomeninneren, bewirkt durch die Aufnahme von H^+ -Ionen. Dadurch wird das Capsid und somit die RNA in das Cytoplasma entlassen. An den Ribosomen erfolgt die Translation der viralen RNA zu einem Polypeptid, welches im Anschluss in die Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) eingelagert und durch Proteasen in die einzelnen Proteine gespalten wird. Die RNA-abhängige RNA-Polymerase synthetisiert einen (-)-RNA-Stang, der als Vorlage für die Synthese neuer Virus-Genome dient. Diese lagern sich an die Membran des ERs an, die eine hohe Konzentrationen der Strukturproteine enthält. Anschließend wird das Genom eingeschlossen und die Partikel werden über die Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche transportiert und freigesetzt. Abb. von (Modrow *et al.*, 2010).

Bei reifen Partikeln (infektiös) bilden E-Proteine Homodimere aus, die zu einer glatten Oberfläche führen. Das M-Protein befindet sich in unmittelbarer Nähe zu der Lipidschicht und wird von den E-Protein-Dimeren überdeckt. Der Prozess der Virusreproduktion ist in Abb. 2 (S. 12) schematisch dargestellt und detailliert beschrieben. Die unreifen Partikel entstehen am endoplasmatischen Retikulum, werden anschließend von Golgi-Vesikeln eingeschlossen und zur Zelloberfläche transportiert. Während der Passage durch den Golgi-Apparat ändert sich der pH-Wert der Umgebung und das pr-Peptid wird durch die Furin-Protease vom M-Protein abgespalten. Dadurch wird die Konformationsänderung induziert, die zur Ausbildung infektiöser Virus-Partikel führt (Li *et al.*, 2008).

1.2.3 Serotypen

Es existieren vier Dengue-Serotypen, die sich zusätzlich in Genotypen untergliedern lassen (Rico-Hesse, 1990). Eine Infektion mit einem der Serotypen führt zu lebenslanger Immunität gegenüber dem homologen Dengue-Serotypen, bietet aber nur einen temporären Schutz bei einer heterologen Infektion mit einem anderen Dengue-Serotypen (Kurane, 2007). Die Kategorisierung der Serotypen erfolgte durch einen Test mit Hyperimmunseren aus Mäusen (Calisher *et al.*, 1989). Für die Bestimmung des Serotypen wird eine RT-PCR oder eine Sequenzierung des viralen Genoms durchgeführt, nachdem dieses aus dem Blut des Patienten isoliert und anschließend amplifiziert worden ist (Leitmeyer *et al.*, 1999). Zudem kann ein Virus-Neutralisationstests durchgeführt werden, bei dem die Fähigkeit der Antikörper, Viren im Zellkulturüberstand zu neutralisieren, getestet wird (Russell *et al.*, 1967). Jedoch beeinflusst die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und Virusstämme den Test. Daher sind die Ergebnisse dieser Methode schwer vergleichbar (Rainwater-Lovett *et al.*, 2012).

1.2.4 Humorale Immunantwort

Die Oberfläche infektiöser Dengue-Partikel ist vollständig mit E-Proteinen bedeckt. Daher bilden diese viralen Proteine die Hauptepitope der induzierten Antikörperantwort. Zunächst werden IgM-Antikörper gebildet, die 4-7 Tage nach der Infektion ihr Maximum erreichen. Diese bleiben über einen Zeitraum von zwei bis drei Monaten

nachweisbar. IgG-Antikörper erreichen ihre maximale Konzentration etwa zwei bis drei Wochen nach der Infektion und persistieren ein Leben lang. Nur ein kleiner Anteil der IgG-Antikörper wirkt Serotyp-spezifisch und neutralisierend. Neben diesen typspezifischen Antikörpern, die nur an Serotyp-spezifischen Epitopen des E-Proteins binden, entstehen überwiegend kreuz-reagierende Antikörper, die an konservierten Regionen der E-Proteindomäne binden. Diese sind meist nicht neutralisierend aber kreuzreaktiv mit anderen Dengue-Serotypen (Modrow *et al.*, 2010). Bei Zweitinfektionen mit einem anderen Serotypen ist die IgM-Antwort nur kurz, jedoch wird die Synthese der IgG-Antikörper sehr schnell induziert. Außerdem wird eine zehnfach höhere Konzentrationen im Vergleich zur Erstinfektion erreicht (Modrow *et al.*, 2010). Neben neutralisierenden Antikörpern können auch nicht-neutralisierende Antikörper Komplexe mit den Dengue-Partikeln bilden und über den Fc-Teil der Antikörper eine Interaktion mit Fc-Rezeptoren auf Makrophagen und Monocyten vermitteln, sodass die Virusaufnahme verstärkt wird (Halstead, 1977; Pierson, 2008). Dies führt zu einem Anstieg der Virus-Replikation und -Produktion, wodurch in diesem Zusammenhang auch von infektionsverstärkenden Antikörpern (*antibody dependent enhancement*, ADE) gesprochen wird (Vaughn *et al.*, 2000). Daher führt eine sekundäre Infektion mit einem anderen Dengue-Serotypen zu einem schwereren Krankheitsverlauf, bei welchem das Dengue-Schock-Syndrom (DSS) und das hämorrhagische Dengue-Fieber (DHF) auftreten können (Halstead, 1970). Die Diagnose einer akuten Infektion über den Antikörpernachweis ist schwierig, da die Dengue-spezifischen Antikörper auch mit anderen Flaviviren, wie dem Gelbfieber-Virus und auch mit dem Alphavirus Chikungunya kreuzreagieren (Houghton, 2008; Yap *et al.*, 2010). Dies ist insbesondere in Ländern, in denen verschiedene Vertreter dieser Viren endemisch sind, problematisch.

1.3 E-Protein

Das virale Oberflächenprotein E ist mit 54,3 kDa das größte der drei Dengue-Strukturproteine. Es besteht aus drei Proteindomänen, von denen zwei diskontinuierlich auf dem Genom vorliegen (vergl. Abb. 3, S. 15). Bei physiologischem pH-Wert bildet es Dimere und ist sowohl für die rezeptorvermittelte Endocytose der infektiösen Partikel als auch für die hämagglutinierenden Eigenschaften des Virus verantwortlich (Modrow *et al.*, 2010).

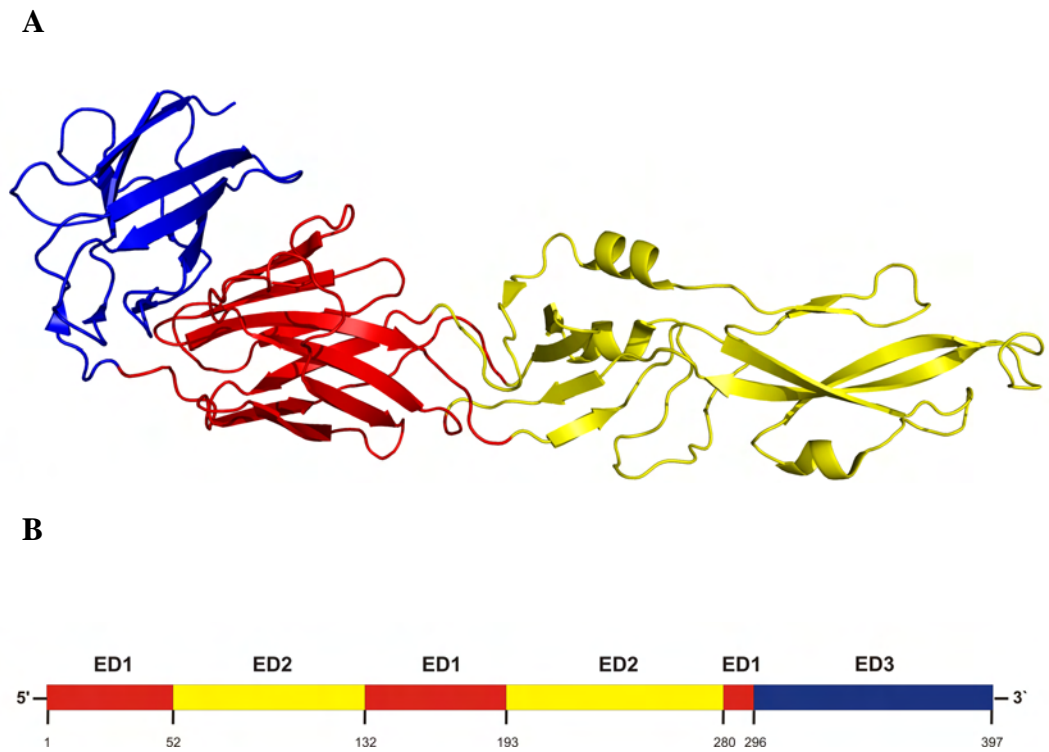


Abb. 3 Genomorganisation und Proteinstruktur des Dengue-E-Proteins.

A Kristallstruktur des E-Proteins, Serotyp DENV-1. Domäne 1 (ED1) ist die zentrale Domäne und wird von Domäne 3 (ED3) und Domäne 2 (ED2) flankiert. Die Proteinstruktur (PDB-File: 3G7T) wurde mit der Software Pymol erstellt.

B Genomorganisation des E-Proteins. Dargestellt ist zusätzlich die Anzahl der Aminosäuren (AS), die einen Sequenzabschnitt definieren. ED1 wird durch drei Gen-Fragmente (AS 1-52, AS 133-193*, AS 281*-296*) und ED2 durch zwei Gen-Fragmente (AS 53-132, AS 194*-280*) kodiert, die diskontinuierlich vorliegen. ED3 wird durch eine kontinuierliche Sequenz (AS 297*-397*) kodiert.

* Die genaue Position der AS, die einen Sequenzabschnitt definieren, variiert zwischen verschiedenen Publikationen um 1-3 AS (Cockburn *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2008; Modis *et al.*, 2005; Nayak *et al.*, 2009)

Durch die Ausbildung der Dimere ist das Protein über Rotation beweglich und kann daher in Säuger- oder Mückenzellen unterschiedliche Epitopregionen präsentieren (Zhang *et al.*, 2003). Über eine hydrophobe Aminosäurefolge ist es im carboxyterminalen Bereich mit der Membran verankert. Die erste Strukturanalyse des Dengue-E-Proteins wurde 2003 für den Serotypen DENV-2 publiziert (Modis *et al.*, 2003). Es folgten die Aufklärungen der E-Protein Strukturen der Serotypen DENV-1 und DENV-3 (Nayak, 2009; Modis *et al.*, 2005), die in dieser Arbeit als Grundlage zur Erstellung von Proteinstruktur-Abbildungen dienten.

1.3.1 Domäne 1-Konstrukte

Die E-Protein Domäne 1 (ED1) wird durch drei Gen-Fragmente kodiert (ED1.1, ED1.2, ED1.3), die den Amino-Terminus der Proteinsequenz enthalten. Die Aminosäuresequenzen dieser Domäne bilden ein sogenanntes β -barrel, bestehend aus acht β -Faltblatt Strukturen, die zwei Wendemotive und zwei α -Helix Strukturen enthalten. Letztere wirken als ein molekulares Scharnier und verbinden die benachbarten Domänen, ED2 und ED3, mit ED1 (Huanga *et al.*, 2010). Zudem enthält die Sequenz zwei Disulfidbrücken, die zwischen Bereichen der ED1.1 Sequenz sowie zwischen den Sequenzen ED1.2 und ED1.3 ausgebildet werden. Für die Herstellung dieser Domäne als rekombinantes Protein wurden die drei Sequenzabschnitte mit einer Verlinkung, bestehend aus den drei Aminosäuren Glycin, Prolin und Glycin (GPG), verbunden. Diese Sequenz findet sich im Glykoprotein gp120 des HI-Virus wieder und wurde gewählt, da sie ein Wende-Motiv (*turn motif*) bildet und dadurch eine flexible *linker* Region entsteht. Eine schematische Darstellung der drei Domäne 1 Sequenzabschnitte und des GPG-links ist in Abb. 4 (S. 17) gezeigt.

ED1

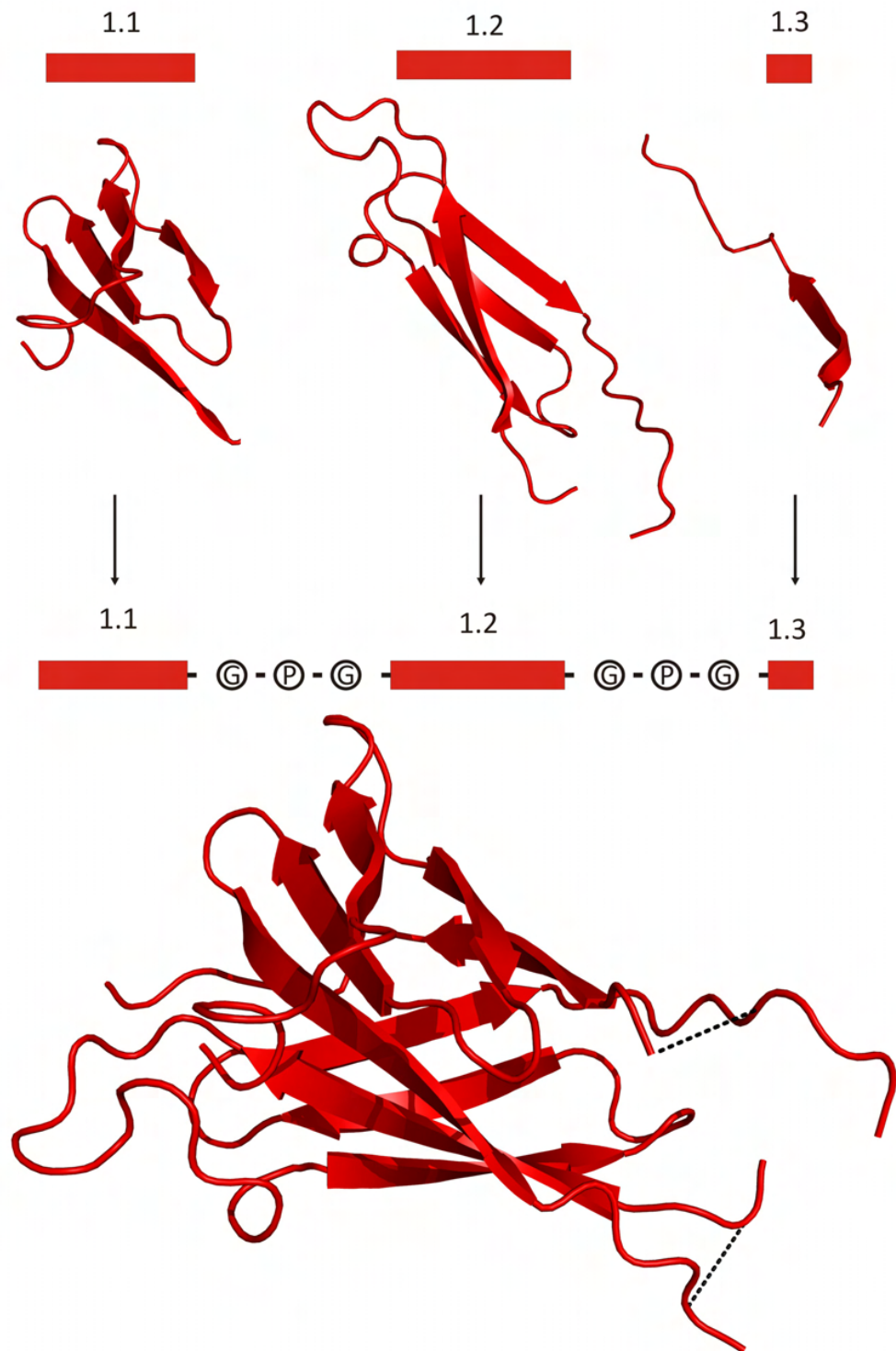


Abb. 4 Schematische Darstellung der Herstellung von Domäne 1-Konstrukten. Dargestellt sind die drei Gen-Abschnitte und die Proteinstrukturen, die von den Abschnitten kodiert werden. Durch einen schematisch dargestellten GPG-link werden die Gen-Fragmenten verknüpft. Die Positionen der beiden links sind in der Proteinstruktur dargestellt. Die Proteinstrukturen (PDB-File: 3G7T) wurden mit der Software Pymol erstellt.

ED2

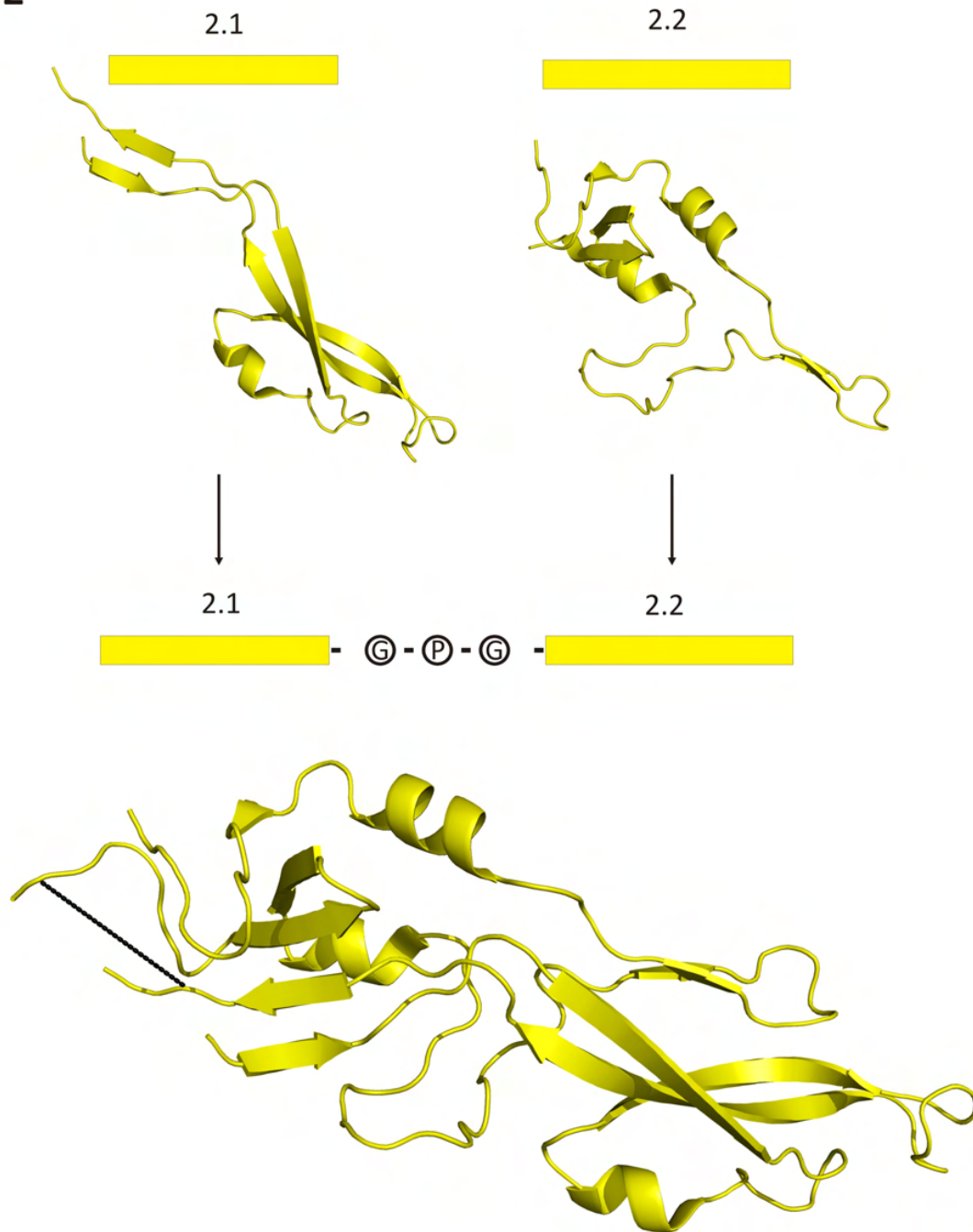


Abb. 5 Schematische Darstellung der Herstellung von Domäne 2-Konstrukten. Dargestellt sind die zwei Gen-Abschnitte und die Proteinstrukturen, die von den Abschnitten kodiert werden. Durch einen schematisch dargestellten GPG-link werden die Gen-Fragmenten verknüpft. Die Position des links ist in der Proteinstruktur dargestellt. Die Proteinstrukturen (PDB-File: 3G7T) wurden mit der Software Pymol erstellt.

1.3.2 Domäne 2-Konstrukte

Die E-Protein Domäne 2 (ED2) wird durch zwei Gen-Fragmente kodiert (ED2.1, ED2.2). Sie enthält das interne Fusionspeptid des E-Proteins, welches eine *loop* Struktur bildet. Die Aminosäuresequenz dieser Fusionsstruktur ist innerhalb der Flaviviren hoch konserviert und vermittelt die Verschmelzung von Virus-Partikel und Zellmembran. Da diese Struktur zudem mit antiviralen, monoklonalen Antikörpern reagiert, die kreuzreaktiv zwischen Flaviviren sind, stellt sie einen potenten Inhibitor der Infektion dar (Huanga *et al.*, 2010). Die Sequenz der Domäne 2 enthält insgesamt drei Disulfidbrücken, die alle zwischen Bereichen der ED2.1 Sequenz ausgebildet werden. Für die Herstellung dieser Domäne als rekombinantes Protein wurden die zwei Sequenzabschnitte ebenfalls mit einem GPG-*link* verbunden. Eine schematische Darstellung der zwei Domäne 2 Sequenzabschnitte und des GPG-*links* ist in Abb. 5 (S. 18) gezeigt.

1.4 Expression und Proteinaufreinigung

Für die Herstellung rekombinanter Proteine existieren verschiedene Expressionssysteme, wie z.B. Bakterien, Hefen, Insektenzellen und Säugetierzellen. Um virale Proteine in ihrer nativen Form zu exprimieren, muss ein Expressionssystem genutzt werden, welches dem natürlichen Wirtsorganismus am nächsten ist. Die Expression in *E. coli* Bakterien wird häufig genutzt, da sie einfach zu handhaben und günstig ist, hohe Wachstumsraten aufweist und zu hohen Ausbeuten führt. Sie ist für die Expression von kleinen Proteinen geeignet, die sich größtenteils selbst falten können. Im Periplasma der Bakterien existieren zudem Enzyme, die die Entstehung von Disulfidbrücken katalysieren. In einigen Studien konnte die Domäne 3 des E-Proteins bereits erfolgreich und in der nativen Form in Bakterien exprimiert werden (Jaiswal, 2004; Volk, 2007; Tripathi, 2008; Volk, 2009). Daher wurde auch in dieser Arbeit das *E. coli* Expressionssystem genutzt. Die ED1- und ED2-Sequenzen wurden mit verschiedenen molekularbiologischen Methoden hergestellt und anschließend in ein geeignetes Plasmid inkloniert. Plasmide sind kleine, ringförmige DNA-Moleküle, die sich autonom replizieren können und in Bakterien und Archaeen vorkommen. Diese werden genetisch verändert, sodass nur bestimmte Eigenschaften erhalten bleiben. Des Weiteren wird ein

Polylinker (*multiple cloning site*, MCS) eingeführt, der mehrere Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthält, die nur einmal im ganzen Plasmid vorkommen. Daher können diese Schnittstellen genutzt werden, um dort gezielt Sequenzen einzubringen. In dieser Arbeit wurde das *E. coli*-Plasmid pMAL-p4X verwendet, welches *upstream* zur MCS für das Protein MBP (*maltose binding protein*) kodiert. Bedingt durch die Position der MCS wird die einklonierte ED1- oder ED2-Sequenz zusammen mit dem MBP als Fusionsprotein exprimiert. Dies ist vorteilhaft für die Aufreinigung des Zielproteins mittels Affinitätschromatografie.

1.5 Diagnostische Methoden

Während der akuten Phase einer Infektion, bis ca. sechs Tage nach dem Einsetzen der Symptome, ist die Virämie im Blut der Patienten ausreichend hoch, um Methoden des direkten Virusnachweises für die Diagnostik zu nutzen. Diese sind jedoch abhängig von der Virus-Konzentration im Blut und daher auf diesen Zeitraum beschränkt. Zum Erstellen einer Diagnose werden die Viren aus dem Blut der Patienten isoliert und sequenziert. Für die direkte Detektion viraler RNA wird die RT-PCR oder *real-time* RT-PCR verwendet (Harris *et al.*, 1998; Lanciotti *et al.*, 1992). Auch können Viren aus Patientenblut isoliert, kultiviert und z.B. durch indirekte Immunfluoreszenz mittels monoklonaler Antikörper detektiert werden. Allerdings gelingt die Anzucht der Wildtyp-Viren nicht in allen Fällen und es wird Equipment der biologischen Sicherheitsstufe 3 (BSL3) benötigt (Vaughn *et al.*, 2000; WHO/TRD, 2009). Des Weiteren existieren ELISA-Tests, bei denen Serotyp-spezifische, monoklonale Antikörper an das sekretierte NS1-Protein des Virus binden.

Für den Nachweis einer Dengue-Infektion nach der akuten Phase müssen serologische Verfahren, wie der Neutralisationstest (NT), genutzt werden, da das Virus nicht mehr im Patienten zirkuliert. Hierfür werden entweder isoliertes Wildtyp-Virus oder spezielle Reporter-Partikel genutzt. Letztere tragen die Oberflächenproteine der Dengue-Viren, sind jedoch replikationsinkompetent (Mattia *et al.*, 2011). Serologische Tests, bei denen rekombinante Antigene eingesetzt werden, stellen eine preisgünstige und schnelle Methode dar, um viele Patientenserum parallel zu testen. Ein entsprechender Serotyp-spezifischer Dengue-Test wurde bereits entwickelt. Mittels Western-Blot kann die Reaktivität von Patientenserum mit E-Protein Domäne 3-Antigenen aller vier Dengue-

Serotypen ermittelt werden. Es konnte damit eine zuverlässige Serotypisierung für Konvaleszenz-Seren von Reiserückkehrern mit primärer DENV-Infektion festgestellt werden. Jedoch war für Seren aus endemischen Gebieten mit sekundären Infektionen keine eindeutige Zuordnung möglich (Ludolfs *et al.*, 2002). Des Weiteren existiert ein Serotyp-spezifischer (ICB) ELISA-Test, der auf der Kompetition kreuz-reaktiver Antikörper mit Domäne 3-Antigenen basiert. Diese wurden in *E. coli* exprimiert und mit Patientenseren getestet. Bei Patienten mit einer primären Infektion war eine zuverlässige Serotypisierung möglich (Emmerich, 2013).

1.6 Vorarbeiten

Bisher hat sich die Forschung auf die humorale Immunantwort gegen E-Protein Domäne 3 fokussiert (siehe 1.4), wohingegen die separaten Domänen 1 und 2 gar nicht untersucht wurden. Daher wurde in der LG Schreiber (BNI) die Expression dieser Domänen für alle Dengue-Serotypen angestrebt. Im ersten Ansatz wurde zur Verbindung der Fragmente ein GPG-*link* eingesetzt und die Expression erfolgte als MBP-Fusionsprotein in *E. coli*. Anschließend wurde die Reaktivität mit 988 Patientenseren aus Kambodscha untersucht. Es stellte sich heraus, dass die ED1- und ED2-Antigene des Serotyps DENV-2 und ED1-Antigene des Serotyps DENV-4 in mindestens 90 % der Fälle Reaktionen mit den Seren aufweisen. Auch die DENV-4 ED2-Antigene zeigten hohe Reaktivität mit den Seren. Damit wurde gezeigt, dass durch einen GPG-*link* Proteine erzeugt werden können, die mit anti-DENV-Antikörpern reagieren. Im Gegensatz dazu zeigten die DENV-1 und DENV-3 Konstrukte kaum positive Reaktionen und wiesen zudem geringe Ausbeuten und mehrere Translationsabbruchprodukte auf.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer und Medien

In dieser Arbeit wurden folgende Puffer und Medien eingesetzt:

TAE-Puffer:	2 M TrisHCl pH 8,3 1 M Essigsäure 0,1 M EDTA
DNA-Ladepuffer:	20 % (v/v) Glycerin 1 % (w/w) SDS 0,1 M EDTA 0,25 % (w/w) Bromphenolblau
YT-Medium:	0,8 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl
YT-Agar:	YT-Medium 1,6 % (w/v) Agar
dYT-Medium:	1,6 % (w/v) Trypton 1 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl
dYT-amp-Medium:	dYT-Medium 0,2 % (w/v) Glucose 200 µg/ml Ampicillin

Puffer A:	20 mM Tris-HCl pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer B:	20 mM Tris-HCl pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Maltose
Sammelgel-Puffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,31 % (w/v) SDS
Trenngel-Puffer:	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,62 % (w/v) SDS
3x Proteinladepuffer:	875 μ M Tris/HCl pH 6,8 6 % (w/v) SDS 13 % (v/v) Glycerin 0,0125 % (w/v) Bromphenolblau 60 mM DTT
Laemmli-Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl pH 8,9 200 mM Glycin 0,3 mM SDS
Fairbanks A:	25% (v/v) 2-Propanol 10% (v/v) Essigsäure 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250
Fairbanks D:	10% (v/v) Essigsäure
1x PBS-Puffer:	137 mM NaCl pH 7,4 12 mM Phosphat 2,7 mM KCl

PBST-Puffer:	1x PBS
	0,1 % (v/v) Tween20
Blocklösung:	1x PBST
	5 % (w/v) Magermilchpulver

2.1.2 Detektionsantikörper

Anti-human IgG, HRP-konjugierter Antikörper aus der Ziege (Biorad)

2.1.3 DENV-positive Patientenseren aus Kolumbien

Die Patientenseren stammen aus Kolumbien und wurden von Dr. Simone Kann zur Verfügung gestellt. Das Set bestand aus 55 Dengue positive Seren, von denen 43 in der Akutphase (2-6 Tage nach Einsetzen von Symptomen) und zwölf Konvaleszenz-Proben nach 2-5 Wochen entnommen wurden. Des Weiteren waren fünf Dengue negative Seren im Set enthalten, wobei diese Patienten alle gegen Gelbfieber (YFV) geimpft sind.

2.1.4 Enzyme

PstI-HF	20.000 U/ml	(New England Biolabs)
EcoRI-HF	20.000 U/ml	(New England Biolabs)
BamHI-HF	20.000 U/ml	(New England Biolabs)
DpnI	500 units	(Fermentas)
T4-DNA-Ligase	5 Weiss U/μl	(Fermentas)
Lysozym	lyophilisiert	(SIGMA Aldrich)

2.1.5 Molekulargewichtsstandards

1 kb DNA Ladder	(New England Biolabs)
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	(Fermentas)
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	(Fermentas)
PageRuler Prestained Protein Ladder	(Fermentas)

2.1.6 Kits

GeneJET Plasmid Miniprep Kit	(ThermoScientific)
Phusion [®] High Fidelity PCR Kit	(New England Biolabs)
Gibson Assembly [®] Master Mix	(New England Biolabs)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen)

2.1.7 Antibiotika

Die Ampicillin (Amp) Stocklösung hatte eine Konzentration von 60 mg/ml und wurde nach der Herstellung sterilfiltriert. Die Zielkonzentration im Medium und in Agarplatten betrug 200 µg/ml. Die Tetracyclin (Tetr) Stocklösung hatte eine Konzentration von 50 mg/ml und wurde nach der Herstellung sterilfiltriert. Die Zielkonzentration in Medium und Agarplatten betrug 25 µg/ml.

2.1.8 *E. coli*-Stämme

BL21(DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻
XL1blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)

Die beiden *E. coli*-Stämme BL21(DE3) und DH5 α wurden für die Expression der rekombinanten Dengue-Proteine genutzt. Der XL1*blue*-Stamm wurde zur Vervielfältigung von Plasmiden nach der Mutagenese-PCR (2.2.1.3) verwendet, da dieser die Lücken (*nicks*), der *in vitro* hergestellten DNA, reparieren kann. Diese entstehen aufgrund einer fehlenden Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden der Plasmid-DNA.

2.1.9 Plasmide und Oligonukleotide

Für die Herstellung der rekombinanten Dengue-Proteine im *E. coli*-Expressionssystem wurde das Plasmid pMAL-p4x genutzt. Das Plasmid (6720 Basenpaare) enthält einen Replikationsursprung, eine Ampicillin-Resistenz und einen *tac*-Promotor, der die Expression des rekombinanten Proteins reguliert. Zudem enthält das Plasmid einen Polylinker (*multiple cloning site*, MCS), in welche die jeweilige Zielsequenz eingebracht wurde. *Upstream* zur MCS befindet sich das *maltE*-Gen, welches das Maltose-bindende Protein (*maltose binding protein*, MBP) kodiert. Daher wurden alle rekombinanten Proteine als MBP-Fusionsprotein exprimiert. Die Überexpression des Fusionsproteins wurde mit IPTG induziert. Die anschließende Aufreinigung ist mit Hilfe einer MBP-Affinitätschromatografie möglich. Das Plasmid pET20b wurde in Vorarbeiten verwendet (siehe 1.5) und diente als Vorlage für die Umklonierung, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

pMALTM-p4x (New England Biolabs; Plasmidkarte Anhang A)

pET20b (Novagen, Plasmidkarte; Anhang B)

Die Synthese, der in dieser Arbeit verwendeten Primer/ Oligonukleotide, erfolgte durch die Firma Metabion. Eine Übersicht befindet sich im Anhang C und D.

Nomenklatur der hergestellten Konstrukte:

<u>E-Protein Domäne</u>	<u>Serotyp</u>	<u>Konstrukt Nr.</u>
ED1 = Domäne 1	1 = DENV-1	_X.Y : fortlaufende Nummerierung pro Domäne und Serotyp
ED2 = Domäne 2	3 = DENV-3	

z.B. **ED1₁1.0** = Domäne 1, DENV-1, Konstrukt Nr. 1

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) ist eine *in vitro*-Technik, die einen thermischen Zyklus einsetzt, um gezielt DNA-Sequenzen zu vervielfältigen.

Für die Umklonierung der Sequenz ED1₁2.0 aus dem pET20b-Plasmid in das pMAL-p4X-Plasmid wurde zunächst das *Phusion® High Fidelity* PCR Kit verwendet, um auf diese Weise die Zielsequenz gezielt aus dem Plasmid heraus zu amplifizieren. Als DNA-Matrize (*template*) diente hierbei das pET20b-Plasmid mit der einklonierten ED1₁2.0 Sequenz. Nach einer initialen Denaturierung des Doppelstrang-DNA-Plasmids bei 98 °C, wodurch DNA-Einzelstränge entstehen, beginnt der PCR-Zyklus. In der Primer-Anlagerungsphase (*annealing*) lagern sich die beiden Primer (siehe Anhang C) spezifisch an die komplementären Stränge der Zielsequenz an. Die *annealing* Temperatur ist abhängig von der Länge des Primers und der Zusammensetzung der Nukleinbasen. Im nächsten Schritt erfolgt die Elongation der Zielsequenz durch die DNA-Polymerase bei 72 °C. Die Replikation erfolgt in 5'–3' Richtung. Als DNA-Bausteine dienen hierbei die Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs). Anschließend werden die entstandenen DNA-Doppelstränge bei 98 °C denaturiert und der Zyklus beginnt erneut. Im Folgenden ist der Reaktionsansatz und das verwendete PCR Programm tabelliert:

<u>Reaktionsansatz:</u>	50 µl Ansatz	<u>PCR Programm:</u>	
<i>template</i> (1:10 verdünnt)	1 µl	98°C	30 sec
10 µM <i>Forward</i> Primer	2,5 µl	98°C	10 sec
10 µM <i>Reverse</i> Primer	2,5 µl	64°C	30 sec
10 mM dNTPs	1 µl	72°C	30 sec
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	72°C	5 min
5x Phusion GC Buffer	10 µl		
ddH ₂ O	32,5 µl		

Um das PCR-Produkt von Puffersubstanzen, Nukleotiden und dem Enzym zu trennen, wurden die PCR-Ansätze anschließend mittels eines präparativen Agarosegels (siehe 2.2.6) und dem *QIAquick Gel Extraktions* Kit aufgereinigt.

Der nächste Schritt für die Umklonierung war ein Restriktionsverdau (2.2.2).

2.2.1.1 *Assembly* PCR

Die Synthese von DNA-Sequenzen erfolgte über eine *assembly PCR*, bei der Oligonukleotide von 40 - 60 nt Länge genutzt wurden, um längere DNA-Sequenzen zu generieren. Die Oligonukleotide wurden so designt, sodass sich die Fragmente jeweils um 20 bp überlappen und auf diese Weise die komplette Zielsequenz amplifiziert werden kann (Bryksin, 2010). Eine schematische Darstellung ist in Abb. 6 (S. 29) gezeigt.

Für die Herstellung der ED1₃_2.0 Zielsequenz wurden auf Grundlage der RNA-Genomsequenz des DENV-3-Isolates H87 (Osatomi, 1990) zehn Oligonukleotide erstellt, welche die gewünschte Sequenz kodieren (Anhang D). Diese wurden mit einer Konzentration von 10 µM pro Oligonukleotid im gleichen Verhältnis in der ersten PCR eingesetzt. Dort hybridisieren die Oligonukleotide und die Lücken zwischen den Doppelstrangbereichen wurden durch die DNA-Polymerase aufgefüllt, sodass vollständige DNA-Doppelstränge entstehen. Dieser Ansatz wurde in der zweiten PCR als *template* für die zwei endständigen Oligonukleotide (*flanking* Primer) eingesetzt, welche die Zielsequenz gezielt amplifizieren und zusätzlich Restriktionsschnittstellen einführen, um das Einklonieren in die MCS des pMAL-p4X-Plasmids zu ermöglichen. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des Fragments (30 Sekunden pro kb). Da das *insert* 422 bp lang ist, waren 30 Sekunden ausreichend.

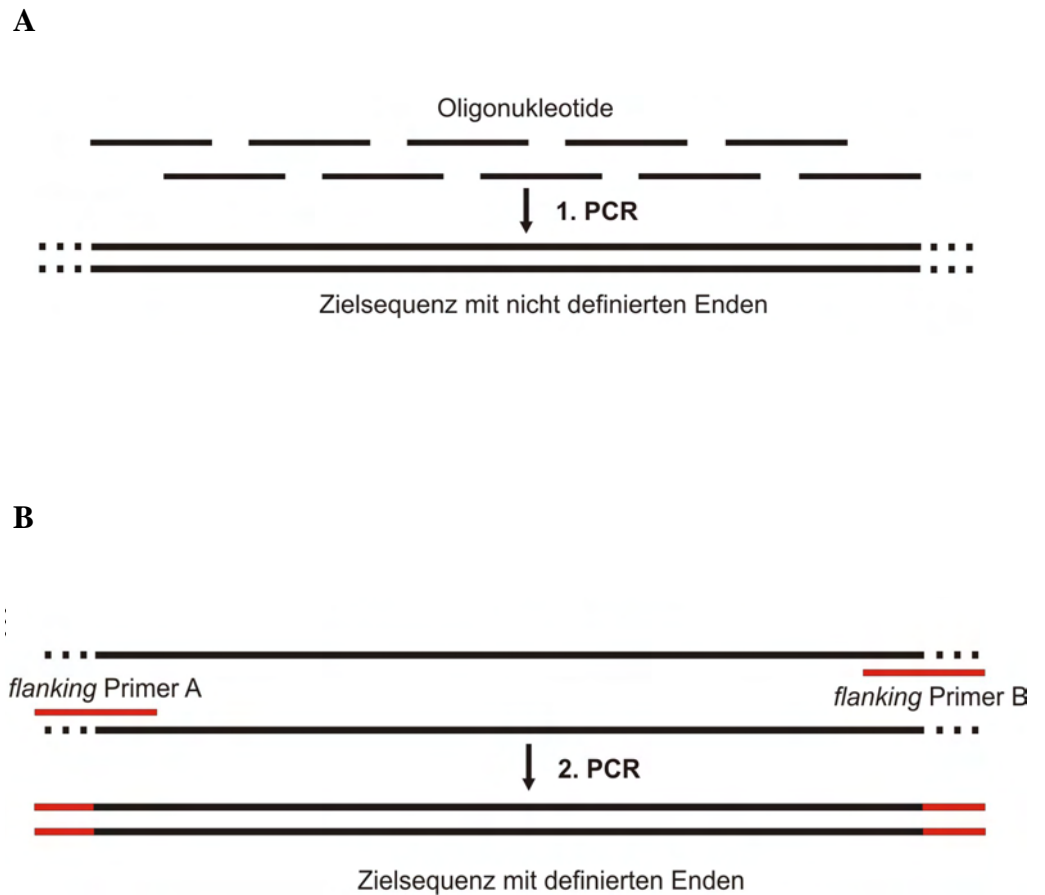


Abb. 6 Schema einer *assembly PCR*.

A Die überlappenden Oligonukleotide bilden die komplette Zielsequenz ab und werden während der ersten PCR zu einem vollständigen Doppelstrang zusammgefügt, dessen Ende nicht definiert sind.

B Die Zielsequenz wird in der zweiten PCR gezielt amplifiziert, indem *flanking* Primer eingesetzt werden. Diese binden an den äußeren Enden der Zielsequenz, wodurch nicht vollständig zusammgefügte Sequenzen aus der ersten PCR nicht weiter amplifiziert werden.

Im Folgenden sind die Reaktionsansätze und die verwendeten PCR Programme der *assembly* PCR aufgeführt:

<u>Reaktionsansatz 1.PCR:</u>	<u>50 µl Ansatz</u>	<u>PCR Programm:</u>		
10 µM Oligo-Mix 1-10	25 µl	98°C	1 min	
10 mM dNTPs	1 µl	98°C	10 sec	•
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	56°C	30 sec	15 Zyklen
5x Phusion GC Buffer	10 µl	72°C	30 sec/kb	
ddH ₂ O	13,5 µl	72°C	3 min	

<u>Reaktionsansatz 2.PCR:</u>	<u>50 µl Ansatz</u>	<u>PCR Programm:</u>		
<i>template</i> (=1.PCR)	2 µl	98°C	1 min	
10 µM <i>Forward</i> Primer	2,5 µl	98°C	10 sec	•
10 µM <i>Reverse</i> Primer	2,5 µl	56°C	30 sec	35 Zyklen
10 mM dNTPs	1 µl	72°C	30 sec/kb	
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	72°C	3 min	
5x Phusion GC Buffer	10 µl			
ddH ₂ O	31,5 µl			

Um das PCR-Produkt von Puffersubstanzen, Nukleotiden und dem Enzym zu trennen, wurden die PCR-Ansätze anschließend mittels eines präparativen Agarosegels (siehe 2.2.7.2) und dem *QIAquick Gel Extraktions Kit* aufgereinigt.

Im nächsten Schritt erfolgte der Restriktionsverdau der erhaltenen Sequenz (2.2.2).

2.2.1.2 Kolonie-PCR

Um festzustellen, ob die Bakterien während der Transformation das Plasmid aufgenommen haben, das die Zielsequenz (*insert*) enthält, wurde eine Kolonie-PCR mit ausgewählten Bakterienkolonien durchgeführt. Diese wurden selektiven Agarplatten entnommen, in 20 µl sterilem Wasser resuspendiert und 20 Minuten bei 98 °C lysiert. Für die PCR wurden 5 µl des Ansatzes als *template* eingesetzt.

Zusätzlich wurden die Oligonukleotide, die für die spezifische Amplifikation des *inserts* genutzt wurden, als Primer verwendet. Der Reaktionsansatz und die Bedingungen

entsprechen denen der PCR (2.2.1). Enthält das Plasmid der gewählten Kolonie das *insert*, so wird dieses amplifiziert und mit Hilfe des analytischen Agarosegels visualisiert (2.2.7.1). Somit kann die Aufnahme des *inserts* bestätigt werden.

2.2.1.3 Mutagenese-PCR

Um eine Punktmutation in die Zielsequenz auf dem Plasmid einzuführen oder um eine Deletion bzw. Insertion mehrerer Aminosäuren herbeizuführen, wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Dazu wurden zunächst Mutagenese-Primer erstellt, die eine Gesamtlänge von 25-45 bp aufweisen und die einzuführende Mutation mit 10-15 bp flankieren. Der Reaktionsansatz enthält neben den Mutagenese-Primern auch 1 µl des Ursprungsplasmids als *template*. Da bei dieser Methode das komplette Plasmid amplifiziert wurde, ist die Elongationszeit abhängig von der Größe des Plasmids (30 Sekunden pro kb Plasmid). Die Anzahl der PCR-Zyklen ist wiederum abhängig von der Anzahl der fehlgepaarten Basenpaare (Mutationsart). Im Folgenden sind Reaktionsansatz und das verwendete PCR Programm zusammengefasst:

<u>Mutationsart:</u>	(Anzahl fehlgepaarter Basenpaare)	<u>*Anzahl der Zyklen:</u>
Punktmutation	(1 bp)	12
Aminosäureaustausch	(3 bp)	16
Deletion/Insertion von Aminosäuren	(6-18 bp)	18

<u>Reaktionsansatz PCR:</u>	<u>51µl Ansatz</u>	<u>PCR Programm:</u>	
<i>Template</i>	0,5µl	98°C	30 sec
10 mM dNTPs	1 µl	98°C	30 sec
Phusion DNA Polymerase	1 µl	56°C	1 min
5x Phusion GC Buffer	10 µl	72°C	30 sec/kb *Zyklen
Primer forward (10pmol)	1,25 µl	72°C	5 min
Primer reverse (10pmol)	1,25 µl		
DMSO	1,5 µl		
ddH ₂ O	34,5		

Das Ursprungsplasmid wurde aus Bakterien isoliert und ist daher methyliert. Diese Eigenschaft wird genutzt, um es gezielt mit der Restriktionsendonuklease *DpnI* in kleine Fragmente zu spalten. Das neu synthetisierte Plasmid mit der eingebrachten Mutation wird nicht geschnitten, da *DpnI* ausschließlich methyliertes Adenin erkennt und dort die DNA spaltet. Im Folgenden ist der verwendete Restriktionsansatz gezeigt:

Restriktionsansatz:

PCR-Produkt	44 µl
DpnI	1 µl
10x Tango-Puffer	5 µl

Der Verdau wurde zwei Stunden bei 37 °C durchgeführt. Der Ansatz enthält im Anschluss ausschließlich das neue Plasmid, welches die Mutation trägt. Um das Plasmid von Puffersubstanzen, Nukleotiden und den Enzymen zu trennen, wurden die Restriktionsansätze mittels eines präparativen Agarosegels (siehe 2.2.7.2) und dem *QIAquick Gel Extraktions Kit* aufgereinigt. Abschließend wurden 5 µl Eluat des aufgereinigten Plasmids in *E. coli XL1blue* Bakterien transformiert (2.2.5).

2.2.2 Restriktionsverdau

Das aufgereinigte PCR-Produkt wird von zwei Restriktionsschnittstellen flankiert, die mit Hilfe der beiden endständigen Oligonukleotide (*flanking Primer*) während der PCR eingebracht wurden. Die gleichen Schnittstellen sind auch auf dem pMAL-p4X-Plasmid vorhanden.

Bei der ED1₁_2.0 Zielsequenz wurde ein Doppel-Restriktionsverdau durchgeführt, bei dem sowohl das Plasmid, als auch das PCR-Produkt einer Hydrolyse durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *PstI* unterzogen wurden. Bei der ED1₃_2.0 Zielsequenz wurde ein Einfach-Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *BamHI* durchgeführt, da hier sowohl *upstream* als auch *downstream* zum *insert* die gleichen Schnittstellen vorhanden waren. Das Plasmid wurde jeweils in einer Konzentration von 1 µg/µl zugesetzt. Von dem PCR-Produkt mit unbekannter Konzentration wurden 10 µl verwendet. Der Restriktionsverdau erfolgte eine Stunde bei 37 °C. Im Folgenden ist der verwendete Restriktionsansatz aufgeführt:

<u>Restriktionsansatz:</u>	<u>10 µl PCR-Produkt</u>	<u>1 µg Plasmid</u>
Restriktionsenzym	1 µl	1 µl
10x Puffer (New England Biolabs)	3 µl	3 µl
10x BSA (New England Biolabs)	3 µl	3 µl
Plasmid/ PCR-Produkt	10 µl	x µl
ddH ₂ O	13 µl	23 – x µl

Um das verdaute Plasmid und PCR-Produkt von Puffersubstanzen, BSA und den Enzymen zu trennen, wurden die Restriktionsansätze mittels eines präparativen Agarosegels (siehe 2.2.7.2) und dem *QIAquick Gel Extraktions Kit* aufgereinigt.

Der nächste Schritt für die Umklonierung der ED1_{1_2.0} Zielsequenz war die Ligation von PCR-Produkt und pMAL-p4X-Plasmid (siehe 2.2.3).

Der nächste Schritt für die Assembly-Reaktion der ED1_{3_2.0} Zielsequenz war das Gibson Assembly (siehe 2.2.4).

2.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die spezifisch hydrolysierten DNA-Fragmente, das Plasmid pMAL-p4X und das PCR-Produkt (ED1_{1_2.0} Zielsequenz), wurden nach der Aufreinigung im Verhältnis 1:3 in einen 20 µl Ligationsansatz eingesetzt. Dafür wurden 100 ng Plasmid und das PCR-Produkt im dreifach molaren Überschuss eingesetzt. Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei 22 °C. Anschließend wurden 10 µl des Ansatzes in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert (siehe 2.2.5). Im Folgenden ist der verwendete Restriktionsansatz gezeigt:

<u>Ligationsansatz:</u>	<u>20 µl Ansatz</u>
T4-DNA-Ligase (5 Weiss U/ul)	1 Weiss U = 0,2 µl
10x Ligase-Puffer (New England Biolabs)	2 µl
Plasmid (pMAL-p4X)	100 ng
PCR-Produkt (ED1 _{1_2.0} Zielsequenz)	dreifach molarer Überschuss = 17,87 ng
ddH ₂ O	add 20µl

2.2.4 Gibson Assembly

Die isothermale Klonierung nach Gibson ist eine Methode zur Ligation von DNA-Fragmenten (Gibson *et al.*, 2009). Sie läuft bei gleichbleibender Temperatur ab (50 °C, 15 min) und wurde genutzt, um die ED1₃_2.0 Zielsequenz (*insert*) in das Plasmid zu klonieren.

Hierfür wurde der *Gibson Assembly*® *Master Mix* verwendet. Das verdaute Plasmid und *insert* wurden im molaren Mengenverhältnis 1:2 hinzugefügt. Der Mastermix enthält eine Exonuklease, die eine 3′–5′ Aktivität besitzt, wodurch DNA-Fragmente mit einem 5′–3′ Überhang von 20-40 Nukleotiden (nt) entstehen. Komplementäre Sequenzen können sich entsprechend aneinander anlagern. Im nächsten Schritt wird die DNA-Polymerase (ebenfalls im Mastermix enthalten) aktiv und füllt die Lücken mit dNTPs auf. Im letzten Schritt wird die ebenfalls enthaltene Ligase aktiv und verknüpft die Lücken, sodass abschließend ein Plasmid mit dem inklonierten *insert* vorliegt. Im Folgenden gezeigt ist der verwendete Gibson Assembly Ansatz:

Gibson Assembly Ansatz:

Plasmid (pMAL-p4X)	50 ng
<i>insert</i> (ED1 ₃ _2.0 Zielsequenz)	zweifach molarer Überschuss = 6,3 ng
Gibson Assembly Master Mix	10 µl
ddH ₂ O	add 20 µl

Abschließend wurden 2 µl einer 1:4 Verdünnung des Ansatzes in *E. coli* DH5α-Bakterien transformiert (2.2.5).

2.2.5 Transformation in chemokompetente Bakterien

Die chemokompetenten Bakterien (Herstellung siehe 2.3.2) wurden auf Eis aufgetaut und anschließend zusammen mit der Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die jeweils eingesetzte Menge an DNA und Bakterien ist von der Methode abhängig, die zuvor zur Gewinnung der Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Die unterschiedlichen Mengen sind im Folgenden dargestellt. Die Bakterien, die später für die

Expression der rekombinanten Antigene eingesetzt wurden, enthalten Plasmide, die mittels Plasmid-Präparation (2.2.6) aufgereinigt wurden.

<u>Plasmid-DNA Ursprung:</u>	<u>Menge Plasmid-DNA:</u>	<u>Menge & Stamm der Bakterien:</u>
Mutagenese-PCR	5 µl Eluat	100 µl <i>XL1blue</i>
Ligation	10 µl Ansatz	100 µl <i>DH5α</i>
Gibson Assembly	2 µl Ansatz (1:4)	50 µl <i>DH5α</i>
Plasmid-Präparation	1 µl Eluat	100 µl <i>DH5α</i> * / <i>BL21(DE3)</i> *

* Diese Bakterien wurden für die Expression eingesetzt

Anschließend wurde für 90 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C im Thermoblock durchgeführt. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt und mit 800 µl YT-Medium versetzt. Es folgte eine 45 minütige Wachstumsphase im Thermoschüttler bei 37 °C und 800 rpm. Die Bakterien wurden mittels Zentrifugation bei 8000 rpm pelletiert, in 100 µl YT-Medium resuspendiert und auf selektiven Agarplatten ausplattiert. Die verwendeten Bakterienstämme, die das pMAL-p4X-Plasmid aufgenommen haben, und deren Antibiotika-Resistenzen sind im Folgenden gezeigt:

<u>Bakterienstamm:</u>	<u>Antibiotika Resistenz:</u>
<i>XL1blue</i>	Ampicillin & Tetracyclin
<i>DH5α</i> & <i>BL21(DE3)</i>	Ampicillin

Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

2.2.6 Plasmid-Präparation

Um Plasmid-DNA aus den Bakterien zu isolieren, wurde zunächst eine Bakterienkolonie gepickt und in 4 ml dYT-Medium über Nacht bei 37 °C im Drehinkubator angezogen. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation für 5 Minuten bei 8000 rpm. Es wurde das *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* genutzt. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im letzten Schritt wurde die Plasmid-DNA mit 50 µl sterilem Wasser von der Säule eluiert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Proben wurden 1:10 in sterilem Wasser verdünnt und in Quarzküvetten vermessen. Die Konzentration (c) wurde nach folgender Formel berechnet und wird in $\mu\text{g/ml}$ angegeben.

$$c = OD_{260} \times V \times F$$

V: Verdünnungsfaktor

F: Multiplikationsfaktor (für Doppelstrang-DNA = 50)

Zudem wurde das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} bestimmt, um den Grad der Verunreinigung zu bestimmen. Ist Doppelstrang-DNA vorhanden, so liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte weisen auf Kontamination mit Proteinen und aromatischen Substanzen hin, höhere Werte auf Kontamination mit RNA.

2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Proben wurden Horizontal-Elektrophoresekammern der Firma Biorad (Sub-Cell Model 96 Cell) genutzt. Es wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet, die einen Trennbereich von 500-7000 bp aufweisen und damit sowohl die *inserts* als auch das pMAL-p4X-Plasmid abbilden können. Zum Anfärben der DNA wurde Ethidiumbromid, ein Phenanthridin-Farbstoff, hinzugegeben. Der Lauf erfolgte 30-45 Minuten im TAE-Puffer bei 100 V und 300 mA. Die Auswertung konnte mittels UV-Detektion durchgeführt werden, da das Ethidiumbromid die DNA interkaliert und der sich bildende Komplex durch das UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt wird.

2.2.7.1 Analytisches Gel

Für die Konzentrationsbestimmung der PCR-Proben sowie für die Auswertung der PCR-Kontrollen wurde ein 1 %iges Agarosegel verwendet. Die Auswertung erfolgte durch UV-Detektion.

2.2.7.2 Präparatives Gel

Für die Aufreinigung der DNA aus einem Reaktionsgemisch wurde zunächst ein 1 %iges Gel hergestellt. Unter UV-Licht wurde die Bande mit der Ziel-DNA aus dem Gel herausgeschnitten. Die Extraktion dieser DNA wurde mit dem *QIAquick Gel Extraktions Kit* durchgeführt.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde von der Firma LGC Genomics durchgeführt. Die Proben mussten eine Konzentration von 80 ng/µl und ein Volumen von 30 µl aufweisen. Die Primer für die Sequenzierung wurden von der Firma hinzugesetzt. Verwendet wurde der LGC Primer lacZ93, da das pMAL-p4X-Plasmid das lacZ-Gen enthält, an dem dieser Primer bindet.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Herstellung Medium und Agarplatten

Die Bestandteile der Medien und der Agarplatten (2.1.1) wurden in destilliertem Wasser gelöst und 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Antibiotika und die Agarplatten wurden in sterile Petrischalen gegossen. Abschließend wurden diese 2-3 Tage bei 37 °C im Brutschrank gelagert. Dies dient als Sterilitätskontrolle. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte bei 8 °C. Das Medium enthält zusätzlich Glukose, die nach dem Autoklavieren zugesetzt wurde.

2.3.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Für die Erzeugung von chemokompetenten Bakterien wurde zunächst eine Bakterienkolonie des jeweiligen Stammes gepickt und in 4 ml YT-Medium über Nacht bei 37 °C im Drehinkubator hochgezogen. Mit dieser Vorkultur wurde am Folgetag die

300 ml Hauptkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die Bakterien wurden im ThermoMixer (Eppendorf) bei 37 °C und 180 rpm bis zur einer Zelldichte von 0,3 - 0,4 (OD₆₀₀) angezogen. Anschließend wurde die Suspension auf Eis gekühlt. Die folgenden Arbeitsschritte wurden alle bei 4 °C ausgeführt. Nach der Zellernte durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 5000 rpm wurde das Zellpellet in 40 ml einer 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut unter den gleichen Bedingungen pelletiert. Die Bakterien wurden in 2 ml der 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Während dieser Zeit verändern die Kalziumionen die Permeabilität der Zellmembran und steigern auf diese Weise das Aufnahmepotential für DNA. Bei einer Lagerung im Kühlschrank konnten die Bakterien eine Woche lang genutzt werden.

2.3.3 Expression rekombinanter Fusionsproteine

Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in den *E. coli*-Stämmen BL21(DE3) und DH5 α . Zunächst wurde eine Bakterienkolonie von der Transformationsplatte gepickt und in 4 ml dYT-amp-Medium (2.1.1) über Nacht bei 37 °C im Drehinkubator hochgezogen. Aus dieser Vorkultur wurde am Folgetag die Hauptkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft. Die ursprünglichen Konstrukte (siehe 3.1) wurden in 300 ml dYT-amp-Medium und die in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte (siehe 3.1.1 und 3.1.2) in 25 ml dYT-amp-Medium exprimiert. Die Bakterien wurden im ThermoMixer (Eppendorf) bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer Zelldichte von 0,6 - 0,7 (OD₆₀₀) angezogen und dann mit 300 μ M IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase (ca. 3 - 4 Stunden) wurden die Bakterien mittels Zentrifugation für drei Minuten bei 10.000 rpm geerntet. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss (2.3.4).

Für die Expressionsanalyse wurden vor der Induktion und am Ende der Expression Proben der Bakterienkultur im Volumen 1/OD₆₀₀ genommen, fünf Minuten bei 8.000 rpm zentrifugiert und anschließend in 100 μ l Protein-Ladepuffer (2.1.1) resuspendiert.

2.3.4 Cytoplasmatischer Zellaufschluss

Nach der Expression wurde das Zellpellet in Puffer A (2.1.1) resuspendiert (1 ml Puffer pro 1 g Zellpellet). Bei der 300 ml Expression wurden ca. 5 ml Puffer eingesetzt, und bei der 25 ml Expression ca. 1 ml Puffer. Das im Puffer enthaltene EDTA destabilisiert die äußere Membran der gram-negativen *E. coli*-Bakterien, indem es bivalente Kationen komplexiert, wodurch LPS abgegeben wird. Zusätzlich wurden 5 mg/ml Lysozym hinzugefügt, welches die Peptidoglykan-Schicht angreift. Diese Aufschlussmethode wurde mit einer mechanischen Methode, dem Ultraschall-Aufschluss, kombiniert. Der Ultraschall-Desintegrator erzeugt Kavitationsblasen, die unter Erzeugung von hohen Drücken und Geschwindigkeiten implodieren und auf diese Weise die Zellwände der Bakterien zerreißen. Es wurden dreimal 20 Pulse (1,5 Sek. Puls, 1 Sek. Pause, 15 Watt) erzeugt und die Proben wurden durchgehend auf Eis gekühlt. Um die Zelltrümmer von dem Lysat abzutrennen, schloss sich eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 10.000 rpm an.

Für die Analyse des Aufschlusses wurde eine Probe aus dem Pellet der Zelltrümmer entnommen und in 200 µl Protein-Ladepuffer resuspendiert. Von dem Lysat wurden 100 µl entnommen und mit 50 µl Protein-Ladepuffer vermischt.

2.3.5 Periplasmatischer Zellaufschluss

Nach der Expression wurde das Zellpellet (ca. 1 g) vorsichtig in 10 ml eines Puffers mit hohem osmotischem Druck resuspendiert (30 mM Tris-HCl, 20 % (w/v) Sucrose, pH 8). Anschließend wurde 1 mM EDTA-Lösung (Endkonzentration) hinzugefügt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die äußere Membran zu destabilisieren. Nach einer 20 minütigen Zentrifugation bei 8500 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml eiskalter 5 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Dies löst den osmotischen Schock aus, bei welchem Wasser durch die Zellwand in das Innere eindringt und dort den internen Druck soweit erhöht, dass die Zellwände platzen. Da diese Methode an der Peptidoglykanschicht scheitert, werden nur periplasmatische Proteine freigesetzt. Um das osmotische Schock-Fluid von den Zellen abzusetzen, wurde eine weitere Zentrifugation

unter den vorherigen Bedingungen durchgeführt. Abschließend wurde dem Schock-Fluid 200 µl Lagerungspuffer (1 M Tris-HCl, pH 7,4) hinzugefügt.

Für die Analyse des Aufschlusses wurde eine Probe des Pellets genommen und in 200 µl Protein-Ladepuffer resuspendiert. Von dem Schock-Fluid wurden 100 µl entnommen und mit 50 µl Protein-Ladepuffer gemischt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Aufreinigung der Fusionsproteine/ Affinitätschromatografie

Für die Aufreinigung der Fusionsproteine wurde eine Affinitätschromatografie durchgeführt. Das Säulenmaterial (Matrix) besteht aus Amylose-Resin. Das MBP-Fusionsprotein bindet an die Matrix, während die übrigen *E. coli*-Proteine größtenteils keine Wechselwirkung mit der Matrix eingehen. Die Elution des MBP-Fusionsproteins erfolgt anschließend mit einem Maltose-haltigen Puffer (Puffer B, siehe 2.1.1). Die Maltose verdrängt das MBP-Fusionsprotein von den Bindungsstellen der Matrix. Abhängig von dem Volumen, in dem sich die aufgeschlossenen Proteine befinden, wurde eine 50 ml SPE-Säule oder eine *Mini Spin*-Säule verwendet. Die Säulen wurden mit 10 ml bzw. 1 ml Amylose-Resin-Matrix befüllt und mit 5 Säulenvolumen (CV, *column volume*) Puffer A (2.1.1) equilibriert. Anschließend wurde das Lysat hinzugegeben und schüttelnd für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wird der Durchfluss abgelassen und aufgefangen. Für die zwei folgenden Waschfraktionen wurde je 1 CV Puffer A verwendet und für die zwei Elutionsfraktionen je 1 CV Puffer B. Die einzelnen Fraktionen wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Für die Analyse der Chromatografie wurden je 100 µl aus den Fraktionen entnommen und mit 50 µl Proteinladepuffer vermischt.

2.4.2 Proteinkonzentrierung/ Ultrafiltration

Die Elutionsfraktionen, die das Fusionsprotein enthielten, wurden mit Hilfe einer Dead-End Ultrafiltration auf ein Endvolumen von 200 µl eingengt.

Genutzt wurden Amicon Filtrationseinheiten mit einer Ausschlussgrenze (*molecular weight cut-off*, MWCO) von 10.000 Da.

Für die Analyse der aufkonzentrierten Proteine wurde 25 µl von jedem Konzentrat entnommen und mit 8,3 µl 3x Proteinladepuffer (2.1.1) vermischt.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Proteinanalyse wurden Vertikal-Elektrophoresekammern der Firma Biorad und das diskontinuierliche Laemmli-System mit Sammel- und Trenngel verwendet (Laemmli *et al.*, 1970). Es wurden ausschließlich 10 %ige SDS-Trenngele nach folgenden Angaben hergestellt:

10%iges SDS Gel:	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/Bis-acrylamid	4 ml	1,06 ml
Trenngelpuffer	3 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,6 ml
ddH ₂ O	5 ml	5,34 ml
10 % (w/v) APS	75 µl	75 µl
TEMED	8 µl	9 µl

Für die Analyse der Proteinproben (Expression 2.3.3, Zellaufschluss 2.3.4, Aufreinigung 2.4.1, Proteinkonzentrierung 2.4.2) wurden diese zunächst für 15 Minuten bei 95 °C denaturiert. Das Pipettierschema für die Beladung der Gele ist in Tab. 1 (S. 42) gezeigt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 2,5 mA pro Gel über einen Zeitraum von ca. zwei Stunden. Die Färbung der Gele erfolgte nach der Methode von Fairbanks *et al.* mit Coomassie (Fairbanks *et al.*, 1971). Zusätzlich wurde eine Silberfärbung nach Merril *et al.* durchgeführt, wenn eine sensitivere Färbemethode aufgrund geringerer Proteinmengen erforderlich war (Merril *et al.*, 1981).

Tab. 1 Auftragungsmenge der SDS-Proben...

...für die Beurteilung der Expressionsleistung einzelner Konstrukte							
Marker	Expression		Zellaufschluss		Aufreinigung		
	Vor Induktion	Nach Induktion	Lysat	Pellet	Durchfluss	Waschfraktion	Elutionsfraktion
8 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	20 µl	30 µl	30 µl

...für die Beurteilung der aufkonzentrierten Fusionsproteinmengen		
Marker	Konzentrat ED1-Konstrukte	Konzentrat ED2-Konstrukte
8 µl	14 µl	28 µl

2.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben erfolgte photometrisch mit dem *NanoDrop*-Spektralphotometer. Der NanoDrop ermöglicht Absorptionsmessungen mit Probenvolumina von 1 µl im Wellenlängenbereich von 220 - 750 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt aufgrund der enthaltenen aromatischen Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) bei 280 nm. Die Konzentration wurde auf der Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet, welches den Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration herstellt.

2.4.5 dot Blot

Um die Reaktivität der rekombinant hergestellten Dengue-Antigene zu visualisieren, wurde die *dot* Blot-Methode eingesetzt. Für diesen Immunassay wurden die Proteine auf einen Nitrozellulose-Streifen (3 mm x 11,5 cm, Porengröße 0,45 µm) aufgetragen und mit Patientenserum (2.1.3) inkubiert. Die Detektion erfolgte indirekt über eine Farbreaktion. Zunächst wurden die rekombinanten Proteine in eine Reihe einer

384-Mikrowellplatte vorgelegt. Ein handgemachter Printer, bestehend aus 24 Stahlkugeln (\varnothing 2,5 mm), die in die Vertiefungen der Mikrowellplatte passen, wurde genutzt, um die Proteine auf die Nitrozellulose-Streifen aufzutragen. Auf diese Weise wurden ca. 0,5 μ l pro Antigen übertragen. Die Streifen wurden eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in schmale Inkubationswannen überführt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Streifen eine Stunde lang in Blocklösung (2.1.1) inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation der Streifen mit den Patientenseren. Die Seren wurden zuvor jeweils 1:100 mit Blocklösung verdünnt und zusammen mit MBP (50 μ g/ml Endkonzentration) über Nacht bei 8 °C inkubiert, um mögliche kreuzreagierende Antikörper abzufangen. Zudem enthält die Blocklösung Polysorbat-20, ein nichtionisches Tensid, welches unspezifische Bindungen verhindert. Um ungebundene Antikörper und Bestandteile der Seren aus den Inkubationswannen zu entfernen, folgten mehrere Waschschrte mit PBST-Puffer. Es folgte die Inkubation mit einem anti-human HRP-Konjugat als sekundären Antikörper. Dieser wurde im Verhältnis 1:750 mit der Blocklösung verdünnt und eine Stunde mit den Streifen inkubiert. Anschließend wurden mehrere Waschschrte mit PBST-Puffer gefolgt von PBS-Puffer durchgeführt. PBS-Puffer enthält kein Polysorbat-20 als Zusatz, damit das Tensid die folgende Entwicklungsreaktion nicht beeinflusst. Für die Entwicklerlösung wurde 4-Chloro-1-naphthol (4CN) in Methanol gelöst (3 mg/ml) und im Verhältnis 1:4 mit dem PBS-Puffer vermischt. Zusätzlich wurden 50 μ l Wasserstoffperoxid pro 100 ml Lösung hinzugegeben. Die an den sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) katalysiert die Farbreaktion, die durch Zugabe der Entwicklerlösung ausgelöst wird. Das Wasserstoffperoxid dient hierbei als Oxidationsmittel für den präzipitierenden Farbstoff 4CN. Das zuvor farblose Chromogen fällt nach der Reaktion als blauer Farbstoff auf der Membran aus. Die Farbintensität der entstehenden *dots* ist hierbei abhängig von der Menge der in den Patientenseren vorhandenen Antikörper. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Entwicklerlösung entfernt und die Nitrozellulose-Streifen wurden mit Wasser gewaschen.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die einzelnen Genabschnitte, die für die zwei Domänen des E-Proteins, ED1 und ED2, kodieren, mit einer Verbindungsregion, bestehend aus den drei Aminosäuren Glycin, Prolin und Glycin (*GPG-link*), zu einem neuen Konstrukt verbunden. Die entstandenen Konstrukte wurden in das pMAL-p4X-Plasmid inkloniert. Es wurden für ED1 und ED2, der Dengue-Serotypen DENV-1 und DENV-3, mehrere Konstrukte hergestellt, die sich durch die jeweilige Position des Aminosäure-*links* unterscheiden. Die Konstrukte konnten in *E. coli* als MBP-Fusionsproteine exprimiert werden. Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte mittels einer Affinitätschromatografie mit einer Amylose-Resin-Matrix. Die aufgereinigten Proteine wurden anschließend in einem serologischen Test als Antigene eingesetzt und haben erfolgreich mit Dengue positiven Patientenseren reagiert.

3.1 Sequenzdesign für Dengue-Antigene

3.1.1 E-Protein Domäne 1-Konstrukte

Die Domäne 1 ist Teil des Dengue-Oberflächenproteins E (*envelope*). Sie wird durch drei DNA-Fragmente kodiert (ED1.1, ED1.2, ED1.3), die diskontinuierlich vorliegen (vergl. Abb. 3, S. 15). Damit die Domäne als ein zusammenhängendes Protein exprimiert werden kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit die drei kodierenden Sequenzen zusammengesetzt. Dazu wurde zwischen ED1.1 und ED1.2 (*link 1*) sowie zwischen ED1.2 und ED1.3 (*link 2*) eine für Glycin-Prolin-Glycin kodierende Sequenz (*GPG-link*) eingefügt. Eine schematische Darstellung der GPG verknüpften Sequenzen und der beiden *links* innerhalb der Protein-Struktur ist in Abb. 7 (S. 46) gezeigt. Die Abschnitte ED1.2 und ED1.3 (*link 2*) wurden über die Aminosäuren Thr-189 und His-282 verknüpft. Die Aminosäuren, die an *link 1* zwischen ED1.1 und ED1.2 beteiligt sind, wurden gezielt variiert. Auf diese Weise wurden mehrere Konstrukte, jeweils für die Dengue-Serotypen DENV-1 und DENV-3, hergestellt. Damit die Flexibilität des Links nicht negativ beeinflusst wird, wurde die zyklische Aminosäure Prolin in unmittelbarer Nähe des Links gemieden. Des Weiteren wurde bei der Konstruktion der Sequenzen die Anzahl polarer Aminosäuren im Umfeld des *links* variiert. Unter Berücksichtigung der

codon usage für *E. coli* wurden die Aminosäure-Sequenzen in die entsprechenden DNA-Sequenzen übersetzt.

Für den Serotyp DENV-1 wurden fünf neue Konstrukte hergestellt. Zunächst wurde das Konstrukt ED1₁_2.0 aus dem pET20b Plasmid in das pMAL-p4X Plasmid umkloniert (2.2.1, 2.2.2, 2.2.3). Mittels Mutagenese-PCR (2.2.1.3) wurde ein Stoppcodon eingefügt, welches zuvor gefehlt hatte. Ausgehend von diesem Plasmid (ED1₁_2.1) wurden ebenfalls mittels Mutagenese-PCR gezielt Aminosäuren eingefügt (Insertion), ersetzt (Substitution) und entfernt (Deletion). Die entstandenen Sequenzen sind verkürzt in Tab. 2 (S. 51) dargestellt. Die vollständigen Alignments sind in Abb. 8 (S. 47) gezeigt. Die fünf Konstrukte wurden wie folgt benannt:

1. ED1 DENV-1 Konstrukt 2.1 = ED1₁_2.1
2. ED1 DENV-1 Konstrukt 3.0 = ED1₁_3.0
3. ED1 DENV-1 Konstrukt 4.0 = ED1₁_4.0
4. ED1 DENV-1 Konstrukt 5.0 = ED1₁_5.0
5. ED1 DENV-1 Konstrukt 6.0 = ED1₁_6.0

Für den Serotyp DENV-3 wurden drei neue Konstrukte hergestellt. Zunächst wurde mittels *assembly* PCR (2.2.1.1) und Gibson *assembly* (2.2.4) das Konstrukt ED1₃_2.0 erstellt. Ausgehend von diesem Plasmid wurden gezielt zwei aufeinanderfolgende Insertionen mittels Mutagenese-PCR durchgeführt. Die entstandenen Sequenzen sind verkürzt in Tab. 2 (S. 51) dargestellt. Die vollständigen Alignments sind in Abb. 8 (S. 47) abgebildet. Die drei Konstrukte wurden wie folgt benannt:

1. ED1 DENV-3 Konstrukt 2.0 = ED1₃_2.0
2. ED1 DENV-3 Konstrukt 3.0 = ED1₃_3.0
3. ED1 DENV-3 Konstrukt 4.0 = ED1₃_4.0

Alle Konstrukte konnten in der gewünschten Form hergestellt werden, was sich durch die jeweiligen Sequenzierungsergebnisse bestätigen ließ.

A Schema der Domäne 1-Verlinkung mit einem GPG-link



B Am GPG-link beteiligte Aminosäuren in der Proteinstruktur

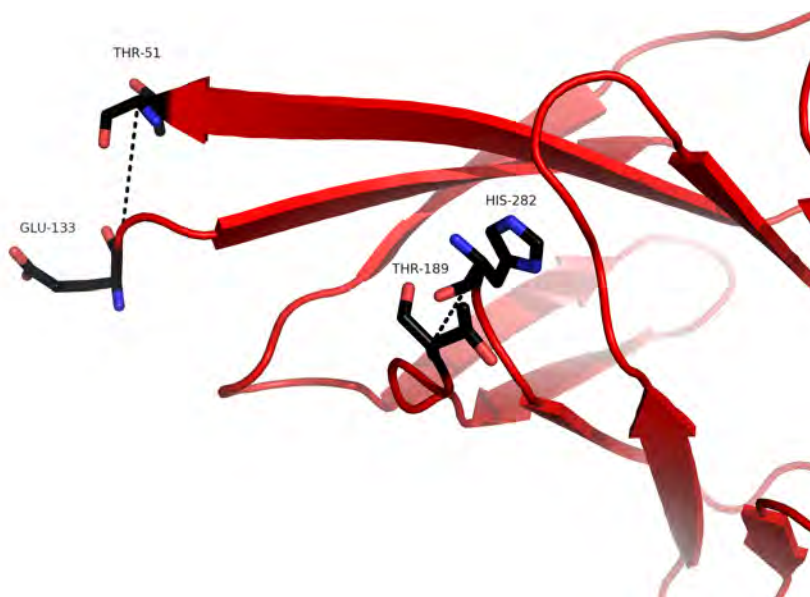


Abb. 7 Domäne 1-Verlinkung als Schema und schematisch in Proteinstruktur.

A Schema der Verlinkung der Domäne 1. Dargestellt sind die drei Genabschnitte der Domäne (1.1, 1.2, 1.3) und der Aminosäure *link* GPG.

B Proteinstruktur der Domäne 1 mit den Aminosäuren, die an dem GPG-link beteiligt sind. Exemplarisch ist das Konstrukt ED1₁ 3.0 gezeigt (Link1 zwischen Thr-51 und Glu-133, Link2 zwischen Thr-189 und His-282). Die Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt und nach Elementen eingefärbt (Sauerstoff; rot, Stickstoff; blau). Die Proteinstruktur (PDB-File: 3G7T) wurde mit der Software Pymol erstellt.

Domäne 1 DENV-1

```

ED11_1.0 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELLKTEVNGPGYENLK 60
ED11_2.1 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELLKTEV-TGPG--NLK 57
ED11_3.0 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELLKTEV-TGPGE-NLK 58
ED11_4.0 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELLKTEVIGPGE-NLK 59
ED11_5.0 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELLKTEV--GPG--NLK 56
ED11_6.0 MRCVGIGNRDFVEGLSGATWVDVVLEHGSCVTTMAKNKPTLDIELLKTEV--GPG---LK 55

ED11_1.0 YSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGPGHCLK 120
ED11_2.1 YSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGPGHCLK 117
ED11_3.0 YSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGPGHCLK 118
ED11_4.0 YSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGPGHCLK 119
ED11_5.0 YSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGPGHCLK 116
ED11_6.0 YSVIVTVHTGDQHQVGNETTEHGTTATITPQAPTSEIQLTDYGALTLDCSPRTGPGHCLK 115

ED11_1.0 RLKMDKLTLLKMSYV 135
ED11_2.1 RLKMDKLTLLKGA--- 129
ED11_3.0 RLKMDKLTLLKGA--- 130
ED11_4.0 RLKMDKLTLLKGA--- 131
ED11_5.0 RLKMDKLTLLKGA--- 128
ED11_6.0 RLKMDKLTLLKGA--- 127

```

Domäne 1 DENV-3

```

ED13_1.0 MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVVLEYGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATQGPGHENLK 60
ED13_2.0 MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVVLEYGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEAT-GPG--NLK 57
ED13_3.0 MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVVLEYGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEAT-GPGE-NLK 58
ED13_4.0 MRCVGVGNRDFVEGLSGATWVDVVLEYGGCVTTMAKNKPTLDIELQKTEATIGPGE-NLK 59

ED13_1.0 YTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAETIPQASTAEAILPEYGTGLGLECSPRTGPGHCLKRL 120
ED13_2.0 YTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAETIPQASTAEAILPEYGTGLGLECSPRTGPGHCLKRL 117
ED13_3.0 YTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAETIPQASTAEAILPEYGTGLGLECSPRTGPGHCLKRL 118
ED13_4.0 YTVIITVHTGDQHQVGNETQGVTAETIPQASTAEAILPEYGTGLGLECSPRTGPGHCLKRL 119

ED13_1.0 KMDKLELKGMSYA-KLGTGRRFTTS 144
ED13_2.0 KMDKLELKGMSY----- 129
ED13_3.0 KMDKLELKGMSYA----- 131
ED13_4.0 KMDKLELKGMSYA----- 132

```

Abb. 8 Alignment der Aminosäuresequenzen der ED1-Konstrukte.

Dargestellt sind die Alignments der kompletten Aminosäuresequenzen der Domäne 1-Fusionsproteine für die Serotypen DENV-1 und DENV-3. Die beiden GPG-links sind hervorgehoben und nicht vorhandene Aminosäuren sind durch einen Strich (-) gekennzeichnet. Die Sequenzen wurden ausgehend von den Sequenzierungsergebnissen der jeweiligen Konstrukte und mit dem ExPASy *translate tool* generiert.

3.1.2 E-Protein Domäne 2-Konstrukte

Die Domäne 2 ist ebenfalls Teil des Dengue-Oberflächenproteins E (*envelope*). Sie wird durch zwei DNA-Fragmente kodiert (ED2.1, ED2.2), die diskontinuierlich vorliegen (vergl. Abb. 3, S. 15). Damit die Domäne als ein zusammenhängendes Protein exprimiert werden kann, wurde die gleiche Strategie, wie für die ED1-Antigene angewendet. Die Aminosäure-Sequenzen, die für die beiden Abschnitte der Domäne 2 kodieren, wurden durch einen GPG *link* (vergl. 3.1) verbunden. Eine schematische Darstellung der GPG verknüpften Sequenzen und des *links* innerhalb der Protein-Struktur sind in Abb. 9 (S. 49) gezeigt. Die am *link* beteiligten Aminosäuren wurden gezielt variiert, sodass mehrere Konstrukte entstanden sind. Anschließend wurden die Aminosäure-Sequenzen, unter Berücksichtigung der *codon usage* für *E. coli*, in die entsprechenden DNA-Sequenzen übersetzt.

Für den Serotyp DENV-1 wurden drei neue Konstrukte hergestellt. Ausgehend von dem Plasmid der Vorarbeit (Konstrukt ED2₁_1.0) wurde mittels Mutagenese-PCR (2.2.1.3) gezielt eine Substitution und zwei aufeinanderfolgende Deletionen durchgeführt. Die entstandenen Sequenzen sind verkürzt in Tab. 3 (S. 52) dargestellt. Die vollständigen Alignments sind in Abb. 10 (S. 50) gezeigt. Die drei Konstrukte wurden wie folgt benannt:

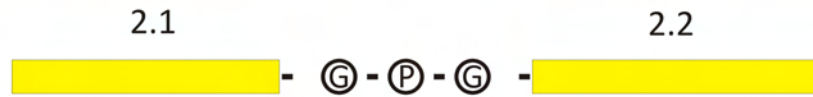
1. ED2 DENV-1 Konstrukt 2.0 = ED2₁_2.0
2. ED2 DENV-1 Konstrukt 3.0 = ED2₁_3.0
3. ED2 DENV-1 Konstrukt 4.0 = ED2₁_4.0

Für den Serotyp DENV-3 wurden zwei neue Konstrukte hergestellt. Ausgehend von dem Plasmid der Vorarbeit (Konstrukt ED2₃_1.0) wurden ebenfalls mittels Mutagenese-PCR (2.2.1.3) zwei gezielte Substitutionen durchgeführt. Die entstandenen Sequenzen sind verkürzt in Tab. 3 (S. 52) dargestellt. Die vollständigen Alignments sind in Abb. 10 (S. 50) abgebildet. Die zwei Konstrukte wurden wie folgt benannt:

1. ED2 DENV-3 Konstrukt 2.0 = ED2₃_2.0
2. ED2 DENV-3 Konstrukt 3.0 = ED2₃_3.0

Alle Konstrukte konnten in der gewünschten Form erstellt und durch die jeweiligen Sequenzierungsergebnisse bestätigt werden.

A Schema der Domäne 2-Verlinkung mit einem GPG-*link*



B Am GPG-*link* beteiligte Aminosäuren in der Proteinstruktur

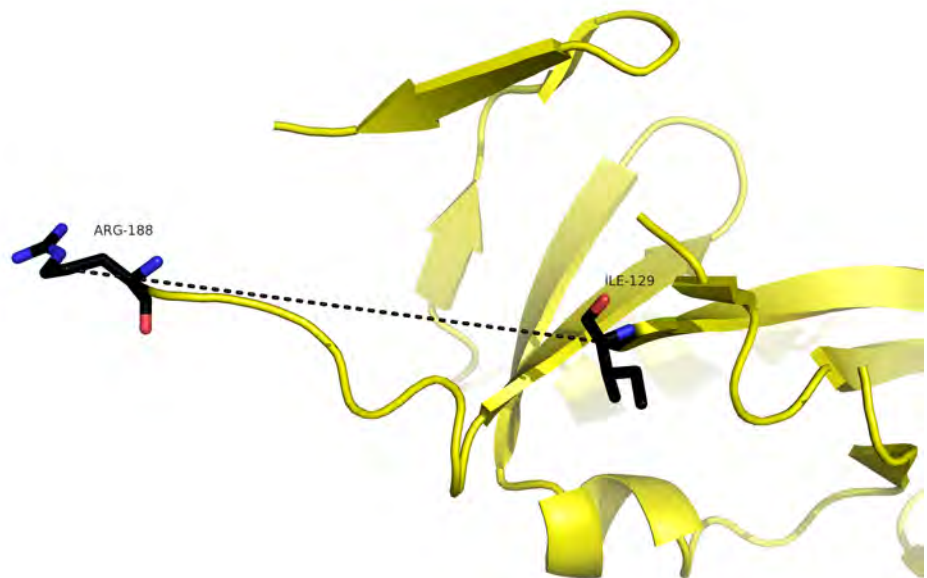


Abb. 9 Domäne 2-Verlinkung als Schema und schematisch in Proteinstruktur.
A Schema der Verlinkung der Domäne 2. Dargestellt sind die zwei Genabschnitte der Domäne (2.1, 2.2) und der Aminosäure *link* GPG.
B Proteinstruktur der Domäne 2 mit den Aminosäuren, die an dem GPG-*link* beteiligt sind. Exemplarisch ist das Konstrukt ED2₁ 2.0 gezeigt (Link1 zwischen Ile-129 und Arg-188). Die Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt und nach Elementen eingefärbt (Sauerstoff; rot, Stickstoff; blau). Die Proteinstruktur (PDB-File: 3G7T) wurde mit der Software Pymol erstellt.

Domäne 2 DENV-1

```
ED21_1.0   PAVLRKLCIEAKISNTTDSRCPTQGEATLVVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS 60
ED21_2.0   PAVLRKLCIEAKISNTTDSRCPTQGEATLVVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS 60
ED21_3.0   PAVLRKLCIEAKISNTTDSRCPTQGEATLVVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS 60
ED21_4.0   PAVLRKLCIEAKISNTTDSRCPTQGEATLVVEEQDTNFVCRRTFVDRGWGNGCGLFGKGS 60

ED21_1.0   LITCAKFKCVTKLEGKIVGPGRTGLDFNEMVLLTMEKKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGAS 120
ED21_2.0   LITCAKFKCVTKLEGK--IGPGRTGLDFNEMVLLTMEKKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGAS 118
ED21_3.0   LITCAKFKCVTKLEGKIVGPGRTGLDFNEMVLLTMEKKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGAS 120
ED21_4.0   LITCAKFKCVTKLEGK--IGPG-----NEMVLLTMEKKSWLVHKQWFLDLPLPWTSGAS 112

ED21_1.0   TSQETWNRQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFA 175
ED21_2.0   TSQETWNRQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFA 173
ED21_3.0   TSQETWNRQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFA 175
ED21_4.0   TSQETWNRQDLLVTFKTAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGTTTIFA 167
```

Domäne 2 DENV-3

```
ED23_1.0   LATLRKLCIEGKITNITDSDRCPTQGEAILPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS 60
ED23_2.0   LATLRKLCIEGKITNITDSDRCPTQGEAILPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS 60
ED23_3.0   LATLRKLCIEGKITNITDSDRCPTQGEAILPEEQDQNYVCKHTYVDRGWGNGCGLFGKGS 60

ED23_1.0   LVTCAKFQCLESIEGKVVGPGRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGAT 120
ED23_2.0   LVTCAKFQCLESIEGKVVIGPGRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGAT 120
ED23_3.0   LVTCAKFQCLESIEGKVVGPGRTGLDFNEMILLTMKNKAWMVHRQWFFDLPLPWTSGAT 120

ED23_1.0   TETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGGTSIFA 175
ED23_2.0   TETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGGTSIFA 175
ED23_3.0   TETPTWNRKELLVTFKNAHAKKQEVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQTSGGTSIFA 175
```

Abb. 10 Alignment der Aminosäuresequenzen der ED2-Konstrukte

Dargestellt sind die Alignments der kompletten Aminosäuresequenzen der Domäne 2-Fusionsproteine für die Serotypen DENV-1 und DENV-3. Der *GPG-link* ist hervorgehoben und nicht vorhandene sind Aminosäuren durch einen Strich (-) gekennzeichnet. Die Sequenzen wurden ausgehend von den Sequenzierungsergebnissen der jeweiligen Konstrukte und mit dem ExPASy *translate tool* generiert.

Tab. 2 Übersicht der verknüpften Aminosäuren der Domäne 1-Konstrukte.

Grau: Konstrukte der Vorarbeit, schwarz: Konstrukte dieser Arbeit

DENV-1			
Konstrukt	<i>link 1</i>	<i>link 2</i>	Plasmid
ED1 ₁ _1.0	TEVTNG <u>GPG</u> YENLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₁ _2.0	TEVT <u>GPG</u> NLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pET20b
ED1 ₁ _2.0	TEVT <u>GPG</u> NLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₁ _2.1	TEVT <u>GPG</u> NLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₁ _3.0	TEVT <u>GPG</u> ENLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₁ _4.0	TEVI <u>GPG</u> ENLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₁ _5.0	TEV <u>GPG</u> NLKYSVIV	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₁ _6.0	TEV <u>GPG</u> LKYSVIV	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
DENV-3			
Konstrukt	<i>link 1</i>	<i>link 2</i>	Plasmid
ED1 ₃ _1.0	TEATQ <u>GPG</u> HENLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₃ _2.0	TEAT <u>GPG</u> NLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₃ _3.0	TEAT <u>GPG</u> ENLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X
ED1 ₃ _4.0	TEATI <u>GPG</u> ENLKY	CSPRT <u>GPG</u> HCLKCR	pMAL-p4X

Tab. 3 Übersicht der verknüpften Aminosäuren der Domäne 2-Konstrukte.

Grau: Konstrukte der Vorarbeit, schwarz: Konstrukte dieser Arbeit

DENV-1		
Konstrukt	<i>link 1</i>	Plasmid
ED2 ₁ _1.0	GKIVQ <u>GPG</u> RTGLD	pMAL-p4X
ED2 ₁ _2.0	GKI <u>GPG</u> RTGLD	pMAL-p4X
ED2 ₁ _3.0	GKIVM <u>GPG</u> RTGLD	pMAL-p4X
ED2 ₁ _4.0	GKI <u>GPG</u> NEMVL	pMAL-p4X
DENV-2		
Konstrukt	<i>link 1</i>	Plasmid
ED2 ₃ _1.0	GKVVQ <u>GPG</u> RTGLD	pMAL-p4X
ED2 ₃ _2.0	GKVVI <u>GPG</u> RTGLD	pMAL-p4X
ED2 ₃ _3.0	GKVVM <u>GPG</u> RTGLD	pMAL-p4X

3.2 Herstellung rekombinanter Dengue-Antigene

3.2.1 Expression und Aufreinigung in *E. coli*

Nach der Transformation (2.2.5) der hergestellten Plasmide in die *E. coli*-Stämme DH5 α und BL21(DE3) wurde die Expression (2.3.3), der Zellaufschluss (2.3.4) und die Aufreinigung (2.4.1) der rekombinanten Proteine durchgeführt.

3.2.1.1 E-Protein Domäne 1-Konstrukte

Für die Analyse der ED1-Konstrukte wurde eine SDS-PAGE (2.4.3) durchgeführt. Anschließend wurden die Gele nach Protokoll von Fairbanks gefärbt (Fairbanks *et al.*, 1971). In Abb. 11 (S. 54) sind SDS-Gele von zwei ED1-Konstrukten des Dengue-Serotypen DENV-1 und in Abb. 12 (S. 55) sind SDS-Gele von zwei ED1-Konstrukten des Serotypen DENV-3 gezeigt. Zum Vergleich sind jeweils die Gele der Expression in *E. coli* BL21(DE3) und DH5 α gezeigt. Die Pfeile markieren die Banden des MBP-Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht von 59 kDa und die MBP-Bande mit einem Molekulargewicht von 43,4 kDa. Die ersten zwei Spalten der Gele zeigen, dass nach der Induktion eine starke Bande zu erkennen ist, die vor der Induktion nicht zu sehen ist und somit in allen Fällen eine Überexpression stattfindet. Die Intensität der MBP-Bande bleibt durch die Induktion nahezu unverändert. Die Banden der Pellet-Fraktion sind unlöslichen und in der Membran verankerten Proteinen zuzuordnen. Im Gegensatz dazu befinden sich in der Lysat-Fraktion alle löslichen Bestandteile, die durch den Zellaufschluss freigesetzt wurden. Diese Proteine wurden anschließend auf die Chromatographiesäule gegeben. Ein sehr geringer Anteil des Fusionsproteins ist in fast allen Fällen auch im Pellet zu finden. Der Hauptanteil an Fusionsprotein wird jedoch auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Für die Chromatografie der neuen Konstrukte wurden *Mini-Spin* Säulen mit einem Volumen von 1 ml benutzt. Aufgrund der geringen Säulenkapazität befindet sich in allen Fällen ein Teil des Fusionsproteins im Durchfluss und auch in den zwei Waschfraktionen. Alle Konstrukte wurden unter den gleichen Bedingungen exprimiert und aufgereinigt. Die Antigen-Konstrukte, die nicht dargestellt sind, zeigen die gleichen Ergebnisse und sind in diesem Kapitel daher nicht aufgeführt.

DENV-1 Domäne 1

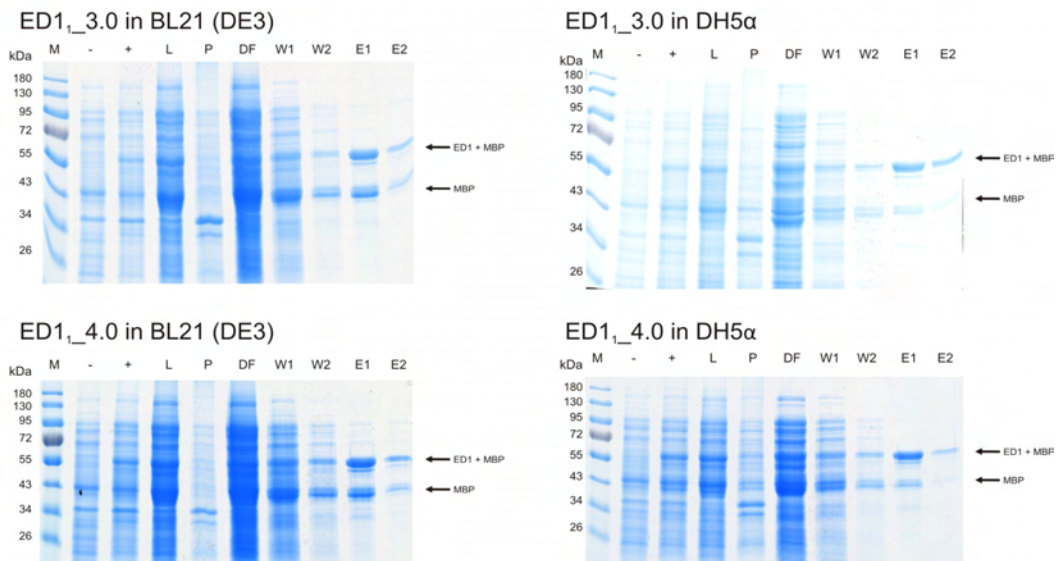


Abb. 11 Expressionsvergleich DENV-1 ED1-Proteine in BL21(DE3) und DH5 α .

10 %ige SDS-PAGE der Expression, des Zellaufschlusses und der Aufreinigung der ED1-MBP-Fusionsproteine. Je zwei Konstrukte des Serotypen DENV-1 sind exemplarisch gezeigt: M Proteinstandard; - vor Induktion mit IPTG; + nach Induktion mit IPTG; L Lysat d. Zellaufschlusses; P Pellet d. Zellaufschlusses; DF Durchfluss d. Aufreinigung; W1-W2 Waschfraktion; E1-E2 Elutionsfraktionen. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (59 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Coomassie-Färbung wurde nach dem Protokoll von Fairbanks durchgeführt.

DENV-3 Domäne 1

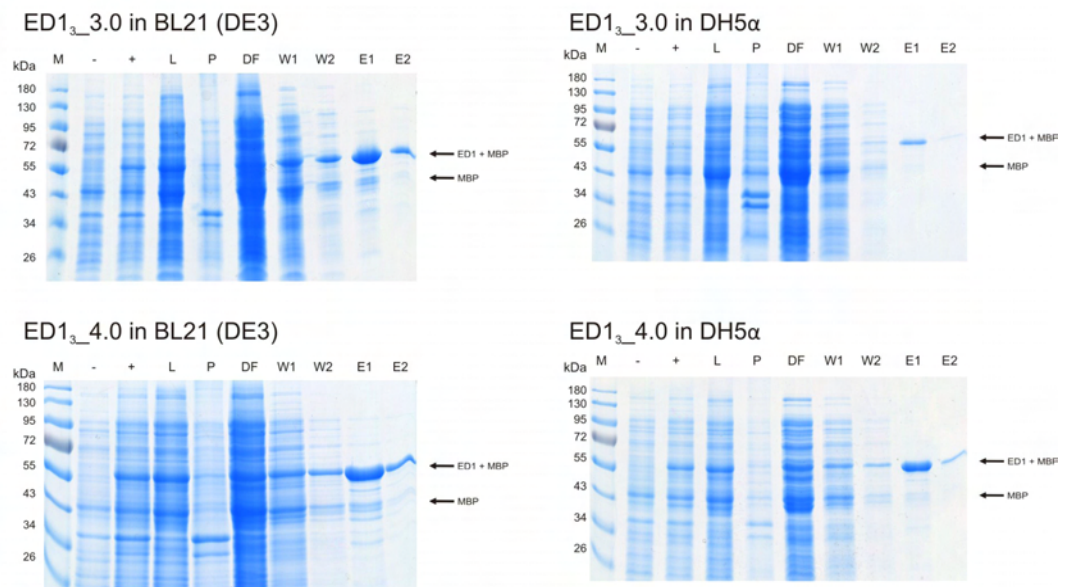


Abb. 12 Expressionsvergleich DENV-3 ED1-Proteine in BL21(DE3) und DH5α.

10 %ige SDS-PAGE der Expression, des Zellaufschlusses und der Aufreinigung der ED1-MBP-Fusionsproteine. Je zwei Konstrukte des Serotypen DENV-3 sind exemplarisch gezeigt: M Proteinstandard; - vor Induktion mit IPTG; + nach Induktion mit IPTG; L Lysat d. Zellaufschlusses; P Pellet d. Zellaufschlusses; DF Durchfluss d. Aufreinigung; W1-W2 Waschfraktion; E1-E2 Elutionsfraktionen. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (59 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Coomassie-Färbung wurde nach dem Protokoll von Fairbanks durchgeführt.

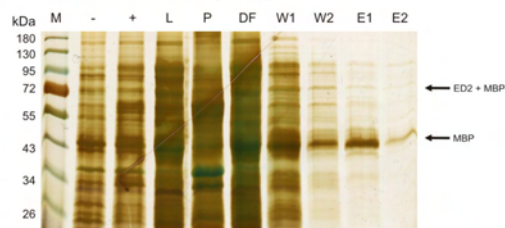
Alle Elutionsfraktionen enthalten neben dem Fusionsprotein auch MBP ohne Fusionsanteil. In allen Fällen wurde eine geringere MBP-Menge festgestellt, wenn die Expression in DH5 α anstatt in BL21(DE3) erfolgte (vergl. Abb.11, S. 49). Es zeigte sich allerdings, dass alle Antigen-Konstrukte in beiden *E. coli*-Stämmen exprimiert werden können. Die Mengenunterschiede des Fusionsproteins, in Abhängigkeit von den Konstrukten, werden im Kapitel 0 dargestellt.

3.2.1.2 E-Protein Domäne 2-Konstrukte

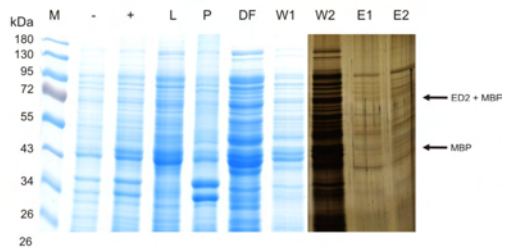
Für die Analyse der ED2-Konstrukte wurde eine SDS-PAGE (2.4.3) durchgeführt. Nach der Coomassie-Färbung nach Fairbanks et al. wurde eine Silberfärbung nach Merril et al. ausgeführt, die als sensitivere Methode auch die Detektion geringer Mengen an Fusionsprotein ermöglicht. In Abb. 13 (S. 57) sind SDS-Gele von zwei ED2-Konstrukten des Dengue-Serotypen DENV-1 und in Abb. 14 (S. 58) sind SDS-Gele von zwei ED2-Konstrukte des Serotypen DENV-3 dargestellt. Zum Vergleich sind jeweils die Gele der Expression in *E. coli* BL21(DE3) und DH5 α gezeigt. Die Pfeile markieren jeweils die Banden des MBP-Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht von 64 kDa und die MBP-Bande mit einem Molekulargewicht von 43,4 kDa. Die Expression der ED2-Konstrukte ist im Vergleich zu den ED1-Konstrukten (vergl. 3.2.1.1) sehr schwach. Eine geringe Überexpression ist nach der Induktion mit IPTG erkennbar. Allerdings sind viele Degradationsbanden anstelle einer klaren Proteinbande zu sehen. Die Intensität der MBP-Banden wird durch die Induktion nicht beeinflusst. Es ist erkennbar, dass der Hauptanteil des Fusionsproteins degradiert oder als unlösliches Protein im Pellet abgetrennt wird. Nur ein geringer Anteil des Fusionsproteins liegt in gelöster Form vor und kann auf die Chromatografiesäule aufgetragen werden. Die Konstrukte, die in Abb. 13 und Abb. 14 nicht dargestellt sind, zeigen die gleichen Ergebnisse und sind in diesem Kapitel daher nicht aufgeführt. Trotz Silberfärbung ist in allen Fällen das Fusionsprotein in den Elutionsfraktionen nicht erkennbar. Die Detektion wurde erst durch eine Aufkonzentrierung der Proben ermöglicht (vergl. 3.2.3). Es zeigt sich, dass die Expression der E-Protein Domäne 2 unabhängig von den Konstrukten und in beiden *E. coli*-Stämmen gleichermaßen schwach verläuft. Der Großteil des Fusionsproteins degradiert und fällt als unlösliches Protein aus. Die Menge exprimierter Fusionsproteine, in Abhängigkeit von den Konstrukten, wird im Kapitel 3.2.3 aufgeführt.

DENV-1 Domäne 2

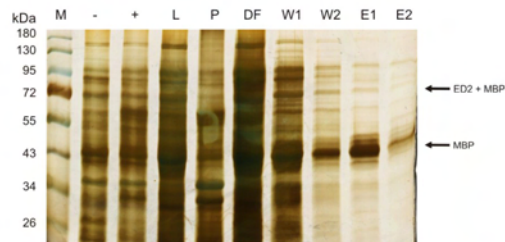
ED2_{1_3.0} in BL21 (DE3)



ED2_{1_3.0} in DH5 α



ED2_{1_4.0} in BL21 (DE3)



ED2_{1_4.0} in DH5 α

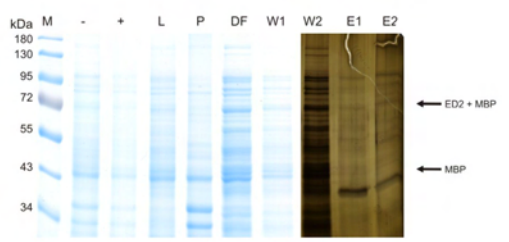


Abb. 13 Expressionsvergleich DENV-1 ED2-Proteine in BL21(DE3) und DH5 α .

10 %ige SDS-PAGE der Expression, des Zellaufschlusses und der Aufreinigung der ED2-MBP-Fusionsproteine. Je zwei Konstrukte des Serotypen DENV-1 sind exemplarisch gezeigt: M Proteinstandard; - vor Induktion mit IPTG; + nach Induktion mit IPTG; L Lysat d. Zellaufschlusses; P Pellet d. Zellaufschlusses; DF Durchfluss d. Aufreinigung; W1-W2 Waschfraktion; E1-E2 Elutionsfraktionen. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (64 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Färbung erfolgte nach Fairbanks und Merrill. Die Bilder beider Färbungen wurden teilweise zusammengesetzt, sodass alle Banden erkennbar sind.

DENV-3 Domäne 2

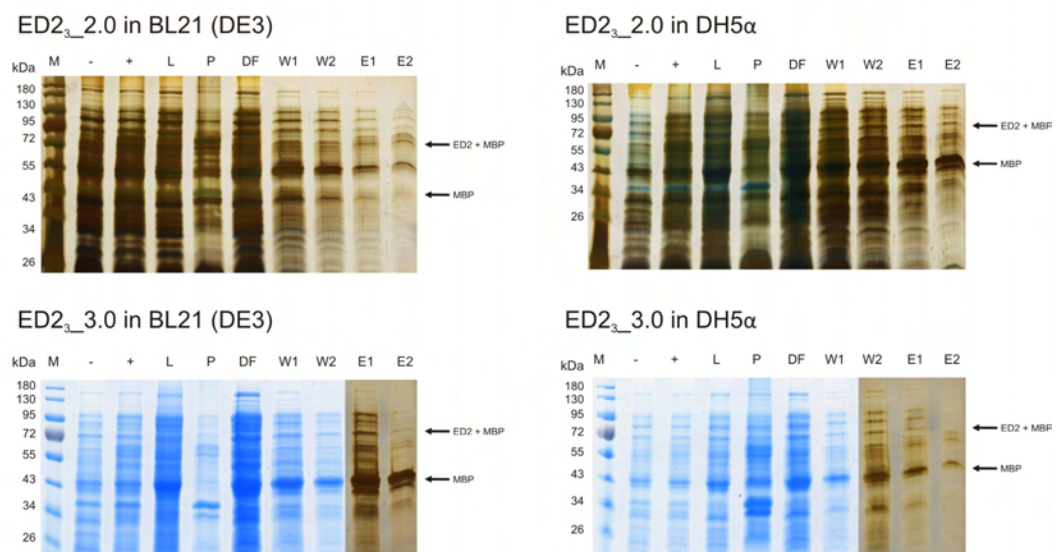


Abb. 14 Expressionsvergleich DENV-3 ED2-Proteine in BL21(DE3) und DH5α.

10 %ige SDS-PAGE der Expression, des Zellaufschlusses und der Aufreinigung der ED2-MBP-Fusionsproteine. Die zwei erstellten Konstrukte des Serotypen DENV-3 sind gezeigt: M Proteinstandard; - vor Induktion mit IPTG; + nach Induktion mit IPTG; L Lysat d. Zellaufschlusses; P Pellet d. Zellaufschlusses; DF Durchfluss d. Aufreinigung; W1-W2 Waschfraktion; E1-E2 Elutionsfraktionen. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (64 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Färbung erfolgte nach Fairbanks und Merrill. Die Bilder beider Färbungen wurden teilweise zusammengesetzt, sodass alle Banden erkennbar sind.

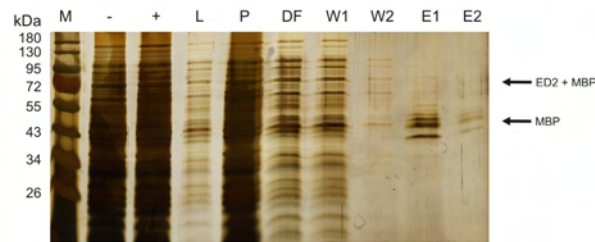
3.2.2 Periplasmatischer Zellaufschluss ED2- Konstrukte

Das pMAL-p4X-Plasmid bewirkt eine vorrangig periplasmatische Überexpression. Das Fusionsprotein wird demnach im periplasmatischen Raum der *E. coli*-Bakterien, einem Zellkompartiment zwischen Cytoplasmamembran und äußerer Membran, angereichert. Wird ein Export des Proteins durch die cytoplasmatische Membran initiiert, so durchläuft das Protein einen andern Faltungsprozess als im Periplasma. Bei einigen Proteinen führt dies zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur, was sich auf die Löslichkeit und die Stabilität des Proteins auswirkt. Das MBP ist davon nicht betroffen und wird sowohl im Periplasma, als auch im Cytoplasma nativ gefaltet (NewEnglandBiolabs, 2015). Einige Fusionsproteine erhalten auf diesem Weg jedoch nicht die korrekte Tertiärstruktur und können die Membran nicht passieren. Dies führt zu einer Degradation des Proteins. Besonders Proteine mit mehreren Disulfidbrücken können nur im Periplasma korrekt gefaltet werden, da dort die entsprechenden Enzyme präsent sind, welche die Bindung der Cysteine katalysieren. Wird ein solches Protein im Cytoplasma gefaltet, ist die Wahrscheinlichkeit gegeben, dass es nicht richtig gefaltet und dadurch degradiert oder unlöslich wird.

Um auszuschließen, dass die ED2-Konstrukte von diesem Prozess betroffen sind, wurde zusätzlich zu dem zuvor durchgeführten cytoplasmatischen Zellaufschluss (2.3.4) ein periplasmatischer Zellaufschluss (2.3.5) mit vier Konstrukten durchgeführt. Die Bedingungen der Expression (2.3.3) und der Aufreinigung (2.4.1) wurden nicht verändert. Für die Analyse wurde eine SDS-PAGE (2.4.3) durchgeführt. Der Coomassie-Färbung nach Fairbanks schloss sich eine Silberfärbung nach Merril an (Merril *et al.*, 1981). In Abb. 15 (S. 60) sind zwei SDS-Gele der ED2-Konstrukte des Dengue-Serotypen DENV-1 und in Abb. 16 (S. 61) sind zwei SDS-Gele der ED2-Konstrukte des Serotypen DENV-3 gezeigt. Die Pfeile markieren jeweils die Banden des MBP-Fusionsproteins mit einem Molekulargewicht von 64 kDa und die MBP-Bande mit einem Molekulargewicht von 43,4 kDa. Die Proben wurden in der gleichen Anordnung, wie die ED1-Konstrukte (3.2.1.1), aufgetragen. Die Expression wurde unter denselben Bedingungen, wie zuvor in Abschnitt 3.2.1, durchgeführt. Die Banden nach der Induktion weisen auch hier viele Degradationsbanden bei 64 kDa auf.

DENV-1 Domäne 2

ED2_{1_3.0} in BL21 (DE3)



ED2_{1_4.0} in BL21 (DE3)

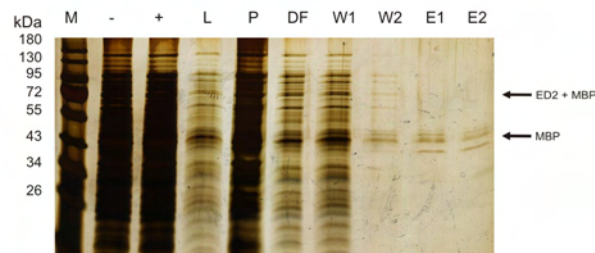
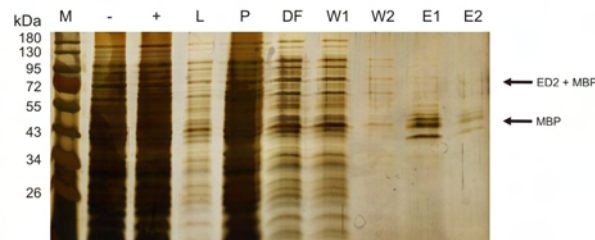


Abb. 15 Periplasmatischer Zellaufschluss der DENV-1 ED2-Proteine.

10 %ige SDS-PAGE der Expression, des Zellaufschlusses und der Aufreinigung der ED2-MBP-Fusionsproteine. Je zwei Konstrukte der Serotypen DENV-1 und DENV-3 sind exemplarisch gezeigt: **M** Proteinstandard; - vor Induktion mit IPTG; + nach Induktion mit IPTG; **L** Osmotisches Schock-Fluid; **P** Pellet d. Zellaufschlusses; **DF** Durchfluss d. Aufreinigung; **W1-W2** Waschfraktion; **E1-E2** Elutionsfraktionen. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (64 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Färbung erfolgte nach Fairbanks und Merrill. Die Bilder beider Färbungen wurden teilweise zusammengesetzt, sodass alle Banden erkennbar sind.

DENV-1 Domäne 2

ED2_{1_3.0} in BL21 (DE3)



ED2_{1_4.0} in BL21 (DE3)

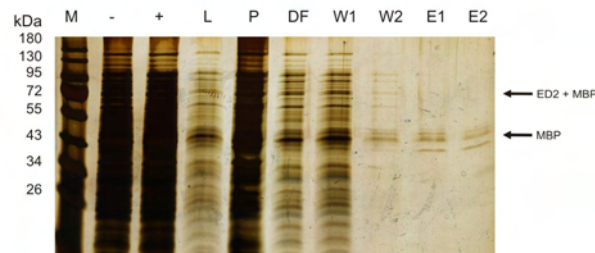


Abb. 16 Periplasmatischer Zellaufschluss der DENV-3 ED2-Proteine.

10 %ige SDS-PAGE der Expression, des Zellaufschlusses und der Aufreinigung der ED2-MBP-Fusionsproteine. Je zwei Konstrukte der Serotypen DENV-1 und DENV-3 sind exemplarisch gezeigt: M Proteinstandard; - vor Induktion mit IPTG; + nach Induktion mit IPTG; L Osmotisches Schock-Fluid; P Pellet d. Zellaufschlusses; DF Durchfluss d. Aufreinigung; W1-W2 Waschfraktion; E1-E2 Elutionsfraktionen. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (64 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Färbung erfolgte nach Fairbanks und Merrill. Die Bilder beider Färbungen wurden teilweise zusammengesetzt, sodass alle Banden erkennbar sind.

Die Menge an MBP wird durch die Induktion nicht beeinflusst. Die Banden der Pellet-Fraktion stellen alle Proteine des Cytoplasmas sowie in der Membran verankerte und unlösliche Proteine dar. Im Gegensatz dazu befinden sich in der Fraktion des osmotischen Schock-Fluids alle löslichen Bestandteile des periplasmatischen Raums, die durch den Zellaufschluss freigesetzt wurden. Diese Proteine wurden anschließend auf die Chromatographiesäule gegeben. Der Hauptanteil der degradierten Proteine befindet sich nach dem Zellaufschluss im Zellpellet. In den meisten Fällen (vergl. S. 60, S. 61) befindet sich in der Fraktion des osmotischen Schock-Fluids eine einzige Bande bei 64 kDa, die dem Fusionsprotein entspricht. Die Konzentration ist jedoch sehr gering und das Protein wird nur durch die sensitive Silberfärbung sichtbar gemacht. Der Hauptanteil der *E. coli*-Proteine befindet sich im Zellpellet, wodurch der Anteil an Gesamtprotein im Periplasma sehr gering ausfällt. In allen Fällen weisen die Elutionsfraktionen trotz Silberfärbung kein Fusionsprotein auf. Die Detektion wurde erst durch eine Aufkonzentrierung der Proben ermöglicht (vergl. 3.2.3).

Durch den periplasmatischen Aufschluss der ED2-Konstrukte zeigte sich, dass sich der Hauptanteil der degradierten Proteine im Cytoplasma befindet. Der Proteinanteil im osmotischen Schock-Fluid ist gering, jedoch scheint nur richtig gefaltetes Fusionsprotein vorzuliegen. Die Mengenunterschiede des exprimierten Fusionsproteins, in Abhängigkeit von den Konstrukten, werden im Kapitel 0 beschrieben.

3.2.3 Aufkonzentrierte Antigene im Vergleich

Für die Beurteilung der Fusionsproteinmenge, die pro Konstrukt und in Abhängigkeit vom *E. coli*-Stamm hergestellt und eluiert werden konnte, wurden jeweils die Elutionsfraktionen E1 und E2 vereint und auf ein Endvolumen von 200 µl konzentriert (2.4.2). Anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (vergl. Tab. 1, S. 42).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der SDS-PAGE der E-Protein Domäne 1-Konstrukte des Serotypen DENV-1 beschrieben (vergl. Abb. 17 A, S. 65). Das Proteingel zeigt, dass die Menge an Fusionsprotein der Konstrukte 2.1 bis 6.0 vergleichbar hoch ist. Dabei zeigt sich, dass der Expressionsstamm keinen Einfluss auf die Menge an Fusionsprotein hat. Allerdings ist die Menge an MBP geringer, wenn die Expression im Stamm DH5α durchgeführt wird. Ebenso ist erkennbar, dass die Menge an Fusionsprotein des

Konstrukts 1.0 im Vergleich mit den übrigen Konstrukten um ca. 1/5 geringer ist. Um die Konzentrationen der Fusionsproteine abschätzen zu können, wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung (2.4.4) durchgeführt. Da bei dieser Methode die Gesamtproteinmenge bestimmt wird, wurde ein Konstrukt gewählt, bei dem die Mengen an MBP und Fusionsprotein im Verhältnis von ca. 1:1 vorliegen, sodass die Gesamtproteinmenge durch zwei geteilt werden kann, um die ungefähre Menge an Fusionsprotein zu ermitteln. Die Probe des Konstrukts ED1₁-5.0, exprimiert in BL21(DE3), erfüllt diese Voraussetzung und enthält zudem einen geringen Anteil anderer Proteine und wurde daher für die Messung ausgewählt. Die Ergebnis ist in Tab. 4 (S. 64) dargestellt. Das Fusionsprotein liegt mit einer Konzentration von 1,8 mg/ml im Volumen von 200 µl vor. Dieser Wert wurde auch für die übrigen Konstrukte angenommen. Eine Ausnahme bildet das Konstrukt 1.0. Dort wurde anhand der Bandenintensität in der SDS PAGE geschätzt, dass 1/5 der gemessenen Konzentration vorliegt. Die Konstrukte 1.0 und 2.1 wurden in 300 ml exprimiert und die übrigen Konstrukte in 25 ml. Die ermittelte Konzentration wurde auf das Expressionsvolumen bezogen, damit die Werte vergleichbar sind. Die Ergebnisse dafür sind in Tab. 5 (S. 64) dargestellt. Es stellt sich heraus, dass Konstrukt 1.0 mit einer Konzentration von 0,24 µg/ml exprimiert wurde, Konstrukt 2.1 mit einer Konzentration von 1,2 µg/ml und die Konstrukte 3.0 bis 6.0 mit einer Konzentration von 14,4 µg/ml. Es zeigt sich, dass die Konstrukte 3.0 bis 6.0 viel ertragreicher sind, als die Konstrukte 1.0 und 2.1.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der SDS-PAGE der E-Protein Domäne 1-Konstrukte des Serotypen DENV-3 beschrieben (vergl. Abb. 17 B, S. 65). Das Proteingel zeigt, dass die verschiedenen Antigen-Konstrukte in unterschiedlichen Mengen exprimiert wurden. Die Konstrukte 2.0 bis 4.0, die in BL21(DE3) exprimiert wurden, führen im Vergleich zu den DENV-1-Konstrukten zu großen Mengen an Fusionsprotein. Die Expression derselben Konstrukte im DH5α-Stamm resultiert in vergleichsweise geringeren Mengen. Das Konstrukt 1.0 führt zur Expression von sehr wenig Fusionsprotein und vergleichsweise viel MBP. Um die Konzentrationen der Fusionsproteine abschätzen zu können, wurde eine Konzentrationsbestimmung (2.4.4) durchgeführt. Es wurde das Konstrukt 3.0 (D) gewählt, da es neben dem Fusionsprotein kein MBP und kaum andere Proteine enthält. Das Ergebnis ist in Tab. 4 (S. 64) dargestellt. Das Fusionsprotein liegt mit einer Konzentration von 1,05 mg/ml im Volumen von 200 µl vor. Dieser Wert wurde genutzt, um die Konzentrationen der übrigen Proben abzuschätzen. Die Berechnung und die Ergebnisse sind in Tab. 5 (S. 64) gezeigt.

Tab. 4 Konzentrationsbestimmung der Domäne 1 Fusionsproteine.

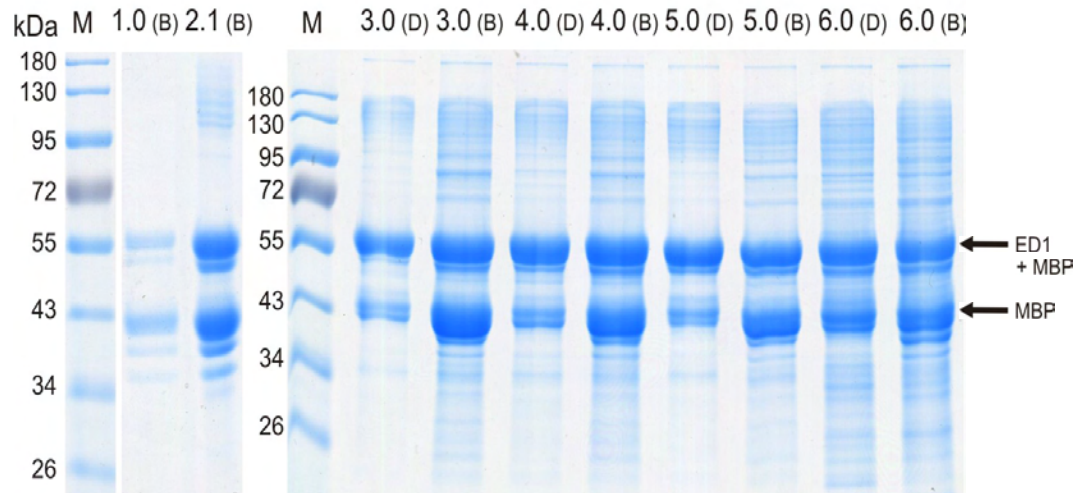
	Domäne 1 DENV-1 Konstrukt 5.0 (B)	Domäne 1 DENV-3 Konstrukt 3.0 (D)
Messwert	3,567 mg/ml	1,046 mg/ml
geschätzter Anteil Fusionsprotein	50 %	100 %
geschätzter Anteil MBP	50 %	0 %
Konzentration Fusionsprotein	1,784 mg/ml	1,046 mg/ml

Tab. 5 Konzentration der Fusionsproteine bezogen auf das Expressionsvolumen.

DENV-1 Konstrukt	1.0	2.1	3.0	4.0	5.0	6.0
$m_{\text{Fusionsprotein}}$ [mg] im Konzentrat	0,072	0,36	0,36	0,36	0,36	0,36
$V_{\text{Expression}}$ [ml]	300	300	25	25	25	25
$c_{\text{Fusionsprotein}}$ [$\mu\text{g/ml}$] in $V_{\text{Expression}}$	0,24	1,2	14,4	14,4	14,4	14,4

DENV-3 Konstrukt	1.0 (B)	2.0 (B)	3.0 (D)	3.0 (B)	4.0 (D)	4.0 (B)
$m_{\text{Fusionsprotein}}$ [mg] im Konzentrat	0,105	0,63	0,21	0,63	0,42	0,63
$V_{\text{Expression}}$ [ml]	300	25	25	25	25	25
$c_{\text{Fusionsprotein}}$ [$\mu\text{g/ml}$] in $V_{\text{Expression}}$	0,35	25,2	8,4	25,2	16,8	25,2

A DENV-1 Domäne 1-Konstrukte



B DENV-3 Domäne 1-Konstrukte

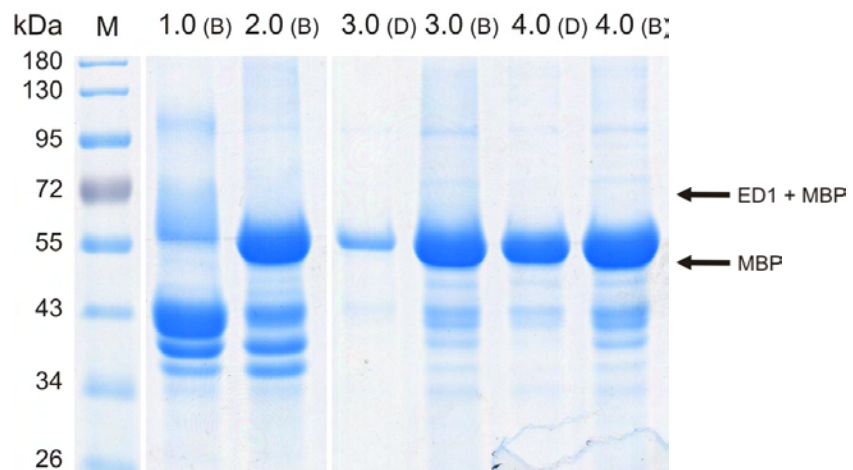


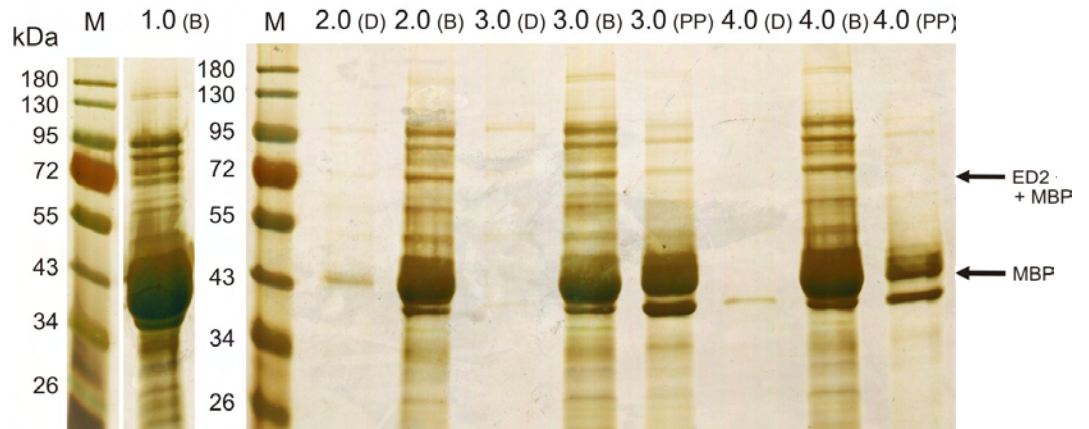
Abb. 17 Aufkonzentrierte Elutionsfraktion aller ED1-Konstrukte im Vergleich. 10 %ige SDS-PAGE. Dargestellt sind die vereinten und aufkonzentrierten Elutionsfraktionen (E1 & E2) aller Konstrukte der Serotypen DENV-1 und DENV-3: (B) Expression in *E. coli* BL21(DE3); (D) Expression in *E. coli* DH5 α . Die Fusionsproteine liegen alle im gleichen Endvolumen vor. Die Expression aller Konstrukte erfolgte in 25 ml dYT-Medium mit Ausnahme der DENV-1-Konstrukte 1.0 und 2.1 sowie des DENV-3-Konstrukts 1.0, welche in 300 ml exprimiert wurden. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (59 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Färbung der ED1-Konstrukte erfolgte nach Protokoll von Fairbanks.

Es ergeben sich Konzentrationen von 0,525 - 3,15 mg/ml. Da das Konstrukt 1.0 in 300 ml dTY-Medium und die übrigen Konstrukte in 25 ml exprimiert wurden, muss die Konzentration mit Bezug auf das Expressionsvolumen umgerechnet werden, damit die Ergebnisse vergleichbar sind (vergl. Tab. 3, S. 52). Es stellt sich heraus, dass Konstrukt 1.0 mit einer Konzentration von 0,35 µg/ml hergestellt wurde. Die Konstrukte 2.0 bis 4.0 wurden mit einer Konzentration von 25,2 µg/ml in BL21(DE3) exprimiert. Konstrukt 3.0 wurde mit einer Konzentration von 8,4 µg/ml, und Konstrukt 4.0 mit einer Konzentration von 16,8 µg/ml in DH5α produziert. Es zeigt sich, dass die Konstrukte 2.0 bis 4.0 mit höherer Ausbeute exprimiert werden konnten, als das Konstrukt 1.0. Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Expression in BL21(DE3) zu höheren Ausbeuten führt als eine Expression in DH5α.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der SDS-PAGE der E-Protein Domäne 2-Konstrukte des Serotypen DENV-1 beschrieben (vergl. Abb. 18 A, S. 67). Für die Detektion der Proteine wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Das Proteingel zeigt, dass die Menge an Fusionsprotein in den Konstrukten 2.0 bis 4.0 gleich groß ist, wenn diese in BL21(DE3) exprimiert werden. Eine Expression derselben Konstrukte in *E. coli* DH5α führt zu einer vergleichsweise geringeren Ausbeute. Im SDS-Gel dieser Konstrukte ist keine sichtbare Proteinbande erkennbar, die dem Fusionsprotein entspricht. Die Konstrukte 3.0 und 4.0, die in BL21(DE3) exprimiert und periplasmatisch aufgeschlossen wurden, enthalten ebenfalls das Fusionsprotein. Jedoch ist die Konzentration in diesen Proben geringer als bei den cytoplasmatisch aufgeschlossen Proben. Das Konstrukt 1.0 weist Degradationsbanden auf.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE der E-Protein Domäne 2-Konstrukte des Serotypen DENV-3 sind in Abb. 18 B (S. 67) dargestellt und im Folgenden beschrieben. Das Proteingel zeigt, dass die Menge an Fusionsprotein in den Konstrukten 2.0 und 3.0 annähernd gleich groß ist, unabhängig davon, ob diese in *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) exprimiert wurden. Die Konstrukte 2.0 und 3.0, die in BL21(DE3) exprimiert und periplasmatisch aufgeschlossen wurden, enthalten das Fusionsprotein, jedoch ist die Konzentration in diesen Proben geringer als bei den cytoplasmatisch aufgeschlossen Proben. Das Konstrukt 1.0 weist zusätzlich zu der Bande des Fusionsproteins Degradationsbanden auf. Eine Konzentrationsbestimmung konnte nicht durchgeführt werden, weil in allen Proben neben dem Fusionsprotein weitere *E. coli*-Proteine vorliegen.

A DENV-1 Domäne 2-Konstrukte



B DENV-3 Domäne 2-Konstrukte

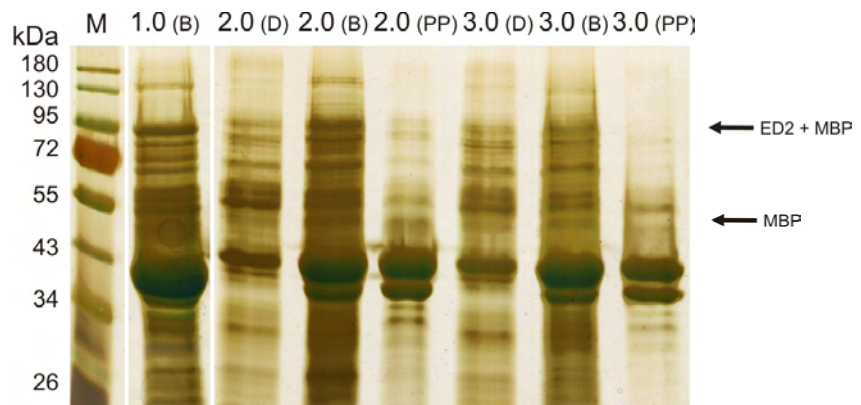


Abb. 18 Aufkonzentrierte Elutionsfraktion aller ED2-Konstrukte im Vergleich. 10 %ige SDS-PAGE. Dargestellt sind die vereinten und aufkonzentrierten Elutionsfraktionen (E1 & E2) aller Konstrukte der Serotypen DENV-1 und DENV-3: (B) Expression in *E. coli* BL21(DE3); (D) Expression in *E. coli* DH5 α ; (PP) periplasmatischer Zellaufschluss. Die Fusionsproteine liegen alle im gleichen Endvolumen vor. Die Expression aller Konstrukte erfolgte in 25 ml dYT-Medium. Eine Ausnahme bildet das DENV-1-Konstrukt 1.0 und das DENV-3-Konstrukt 1.0, welche in 300 ml dYT-Medium exprimiert wurden. Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (64 kDa) und die des reinen MBPs (43 kDa). Die Färbung der ED2-Konstrukte erfolgte nach der Methode von Merrill *et al.*.

Bevor die Antigene in einem immunologischen Reaktivitätstest eingesetzt werden können, müssen die Fusionsproteine in den Proben in gleichen Mengen vorliegen, um die Vergleichbarkeit der Resultate zu gewährleisten. Die Domäne 1-Konstrukte des Serotyps DENV-1 liegen nach der Aufkonzentrierung bereits in gleichen Mengen vor (vergl. Abb. 17 A, S. 65). Die Antigen-Konstrukte des DENV-3 Serotyps liegen dagegen in unterschiedlichen Konzentrationen vor (vergl. Abb. 17 B, S. 65). Angepasst wurden die Konzentrationen an die Probe ED1₃_3.0, exprimiert in DH5 α , da diese den geringsten Proteingehalt aufweist. Die höher konzentrierten Proben wurden gezielt verdünnt, sodass die Bandenstärken in einer erneuerten SDS-PAGE vergleichbare Konzentrationen darstellen (Abb. 19, S. 69). Die DENV-1-Konstrukte wurden mit einer Konzentration von 1,8 mg/ml und die DENV-3-Konstrukte mit einer Konzentration von 1 mg/ml im *dot assay* eingesetzt. Die DENV-2 und DENV-4-Konstrukte wurden von L. Klepsch (BNI) zur Verfügung gestellt und mit einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. Eine Ausnahme bildet das ED2₂-Konstrukt, welches mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml eingesetzt wurde. Die hergestellten Domäne 2-Konstrukte liegen in sehr geringen Konzentrationen vor und wurden keiner weiteren Anpassungen unterzogen.

3.3 Immunologischer Reaktivitätstest der Antigene

Für die Beurteilung der Reaktivität der hergestellten Fusionsproteine wurde ein *dot assay* (2.4.5) durchgeführt. Verwendet wurden die aufkonzentrierten und angepassten (3.2.3) Protein-Proben aller Domäne 1- und Domäne 2-Konstrukte. Zudem wurde reines MBP als Kontrolle aufgetragen. Zum Vergleich wurden die ED1- und ED2-Konstrukte der Serotypen DENV-2 und DENV-4 eingesetzt, da diese bereits in Vorarbeiten gute Reaktivität gegenüber Dengue positiven Seren aufgewiesen haben. Getestet wurden die Antigen-Konstrukte mit 55 Dengue positiven und fünf Dengue negativen Patientenseren aus Kolumbien (2.1.3). Für die Bewertung der Domäne 1-Konstrukte konnten 47 von 55 Test-Streifen ausgewertet werden und für die Bewertung der Domäne 2-Konstrukte 52 von 55. Von der Bewertung ausgeschlossen wurden Test-Streifen, bei denen die MBP-Kontrolle eine Reaktion zeigte. Demnach enthalten diese Seren Antikörper gegen MBP, die auch an das Fusionsprotein binden und somit die Entstehung von Punkten (*dots*), die eine positive Reaktion zwischen Antikörper und Antigen anzeigen, beeinflussen können (vergl. Abb. 25, S. 80 Serum 25).

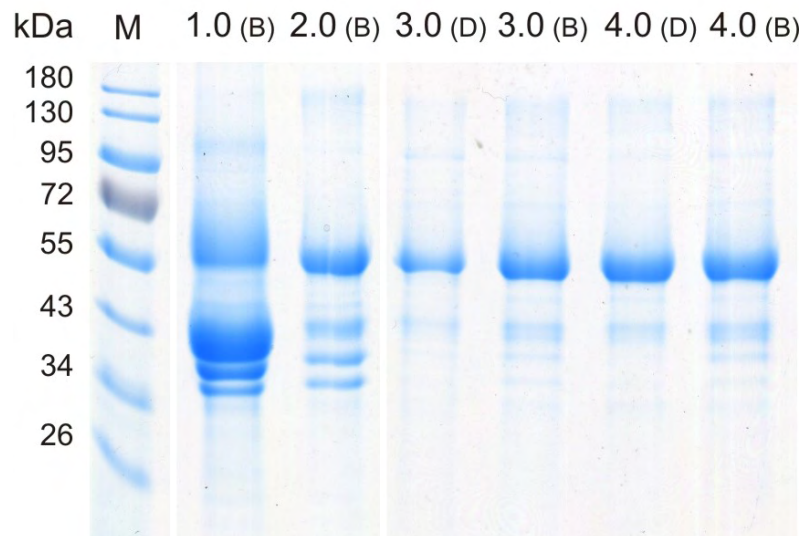


Abb. 19 Anpassung der Konzentration aller DENV-3 ED1-Konstrukte.

A 10 %ige SDS-PAGE. Dargestellt sind die vereinten, aufkonzentrierten und durch gezielte Verdünnung aneinander angepassten Elutionsfraktionen (E1 & E2) aller Konstrukte des Serotypen DENV-3: B; Expression in *E. coli* BL21(DE3), D; Expression in *E. coli* DH5 α

Die Proben wurden verdünnt, sodass in allen Proben eine vergleichbar große Fusionsprotein-Menge vorliegt. Angepasst wurden die Konzentrationen an die Probe mit dem geringsten Proteingehalt (3.0 (D)). Die Pfeile markieren die Banden der MBP-Fusionsproteine (59 kDa) und die des reinen MBPs (43,4 kDa). Die Färbung erfolgte nach der Methode von Fairbanks.

Des Weiteren wurden Test-Streifen ausgeschlossen, bei denen nicht alle Antigene gleichmäßig auf den Teststreifen aufgebracht wurden (vergl. Abb. 25, S. 80 Serum 31). Alle fünf Test-Streifen mit Dengue negativen Seren (Serum 56 - 60) konnten ausgewertet werden.

Die eingescannten Nitrocellulose-Streifen mit den Ergebnissen des *dot assays* sind in Abb. 25 (S. 80) und in Abb. 26 (S. 81) dargestellt. Die Auswertung wird unter Berücksichtigung von zwei Kriterien durchgeführt: Zum einem wird ermittelt, in wie vielen Fällen eine Antigen-Antikörper Reaktion stattfindet, um eine Aussage über die Reaktivität zu treffen. Dafür wurde die Anzahl der entstandenen *dots* pro Konstrukt ausgezählt. Die Zahlen sind in Tab. 6 (S. 72) dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auf Grundlage dieser Zahlen separate Säulendiagramme für die Domäne 1-Konstrukte (Abb. 20 A, S. 73) und die Domäne 2-Konstrukte (Abb. 22 A, S. 77) erstellt.

Zum anderen wird die Intensität der entstandenen *dots* bewertet. Es ist erkennbar, dass die Intensität der *dots* zwischen den einzelnen Streifen und damit zwischen den einzelnen Seren variiert (verl. S. 80/81). Um die Intensität der Antigen-Antikörper Reaktion auf den unterschiedlichen Test Streifen zu vergleichen, wurde jedem *dot* eine Punktzahl von null bis drei zugewiesen. Je intensiver der *dot*, desto höher die vergebene Punktzahl. Wenn keine Reaktion stattgefunden hat, wurden null Punkte vergeben.

0	1	2	3
keine Reaktion	schwache Reaktion	mittel-starke Reaktion	starke Reaktion

Für jedes Konstrukt wurde die Summe der vergebenen Punkte berechnet und zur besseren Vergleichbarkeit miteinander in Prozent umgerechnet (vergl. Tab. 6, S. 72). Zur Visualisierung der Reaktionsintensitäten wurden auf Grundlage dieser Zahlen Säulendiagramme für die Domäne 1-Konstrukte (Abb. 20 B, S. 73) und für die Domäne 2-Konstrukte (Abb. 22 B, S. 77) erstellt. Um die Verteilung der vier unterschiedlichen Reaktionsintensitäten zu beurteilen, wurde ausgezählt, wie oft eine Punktzahl pro Konstrukt vergeben wurde. Die Ergebnisse sind in Form eines gestapelten Säulendiagramms für die Domäne 1 Konstrukte (Abb. 21, S. 74) und für die Domäne 2 Konstrukte (Abb. 23, S. 78) erstellt.

3.3.1 E-Protein Domäne 1-Konstrukte

Die Anzahl der erfolgten Antigen-Antikörper Reaktionen der Domäne 1-Konstrukte zeigt, dass innerhalb der vier Serotypen keine großen Abweichungen vorliegen (Abb. 20 A, S. 73). Die DENV-1-Konstrukte reagieren in 37 von 47 Fällen (79 %) und die DENV-3-Konstrukte in 39 von 47 Fällen (83 %). Eine Ausnahme bildet das DENV-3-Konstrukt 1.0, das in 33 von 47 Fällen (70 %) reagiert. Das DENV-2-Konstrukt reagiert in 23 von 47 Fällen (49 %) und das DENV-4-Konstrukt in 26 von 47 Fällen (55 %) (vergl. Tab. 6, S. 72).

Das Diagramm (Abb. 20 B, S. 73) legt dar, dass die Reaktionsintensitäten der Antigen-Konstrukte unterschiedlich ausfallen. Für den Serotyp DENV-1 zeigt das Konstrukt 4.0 (ED1₁-4.0) den höchsten Wert auf und reagiert demnach intensiver als die übrigen ED1₁ Antigen-Konstrukte. Die Reaktivität der Konstrukte 6.0, 3.0 und 5.0 ist jedoch vergleichbar hoch. Die im Vergleich geringste Reaktivität weisen die Konstrukte 1.0 und 2.1 auf. Für den Serotyp DENV-3 zeigt das Konstrukt 3.0 (ED1₃-3.0) die höchste Reaktivität auf und ist vergleichbar reaktiv, wie das Konstrukt ED1₁ 4.0. Die Reaktivität der Konstrukte 4.0 und 2.0 ist jedoch vergleichbar hoch. Die geringste Reaktivität innerhalb der DENV-1-Konstrukte weist das Konstrukt 1.0 auf.

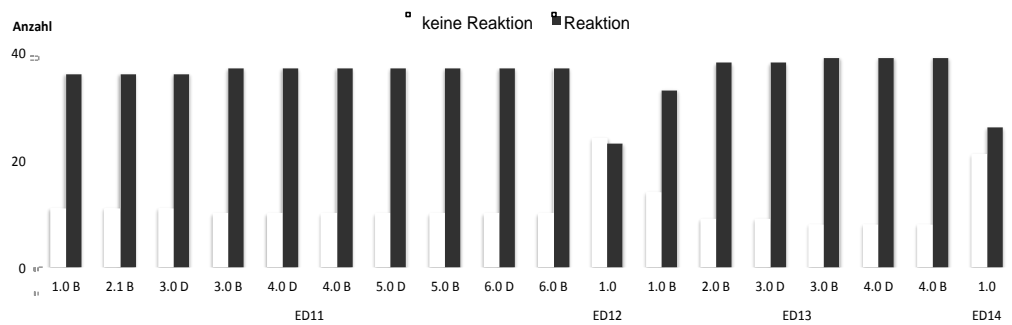
In Abb. 21 (S. 74) wird dargestellt, mit welcher Häufigkeit die Punktzahlen (null bis vier) vergeben wurden. Es ist erkennbar, dass keines der Konstrukte mit allen getesteten Patientenseren reagiert. Für den Serotyp DENV-1 zeigt sich, dass die Konstrukte 4.0, 5.0 und 6.0 in 80% der Fälle mit den getesteten Patientenseren reagieren. Die Konstrukte 5.0 und 6.0 reagierten in 25% der Fälle schwach. Jedoch ist in 75% der Fälle eine intensive bis sehr intensive Reaktion sichtbar. Die *dots* des Konstrukts 4.0 sind bei 22 von 47 Seren (47 %) sehr intensiv und bei 14 von 47 Seren (30 %) intensiv gefärbt. Somit zeigt dieses DENV-1 Antigen-Konstrukt intensivste Reaktivität mit den Dengue positiven Seren. Für den Serotyp DENV-3 zeigt sich, dass die Konstrukte 2.0 und 3.0 D in 81 % der Fälle und die Konstrukte 3.0 B und 4.0 in 83 % der Fälle mit den Seren reagieren. Die Reaktionen des Konstrukts 3.0 D fallen in 28 von 47 Seren (60 %) sehr stark aus, wohingegen bei Konstrukt 2.0 nur 12 von 47 (26 %) stark reagieren. Konstrukt 1.0 reagiert mit 33 von 47 Seren (70 %), allerdings mit deutlich geringerer Intensität, da nur bei 2 % der Fälle sehr intensive *dots* entstehen. Das DENV-3 Antigen-Konstrukt 3.0 weist demnach die intensivste Reaktivität mit den Dengue positiven Seren auf.

Tab. 6 Häufigkeit und Intensität der erfolgten Reaktionen im dot assay.

Anzahl ausgewerteter ED1 Test-Streifen		47		Anzahl ausgewerteter ED2 Test-Streifen		52	
ED1-Konstrukte		Anzahl dots mit positiver Reaktion	Intensität der dots in %	ED2-Konstrukte		Anzahl dots mit positiver Reaktion	Intensität der dots in %
ED1 ₁	1.0 B	36	55	ED2 ₁	1.0 B	46	60
	2.1 B	36	57		2.0 D	3	2
	3.0 D	36	64		2.0 B	49	63
	3.0 B	37	74		3.0 D	8	6
	4.0 D	37	86		3.0 B	48	64
	4.0 B	37	84		3.0 PP	34	28
	5.0 D	37	61		4.0 D	4	3
	5.0 B	37	75		4.0 B	45	61
	6.0 D	37	78		4.0 PP	22	17
	6.0 B	37	75		ED2 ₂	1.0	48
ED1 ₂	1.0	23	27	ED2 ₃	1.0	49	87
ED1 ₃	1.0 B	33	50		2.0 D	50	90
	2.0 B	38	70		2.0 B	49	78
	3.0 D	38	91		2.0 PP	47	68
	3.0 B	39	82		3.0 D	51	90
	4.0 D	39	76		3.0 B	51	79
4.0 B	39	71	3.0 PP	43	56		
ED1 ₄	1.0	26	48	ED2 ₄	1.0	51	73

B Expression in *E. coli* BL21(DE3); D Expression in *E. coli* DH5α; PP Expression in *E. coli* BL21(DE3) und Zellaufschluss periplasmatisch.

A Reaktionshäufigkeit der Domäne-1-Konstrukte mit Dengue positiven Seren



B Reaktionsintensitäten der Domäne 1-Antigene

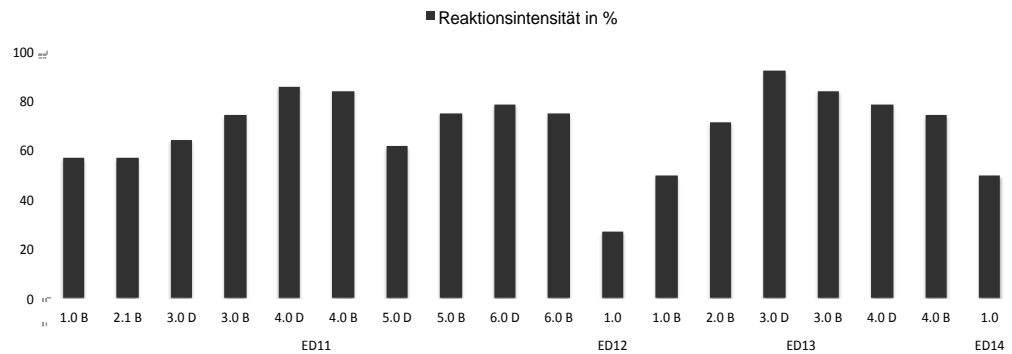


Abb. 20 Häufigkeit und Intensität der Serum-Reaktionen mit ED1-Konstrukten.
A Dargestellt ist die Anzahl der erfolgten und nicht-erfolgten Reaktionen der ED1-Konstrukte mit den Dengue positiven Patientenseren:

■ : Anzahl der stattgefunden Reaktionen
 □ : Anzahl der ausgebliebenen Reaktionen

B Dargestellt ist die Reaktionsintensität der erfolgten Reaktionen der ED1-Konstrukte mit den Dengue positiven Patientenseren in Prozent. Je intensiver die Reaktion ist, desto höher der Wert.

■ : Reaktionsintensität

B Expression in *E. coli* BL21(DE3); D Expression in *E. coli* DH5α.

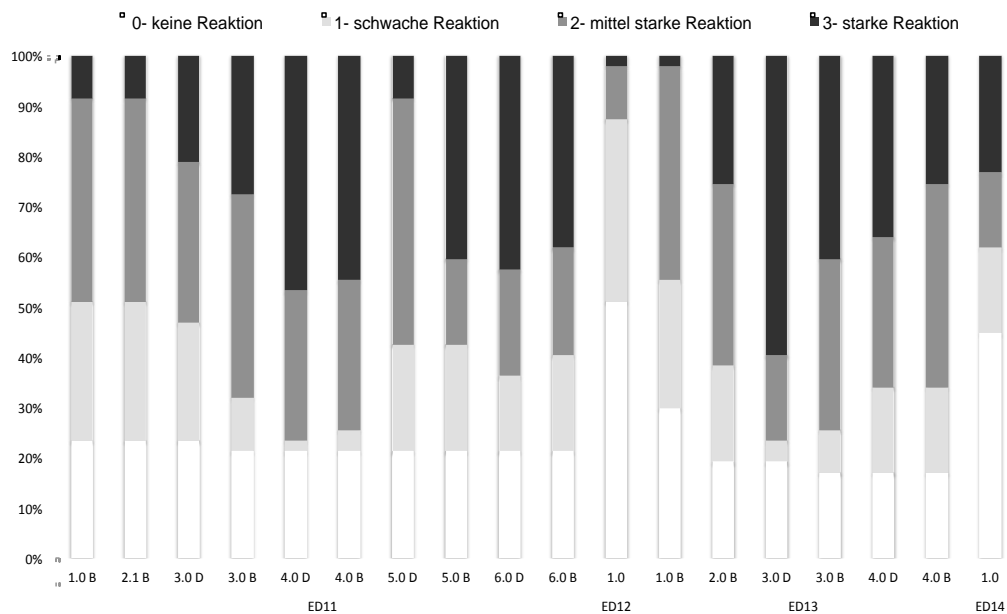


Abb. 21 Verteilung der Reaktionsintensitäten der Domäne 1-Konstrukte.

Dargestellt ist die Verteilung der verschiedenen Reaktionsintensitäten in Prozent. Es wird gezeigt, in wie viel Prozent der Fälle eine der vier Reaktionsstärken eingetreten ist:

- : starke Reaktionen (3 Punkte)
- : mittel-starke Reaktionen (2 Punkte)
- : schwache Reaktionen (1 Punkte)
- : keine Reaktionen (0 Punkte)

B Expression in *E. coli* BL21(DE3); D Expression in *E. coli* DH5α.

Für die Domäne 1-Konstrukte ergibt sich, dass die Reaktivität eines Konstrukts, unabhängig davon ob es in BL21(DE3) oder in DH5 α exprimiert wurde, vergleichbar ist (vergl. Abb. 20 B, S. 73).

3.3.2 E-Protein Domäne 2-Konstrukte

Die rekombinanten Domäne 2-Antigene konnten nicht alle in gleicher Konzentration exprimiert und auf den Teststreifen aufgebracht werden. Daher zeigen die geringer konzentrierten DENV-1-Antigene (2.0 D, 3.0 D, 3.0 PP, 4.0 D, 4.0 PP) deutlich geringere Reaktionsintensitäten als die höher konzentrierten Antigene (1.0 B, 2.0 B, 3.0 B und 4.0 B). Für den Serotyp DENV-3 konnten alle Proteine in ähnlichen Mengen produziert werden. Eine Ausnahme bilden die beiden periplasmatisch aufgeschlossenen Proben (2.0 PP und 3.0 PP), die eine geringere Konzentration aufweisen (vergl. Abb. 15).

Werden die gering-konzentrierten Antigene außer Acht gelassen, so zeigt sich, dass die Anzahl der erfolgten Antigen-Antikörper Reaktionen der Domäne 2-Konstrukte innerhalb der vier Serotypen keine großen Abweichungen aufweisen (Abb. 19 A, S. 69). Zudem reagieren alle Konstrukte in mindestens 86 % der Fälle. Das Konstrukt 2.0 des Serotyps DENV-1 reagiert in 48 von 52 Fällen (92 %) und das Konstrukt 3.0 in 49 von 52 Fällen (94 %). Das Konstrukt 2.0 des Serotyps DENV-3 zeigt in 50 von 52 Fällen (96 %) und das Konstrukt 3.0 in 51 von 52 Fällen (98 %) eine Reaktion. Das DENV-2-Konstrukt reagiert in 48 von 52 Fällen (92 %) und das DENV-4-Konstrukt in 51 von 52 Fällen (98 %) (vergl. Tab. 6).

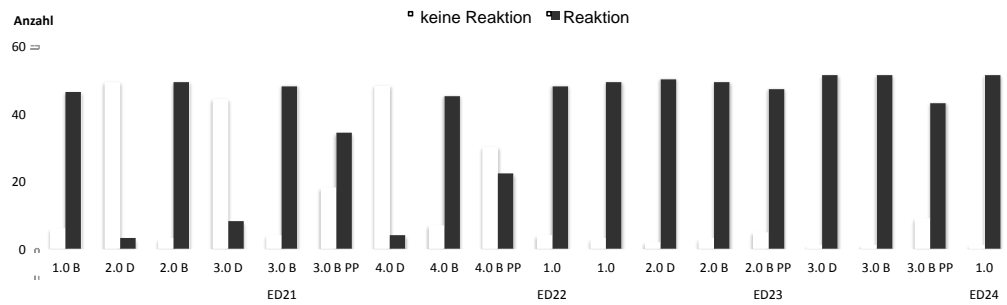
Das Diagramm Abb. 19 B (S. 69) legt dar, dass die Reaktionsintensitäten der Domäne 2 DENV-1 Antigen-Konstrukte ebenfalls keine großen Abweichungen zueinander aufweisen. Den höchsten Wert zeigt das DENV-1-Konstrukt 3.0 auf. Die Reaktionsintensitäten der DENV-3 Antigen-Konstrukte deuten an, dass die Konstrukte 1.0, 2.0 und 3.0 intensiver als die übrigen Konstrukte reagieren. Die Konstrukte 2.0 und 3.0 wurden in zwei verschiedenen *E. coli* Stämmen hergestellt und zusätzlich einmal periplasmatisch aufgeschlossen, sodass drei Proben getestet werden konnten, die das gleiche Antigen enthalten. Es fällt auf, dass innerhalb der drei aufgetragenen Proben eine Abnahme der Reaktionsintensität von je $10 \% \pm 3 \%$ stattfindet, wobei die 2.0 D und 3.0 D den höchsten Wert, und 2.0 PP und 3.0 PP den niedrigsten Wert aufweisen. Dies kann mit den unterschiedlichen Proteinkonzentrationen begründet werden (Abb. 15, S. 59).

Die Häufigkeit der Vergabe der einzelnen Punktzahlen (null bis vier) ist in Abb. 20 (S. 70) zusammengefasst. Es ist erkennbar, dass keines der Konstrukte mit allen getesteten Patientenseren reagiert. Für den Serotyp DENV-1 zeigt sich, dass alle Konstrukte vergleichbar intensive Reaktionen mit den getesteten Patientenseren aufweisen. Die *dots* des Konstrukts 3.0 sind bei 12 von 52 Seren (23 %) sehr intensiv und bei 26 von 52 Seren (50 %) intensiv gefärbt. Somit zeigt dieses DENV-1 Antigen-Konstrukt die intensivste Reaktivität mit den Dengue positiven Seren. Für den Serotyp DENV-3 stellt sich heraus, dass die Reaktionsintensitäten deutliche Unterschiede aufweisen. Die oben beschriebene Abnahme der Reaktionsintensität innerhalb der drei Proben der 2.0 und 3.0 Konstrukte spiegelt sich auch in dieser Grafik wider. Die Reaktionen des Konstrukts 1.0 fallen in 38 von 52 Seren (73 %) sehr stark aus, wohingegen bei Konstrukt 3.0 39 von 52 (75 %) sehr stark reagieren. Die *dots* des Konstrukts 2.0 sind bei 41 von 52 Seren (79 %) sehr intensiv gefärbt. Somit zeigt dieses DENV-3 Antigen-Konstrukt die intensivste Reaktivität mit den Dengue positiven Seren. Demnach ergibt sich, dass die Menge der aufgetragenen Domäne 2-Antigene, die durch den Expression-Stamm und den Zellaufschluss beeinflusst wird, die Reaktion mit Seren beeinflusst.

3.3.3 Dengue-negativ-Seren

Die Test-Streifen der Dengue negativen Patientenseren (56 bis 60) zeigen für nahezu alle untersuchten Antigene-Konstrukte positive Reaktivitäten (Abb. 21 A & B, S. 71). Da alle Patienten gegen das Gelbfiebervirus (*yellow fever virus*, YFV) vakziniert sind, enthalten die Dengue negativen Seren YFV-Antikörper. Die Reaktivität der Domäne 1- und Domäne 2-Konstrukte mit diesen Seren ist in Abb. 24 (S. 79) dargestellt. Die Domäne 1-Konstrukte zeigen in mindestens 2 von 5 Fällen (40 %) eine Reaktion, wobei das DENV-3-Konstrukt 4.0 in 100 % der Fälle reagiert. Die Reaktivität der Domäne 2-Konstrukte ist auch in diesem Falle von der aufgetragenen Menge der Antigene abhängig. Dadurch haben die niedrig konzentrierten Konstrukte nicht in allen Fällen reagiert, wohingegen die übrigen Konstrukte in 5 von 5 Fällen reagiert haben.

A Reaktionshäufigkeit der Domäne-2-Konstrukte mit Dengue positiven Seren



B Reaktionsintensitäten der Domäne 2-Antigene

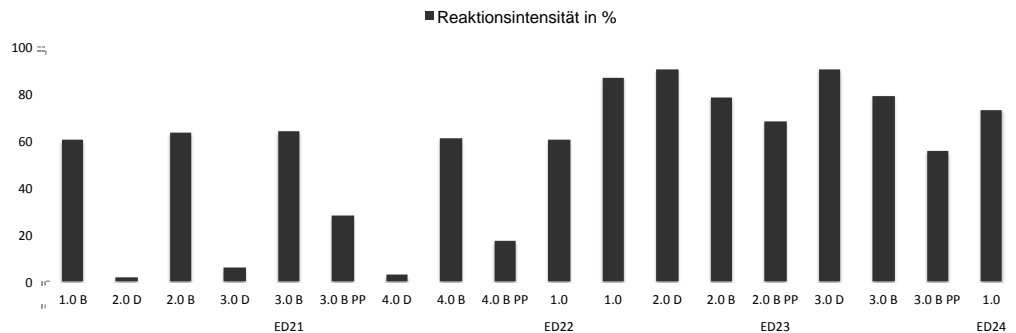


Abb. 22 Häufigkeit und Intensität der Serum-Reaktionen mit ED2-Konstrukten.
A Dargestellt ist die Anzahl der erfolgten und nicht-erfolgten Reaktionen der ED1-Konstrukte mit den Dengue positiven Patientenseren:

■ : Anzahl der stattgefunden Reaktionen
□ : Anzahl der ausgebliebenen Reaktionen

B Dargestellt ist die Reaktionsintensität der erfolgten Reaktionen der ED1-Konstrukte mit den Dengue positiven Patientenseren in Prozent. Je intensiver die Reaktion ist, desto höher der Wert.

■ : Reaktionsintensität

B Expression in *E. coli* BL21(DE3); D Expression in *E. coli* DH5 α ; PP Expression in *E. coli* BL21(DE3) und Zellaufschluss periplasmatisch.

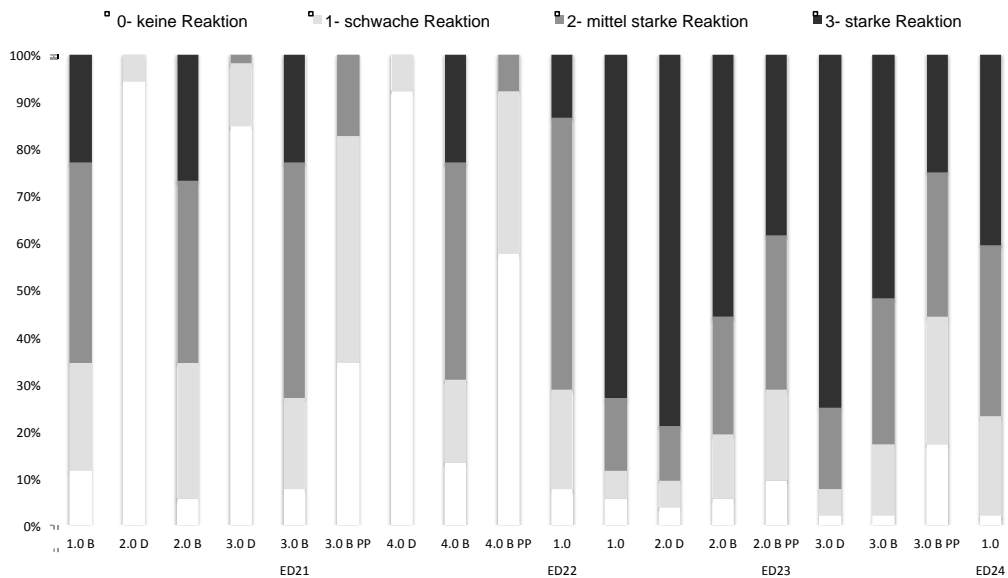


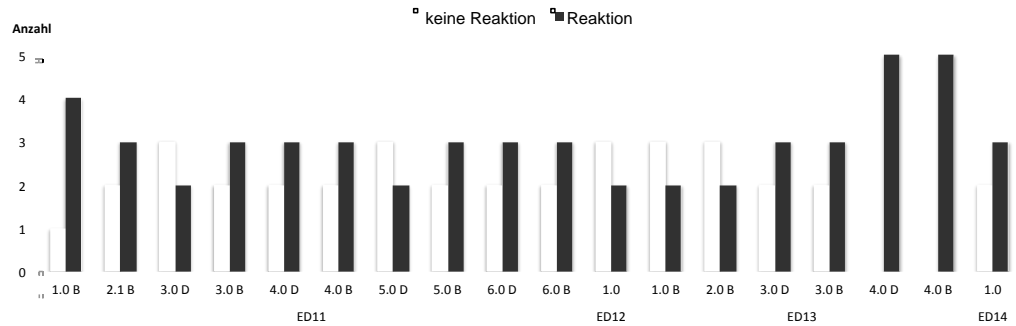
Abb. 23 Verteilung der Reaktionsintensitäten der Domäne 2-Konstrukte.

Dargestellt ist die Verteilung der verschiedenen Reaktionsintensitäten in Prozent. Es wird gezeigt, in wie viel Prozent der Fälle eine der vier Reaktionsstärken eingetreten ist:

- : starke Reaktionen (3 Punkte)
- : mittel-starke Reaktionen (2 Punkte)
- : schwache Reaktionen (1 Punkte)
- : keine Reaktionen (0 Punkte)

B Expression in *E. coli* BL21(DE3); D Expression in *E. coli* DH5 α ; PP Expression in *E. coli* BL21(DE3) und Zellaufschluss periplasmatisch.

A Reaktionshäufigkeit der Domäne-1-Konstrukte mit Dengue negativen Seren



B Reaktionshäufigkeit der Domäne-2-Konstrukte mit Dengue negativen Seren

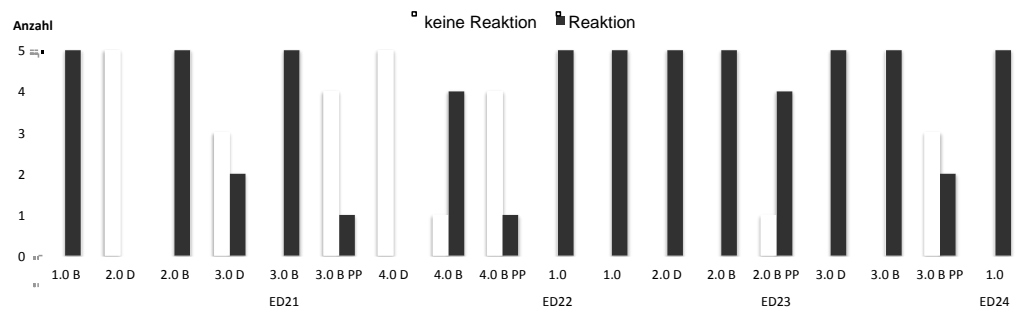


Abb. 24 Reaktionshäufigkeit der Antigen-Konstrukte mit Dengue-negativ-Seren.
A Dargestellt ist die Anzahl der erfolgten und nicht-erfolgten Reaktionen der ED1-Konstrukte mit den Dengue negativen Patientenseren:

■ : Anzahl der stattgefunden Reaktionen
 □ : Anzahl der ausgebliebenen Reaktionen

B Dargestellt ist die Anzahl der erfolgten und nicht-erfolgten Reaktionen der ED2-Konstrukte mit den Dengue negativen Patientenseren:

■ : Anzahl der stattgefunden Reaktionen
 □ : Anzahl der ausgebliebenen Reaktionen

B Expression in *E. coli* BL21(DE3); D Expression in *E. coli* DH5α; PP Expression in *E. coli* BL21(DE3) und Zellaufschluss periplasmatisch.

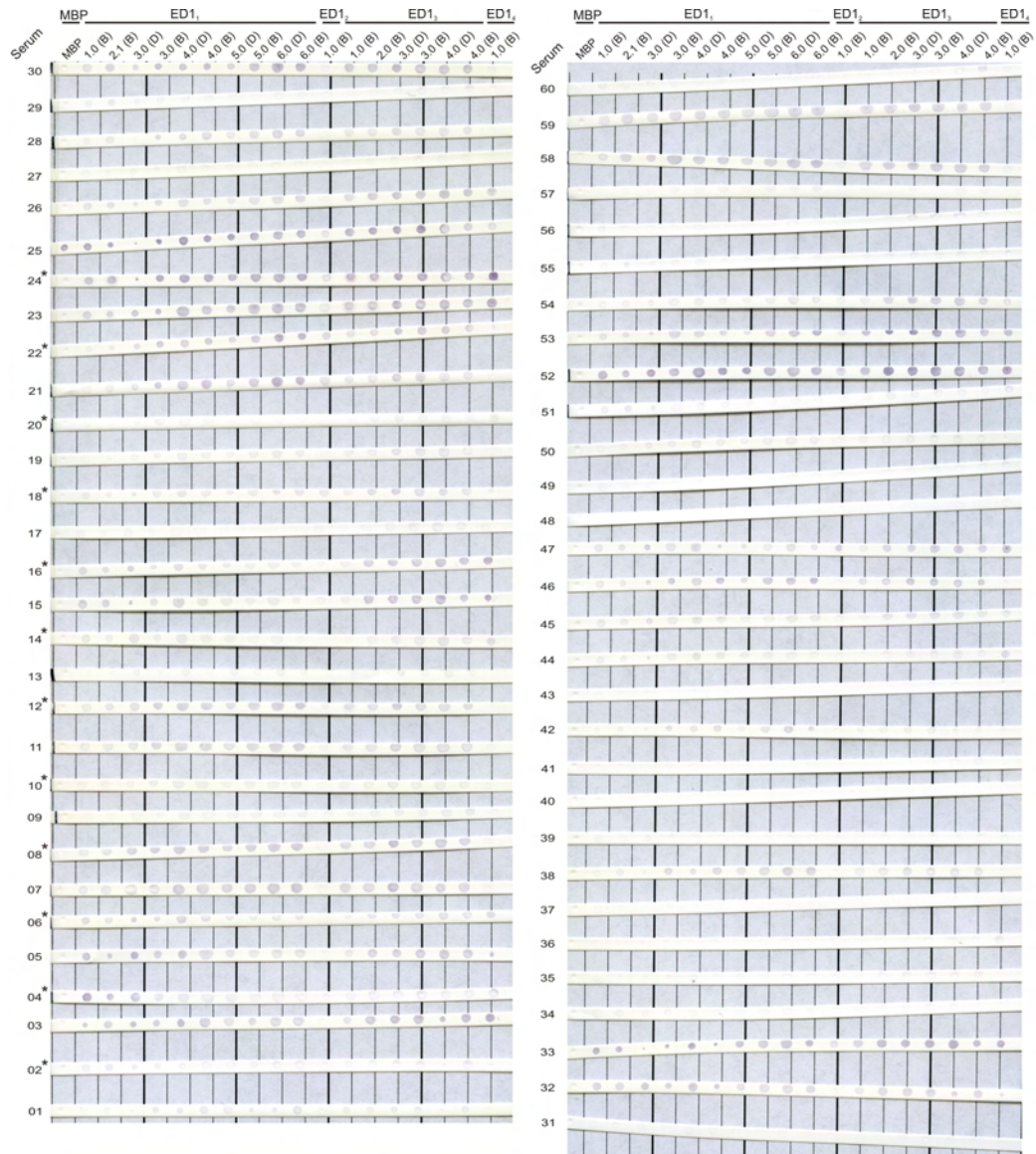


Abb. 25 Originaldaten des dot assays für alle Domäne 1-Konstrukte.
 Serum 1 bis 55: Dengue-positiv-Seren der Akutphase (2-6 Tage nach Einsetzen von Symptomen). Die mit * gekennzeichneten Seren sind Konvaleszenz-Proben, die nach 2-5 Wochen entnommen wurden. Serum 56 bis 60: Dengue-negativ-Seren. Patienten sind YFV-vakziniert.

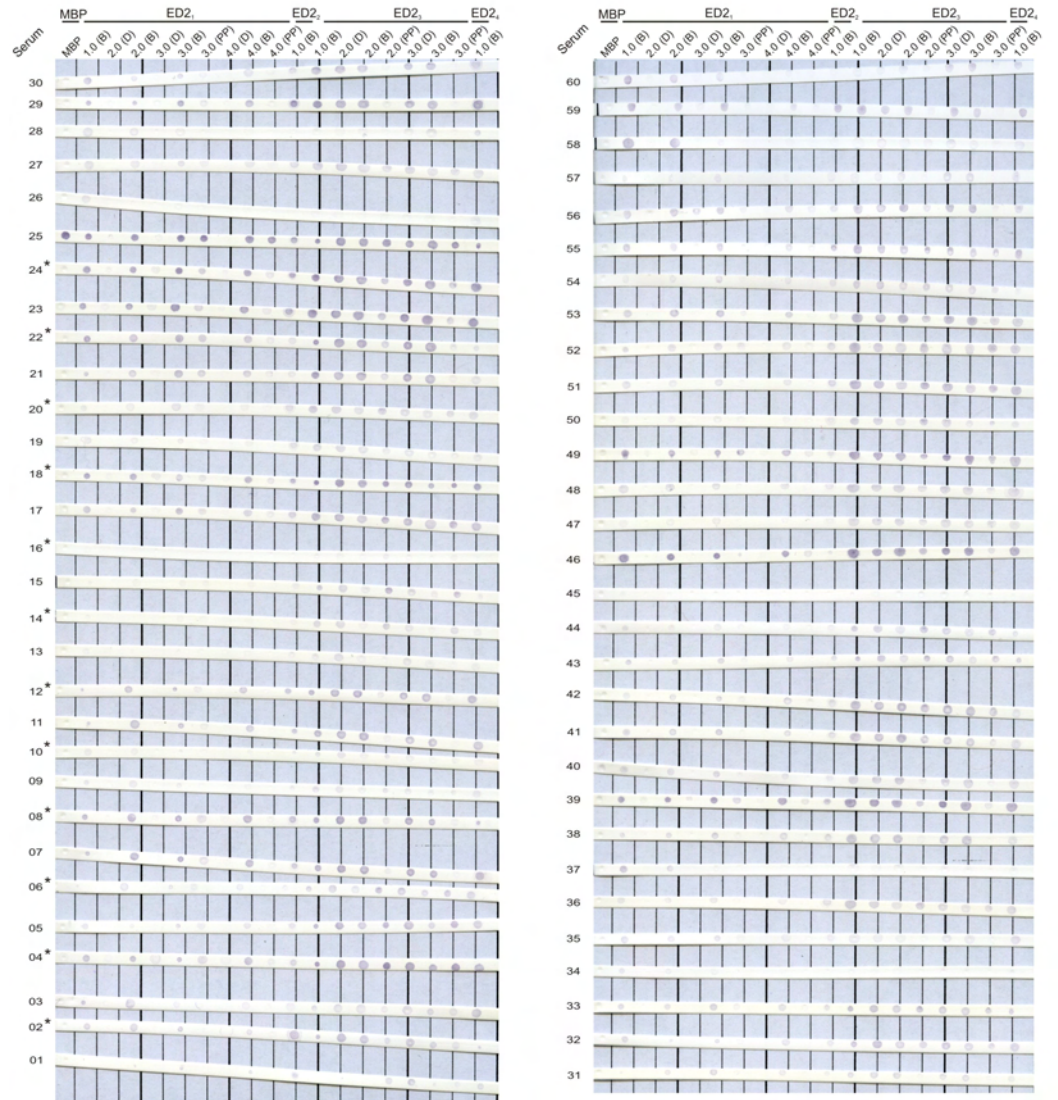


Abb. 26 Originaldaten des *dot assays* für alle Domäne 2-Konstrukte.

Serum 1 bis 55: Dengue-positiv-Seren der Akutphase (2-6 Tage nach Einsetzen von Symptomen). Die mit * gekennzeichneten Seren sind Konvaleszenz-Proben, die nach 2-5 Wochen entnommen wurden. Serum 56 bis 60: Dengue-negativ-Seren. Patienten sind YFV-vakziniert.

4. Diskussion

Das E-Protein des Dengue-Virus besteht aus drei Proteindomänen, die Epitope für Antikörper tragen und daher auch getrennt voneinander als rekombinante Antigene in immunologischen Tests eingesetzt werden können. Domäne 1 (ED1) wird durch drei Sequenzabschnitte kodiert, die mit den zwei Sequenzabschnitten der Domäne 2 (ED2) im Wechsel vorliegen, wohingegen die Domäne 3 (ED3) durch eine kontinuierliche Sequenz kodiert wird. Daher liegt ED3 bereits als rekombinantes Antigen vor und wurde in diagnostischen Tests eingesetzt (Ludolfs *et al.*, 2002; Emmerich, 2013). Allerdings weisen die getesteten Patientenserum eine Kreuzreaktivität innerhalb der vier Dengue-Serotypen auf (Nawa *et al.*, 2000). Eine Differenzierung der Serotypen ist bisher nur durch aufwendige Methoden, wie dem Neutralisations-Test und einer RT-PCR möglich (Deubel *et al.*, 1990). Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Domänen 1 und 2 separat voneinander zu exprimieren und ihre Anwendbarkeit als diagnostische Antigene in einem immunologischen Test zu untersuchen.

Dafür wurde zunächst die Herstellung von Expressionsplasmiden angestrebt, die für die Expression der Fusionsproteine eingesetzt werden können. Insgesamt gelang die Herstellung von fünf ED1₁, drei ED1₃, drei ED2₁ und zwei ED2₃ Konstrukten. Alle Konstrukte konnten, unter Anwendung von verschiedenen molekularbiologischen Methoden, in der gewünschten Form hergestellt und mittels Sequenzierung überprüft werden. Für die Verknüpfung der einzelnen Fragmente wurde ein Aminosäure-*link* bestehend aus den Aminosäuren Glycin, Prolin und Glycin (GPG) gewählt. Die GPG-Sequenz findet sich im Glykoprotein gp120 des HI-Virus wieder und bildet ein Wende-Motiv (*turn motif*) (vergl. Abb. 24, S. 75). Das zyklische Prolin wird als Helixbrecher bezeichnet, da die Konformation einen Knick in der Protein-Struktur verursacht. Die kleinen, ungeladenen Glycine ermöglichen den angrenzenden Aminosäuren freie Drehbarkeit, wodurch eine flexible *linker* Region entsteht. Die GPG-Sequenz wurde zudem als nicht immunogen charakterisiert (Schreiber *et al.*, 1997).

Nach der erfolgreichen Herstellung von Expressionsplasmiden wurde die Expression und Aufreinigung der Antigen-Konstrukte angestrebt. Vorherige Studien haben gezeigt, dass eine Expression von rekombinanten Dengue-Proteinen im *E. coli* Expressionssystem erfolgreich verlaufen kann (Ludolfs *et al.*, 2002; Franzke, 2014).



Abb. 27 **GPG-turn motif im Glykoprotein gp120 des HI-Virus als Proteinstruktur.** Die GPG-Sequenz bildet ein Wendemotiv, das zwei β -Faltblattstrukturen verbindet. Die Aminosäure Prolin verursacht einen Knick und wird von zwei Glycinen flankiert, die klein und ungeladen sind und somit eine flexible *linker*-Region zwischen zwei Protein-Strukturen bilden. Die Proteinstruktur (PDB-File: 1G9N) wurde mit der Software Pymol erstellt.

Zudem ist die Expression in *E. coli* günstig, einfach zu handhaben und resultiert in vergleichsweise hohen Ausbeuten. Daher wurde die Expression der Antigen-Konstrukte in *E. coli* durchgeführt. Andere Studien belegen, dass eine Expression der Proteine als MBP-Fusionsprotein die Löslichkeit erhöht und der Faltungsprozess unterstützt wird. (Fox *et al.*, 2003; Kapust, 1999). Daher wurde für die Herstellung der Antigen-Konstrukte das pMAL-p4X Plasmid genutzt, welches die Expression der in den Polylinker einklonierten Sequenzen als MPB-Fusionsprotein ermöglicht. Zudem bewirkt das Plasmid eine periplasmatische Überexpression des Fusionsproteins. Im Periplasma befinden sich Enzyme, die die Katalyse von Disulfidbrücken und dadurch den Faltungsprozess der Antigene unterstützen, um eine möglichst native Struktur der Antigene zu bewirken (Di Guan *et al.*, 1988; Maina *et al.*, 1988).

Diese Strategie hat dazu geführt, dass alle hergestellten Antigen-Konstrukte erfolgreich exprimiert werden konnten. Es zeigte sich, dass alle Domäne 1-Konstrukte ohne Probleme in beiden *E. coli*-Stämmen exprimiert werden können. Die Konstrukte der Domäne 1 des Serotyps DENV-3 konnten unter gleichen Bedingungen in dem Stamm BL21(DE3) in größeren Mengen als die Konstrukte des Serotyps DENV-1 hergestellt werden. Die Überexpression im Stamm DH5 α verläuft schwächer als im Stamm

BL21(DE3). Letzterer ist aufgrund von eingeführten genetischen Mutationen ein besserer Expressionsstamm, da er weniger Proteasen (z.B. OmpT) produziert, die das rekombinante Protein zersetzen. Zudem wird die T7 RNA-Polymerase durch das DE3 Lysogen in das *E. coli*-Genom eingebracht, wodurch die Überexpression stark ansteigt (Studier, 1986). Um Limitierungen in der Herstellung zu vermeiden, sollten in künftigen Expressionsversuchen der Expressions-Stamm BL21(DE3) genutzt werden.

Es hat sich weiterhin herausgestellt, dass die neuen Domäne 1-Konstrukte in größeren Mengen exprimiert werden als die ursprünglichen Konstrukte. Bezogen auf das Expressionsvolumen wurden die ursprünglichen Konstrukte, ED1₁_1.0 mit einer Konzentration von 0,24 µg/ml und ED1₁_2.1 mit einer Konzentration von 1,2 µg/ml exprimiert. Dahingegen wurden die neuen Konstrukte, ED1₁_3.0 bis 6.0 mit einer Konzentration von 14,4 µg/ml exprimiert. Bei den DENV-3-Konstrukten wurde das ursprüngliche Konstrukt, ED1₃_1.0 mit einer Konzentration von 0,35 µg/ml exprimiert wurde, wohingegen die neuen Konstrukte ED1₃_2.0 bis 4.0 mit einer Konzentration von 25,2 µg/ml in BL21(DE3) exprimiert werden konnten. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Veränderung der *linker*-Region die Konformation der Proteine beeinflusst, die Faltung der Proteine erleichtert und somit den Herstellungsprozess beschleunigt. In der Studie von Miller et al. wurde festgestellt, dass die Konformation eines Proteins Einfluss auf die Wachstumsrate der *E. colis* haben kann (Miller *et al.*, 2010).

Des Weiteren zeigt sich, dass die Expression der E-Protein Domäne 2 unabhängig von den Konstrukten gleichermaßen schwach verläuft. Zudem führte die Expression der DENV-1-Konstrukte in DH5α zu einer geringen Überexpression. Daher ist auch für die Domäne 2-Konstrukte eine Expression mit BL21(DE3) von Vorteil. In allen Fällen degradiert ein Großteil der Domäne 2-Fusionsproteine und fällt als unlösliches Protein aus. Ein periplasmatischer Aufschluss der Konstrukte zeigt, dass sich der Großteil der degradierten Proteine im Cytoplasma befindet. Der Anteil an Fusionsprotein im Periplasma ist geringer als im Cytoplasma, jedoch scheint nur richtig gefaltetes Fusionsprotein vorzuliegen. Dies bestätigt die Vermutung, dass der Export des Fusionsproteins durch die cytoplasmatische Membran das Protein in einen andern Faltungsprozess als im Periplasma zwingt und dadurch die Löslichkeit und die Stabilität des Proteins verändert wird. Eine mögliche Begründung dafür, dass die Domäne 2-Konstrukte stärker davon betroffen sind als die Domäne 1-Konstrukte, kann anhand der Anzahl und der Position der Disulfidbrücken gestellt werden. Die Domäne 2 enthält drei Disulfidbrücken, deren Ausbildung für die korrekte Faltung und damit für die

Stabilität des Proteins von großer Bedeutung ist, wohingegen die Domäne 1 nur zwei Disulfidbrücken besitzt (Abb. 24 A, S. 78). Bei der Domäne 1 überbrückt der *link* zwischen den Abschnitten ED1.2 und ED1.3 denselben Bereich, wie die zweite Disulfidbrücke des Proteins. Ist die Ausbildung dieser Disulfidbrücke nicht möglich, so wird vermutet, dass die native Struktur des Proteins trotzdem erhalten werden kann, da der *link* den Bereich zusammenhält. Eine andere Vermutung ist, dass die Ausbildung dieser Disulfidbrücke dazu führt, dass der GPG-*link* in dem Bereich keine strukturellen Veränderungen und damit keinen negativen Einfluss auf die Konformation des Proteins hat. Bei der Domäne 2 werden alle drei Disulfidbrücken zwischen den Strukturen des Fragments ED2.1 ausgebildet, sodass räumlich getrennte Bereiche der Polypeptidkette zusammengebracht werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass diese kovalenten Bindungen essenziell für die Entstehung der nativen Struktur des Proteins sind (vergl. Abb. 24 B, S. 78). Ist die Ausbildung dieser Disulfidbrücken nicht möglich, so entsteht vermutlich überwiegend denaturiertes und unlösliches Protein. Daher können nur vergleichsweise wenig Domäne 2-Antigene hergestellt werden. Da sowohl die Antigen-Konstrukte des Cytoplasmas als auch die Konstrukte des Periplasmas Reaktion mit Dengue-Antikörpern aufweisen, bleiben den hergestellten Antigenen demnach native Epitope erhalten.

Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte mittels Affinitätschromatografie, bei der größtenteils *Mini Spin*-Säulen mit einem Volumen von 1 ml verwendet wurden. In den Durchflussfraktionen und den Waschfraktionen konnten in den meisten Fällen Fusionsproteine nachgewiesen werden. Daher wird angenommen, dass die Kapazität der Säule zu gering war und sich die Ausbeute durch eine Aufreinigung im größeren Format verbessern würde. Im Labor von F.X. Heinz wurde ein ähnliches Ziel verfolgt, wobei dort die E-Protein Domäne 1 anderer Flaviviren (TBEV, WNV) zu einem Antigen-Konstrukt verknüpft wurde (Tsouchnikasdes, 2011). Als *link* wurden zum einen die Aminosäuren GAG und zum andern eine Aminosäure-Kette von vier und acht Glycinen (4G und 8G) eingesetzt. Es wurde das Baculo-Virus Expressionssystem mit einer *Spodoptera frugiperda* Zelllinie (Nybakken, 2006) und das *Drosophila* Expressionssystem von Invitrogen zur Herstellung der Antigene genutzt. Die Herstellung von rekombinanten E-Proteinen des Dengue- und West-Nil-Virus wurden in diesem System bereits erfolgreich durchgeführt (Lieberman *et al.*, 2007; Modis *et al.*, 2005). Es hat sich herausgestellt, dass die TBEV-GAG-Antigene mit der geringsten Konzentration (0,69 µg/ml) und

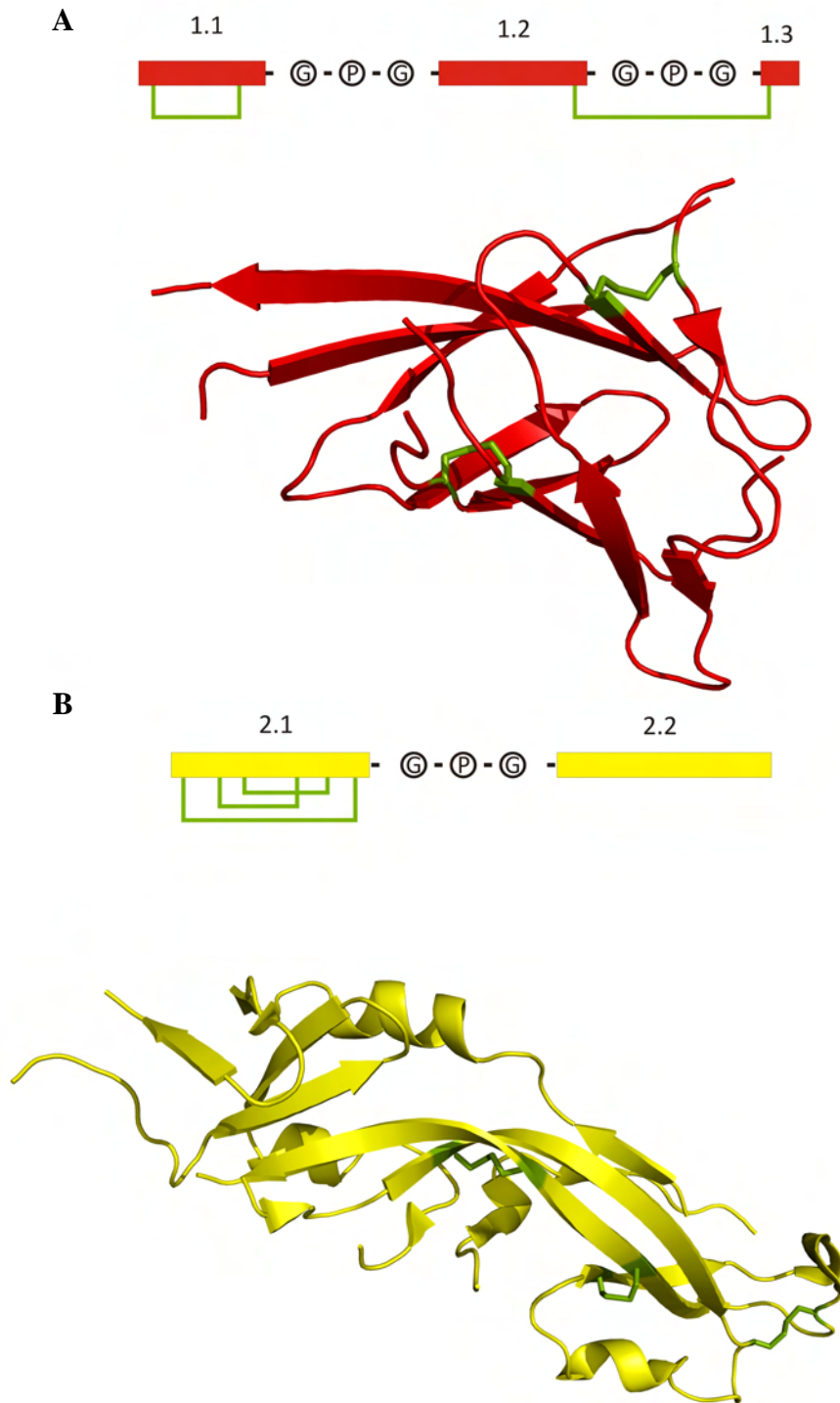


Abb. 28 Position der Disulfidbrücken als Schema und in Proteinstruktur.

A E-Protein Domäne 1 mit Disulfidbrücken (SS-Brücke)

B E-Protein Domäne 2 mit Disulfidbrücken

Die Positionen der Disulfidbrücken sind in grün unter dem Schema der GPG-verlinkten Sequenzen dargestellt. Zudem sind die Positionen in der Proteinstruktur gezeigt, wobei die Cysteine, die an der SS-Brücke beteiligt sind, als stick in grün veranschaulicht sind. Die Proteinstrukturen (PDB-File: 3G7T) wurden mit der Software Pymol erstellt.

die TBEV-8G Antigene mit der höchsten Konzentration (3,75 µg/ml) hergestellt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass eine flexible *linker*-Region die Expression großer Mengen begünstigt. Es ist anzunehmen, dass die rekombinanten Proteine auf diese Weise eine bessere Möglichkeit haben, die native Konformation einzunehmen, da sich Flaviviren auch in der Natur in Säugetierzellen und Insektenzellen vermehren. Im Unterschied zu dazu wurde in dieser Arbeit ein *E. coli*-Expressionsystem genutzt, wodurch im Vergleich höhere Ausbeuten erzielt werden können. Bezogen auf das Expressionsvolumen konnten die Domäne 1-Antigen-Konstrukte in dieser Arbeit tatsächlich in vier bis sechsfach höheren Mengen hergestellt werden. Eine erfolgreiche Reaktion der Antigene zeigt, dass native Epitope für die Antikörper zugänglich sind. Jedoch konnte nicht bestimmt werden, ob die native Konformation tatsächlich vorliegt. Nach der erfolgreichen Herstellung der Antigen-Konstrukte, wurde angestrebt diese in einem immunologischen Test einzusetzen, um die Reaktivität mit Dengue positiven Patientenseren zu analysieren. Es wurde die *dot* Blot-Methode eingesetzt, bei welcher die Antigene auf einen Nitrozellulose-Streifen immobilisiert und mit den Patientenseren inkubiert werden. Die Detektion erfolgte indirekt über eine Farbreaktion, die durch die an den sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase katalysiert wurde. In Abhängigkeit von der Menge an gebundenen Antikörpern, fällt der blaue Farbstoff in unterschiedlichen Intensitäten auf der Membran aus. Es war erkennbar, dass die Intensität der entstandenen Punkte (*dots*) zwischen den einzelnen Streifen und damit zwischen den einzelnen Seren variiert. Da die Antigene auf jedem Test-Streifen in gleichen Mengen eingesetzt wurden, zeigt sich, dass die Intensität der Reaktion von der Menge der im Serum enthaltenen Antikörper abhängt. Die Seren der Konvaleszenz-Proben, die nach 2-5 Wochen entnommen wurden, enthalten im Gegensatz zur Erstprobe aus der akuten Phase, eine erhöhte Anzahl an Antikörpern (WHO/TRD, 2009). Es zeigte sich jedoch, dass die Konvaleszenz-Proben keine intensiveren *dots* aufweisen, da die Epitope der Antigene wahrscheinlich bereits mit den geringeren Antikörpermengen der Erstprobe gesättigt wurden (vergl. Abb. 22 S. 72, Serum 11 & 12, Serum 23 & 24). Alle Domäne 1-Konstrukte reagieren mit der gleichen Häufigkeit mit den Patientenseren, obwohl die DENV-1-Konstrukte in einer höheren Konzentration vorlagen, als die DENV-3 Konstrukte (vergl. Abb. 17, S. 65). Dies könnte auf strukturelle Unterschiede zwischen den Proteindomänen der Serotypen zurückzuführen sein, wodurch mehr DENV-3 Epitope als DENV-1 Epitope für die Antikörper zugänglich sind. Zudem belegt dieser Sachverhalt, dass die Häufigkeit der Antigen-Antikörper-Reaktionen nicht durch

die unterschiedlichen Konstrukte beeinflusst wird. Die ursprünglichen Domäne 1-Konstrukte reagieren in 70-77 % der Fälle, während die ursprünglichen Domäne 2-Konstrukte sogar in 88-94% der Fälle eine Reaktion zeigten. Die Expressionsanalyse dieser Konstrukte legte offen, dass die Ausbeute der Proteine größer als in der Vorarbeit ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Menge der eingesetzten Antigene einen entscheidenden Faktor darstellt. Gleichzeitig können die neuen Konstrukte unter gleichen Bedingungen in größeren Mengen hergestellt werden. Eine Betrachtung der Intensität, der stattgefundenen Reaktionen, zeigt Konstrukt-bedingte Unterschiede auf. Einige Konstrukte weisen sehr intensiv gefärbte *dots* auf, während andere Konstrukte nur zu schwachen Intensitäten führten. Für die Domäne 1 ergab sich, dass das DENV-1 Antigen-Konstrukt 4.0 und das DENV-3 Antigen-Konstrukt 3.0 die intensivste Antigen-Antikörper Reaktion herbeiführt. Für die Domäne 2 zeigen das DENV-1 Antigen-Konstrukt 3.0 und das DENV-3 Antigen-Konstrukt 2.0 die intensivste Antigen-Antikörper Reaktion. Daher sollten diese Konstrukte in zukünftigen Experimenten eingesetzt werden. Eine mögliche Erklärung, warum diese Konstrukte besser reagieren als die anderen Konstrukte ist, dass das Vorhandensein von polaren- und unpolaren Aminosäuren (AS) in unmittelbarer Umgebung des *links* die Konformation beeinflusst. Eine Betrachtung der drei Aminosäuren, die den *link* flankieren, zeigt, dass Konstrukte, die von drei polaren und drei unpolaren Aminosäuren oder von vier polaren und zwei unpolaren Aminosäuren umgeben sind, intensive Reaktionen mit den Seren zeigen. Im Gegensatz dazu ist der *link* bei den ursprünglichen Konstrukten von fünf polaren und einer unpolaren Aminosäure umgeben und reagiert im Vergleich weniger intensiv mit den Seren. Auch könnte die Position der geladen Aminosäuren einen Einfluss auf die Konformation haben (siehe Abb. 25 A, S. 82). So könnten zwischen sauren und basischen AS ionische Bindungen entstehen, die das Wendemotiv des *links* positiv beeinflussen oder die Flexibilität des *links* einschränken können. Es kann jedoch nicht vorausgesagt werden, ob durch diese Beeinflussungen die native Konformation des Proteins begünstigt wird oder ob eine leicht denaturierte Form des Proteins entsteht, wodurch zuvor verborgene Epitope freigelegt werden. Im Hinblick auf die Expression zeigt sich, dass die Überexpression dieser Konstrukte stärker als die der Konstrukte aus der Vorarbeit ausgeprägt ist. In Abb. 29 B (S. 89) ist die Proteinstruktur mit der jeweiligen Position des GPG-*links* von den vier Antigen-Konstrukte zu sehen, für die die beste Reaktion nachgewiesen werden konnte.

A Position der un-/ geladenen Aminosäuren um den GPG-link

rot: saure AS, blau: basische AS, grau: ungeladene AS

Domäne 1

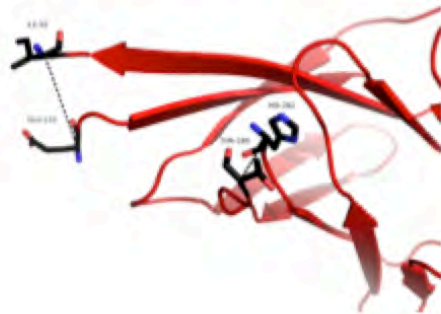
ED1 _{1_4.0}	TEVI <u>GPG</u> ENLKY	ED1 _{3_3.0}	TEAT <u>GPG</u> ENLKY
----------------------	-----------------------	----------------------	-----------------------

Domäne 2

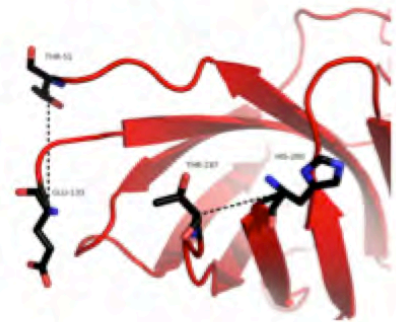
ED2 _{1_3.0}	GKIVM <u>GPG</u> RTGLD	ED2 _{3_2.0}	GKVVI <u>GPG</u> RTGLD
----------------------	------------------------	----------------------	------------------------

B Darstellung der Aminosäuren die am GPG-link beteiligt sind

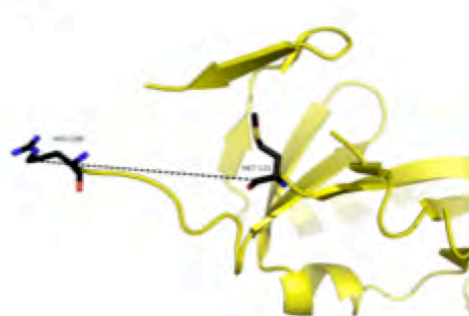
ED1_{1_4.0}



ED1_{3_3.0}



ED2_{1_3.0}



ED2_{3_2.0}

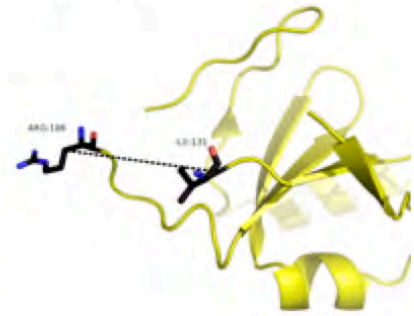


Abb. 29 Ladung und Position der Aminosäuren die am GPG-link beteiligt sind.

A Gezeigt sind die Antigen-Konstrukte, für die die beste Reaktion mit Patientenserum nachgewiesen werden konnte und die Aminosäuren, die den GPG-link flankieren. Die Färbung erfolgt in Abhängigkeit der geladenen und ungeladenen Seitenketten; Saure Aminosäuren sind rot hinterlegt, basische AS blau. Unpolare und nicht-geladene Aminosäuren sind grau hinterlegt.

B Proteinstruktur der unter A genannten Konstrukte mit schematischem *link*. Die Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt und nach Element eingefärbt (Sauerstoff; rot, Stickstoff; blau). Die Proteinstruktur (PDB-File: 3G7T) wurde mit der Software Pymol erstellt.

Es ist erkennbar, dass der *link* Molekülstrukturen verbindet, die nicht mit einer β -Faltblatt oder einer α -Helix Struktur in Verbindung stehen. Dies ist in allen Konstrukten der Fall. Studien mit monoklonalen Antikörpern haben gezeigt, dass sich Epitope auf den β -Faltblatt-Strukturen befinden (Matsui *et al.*, 2009). Daher scheint ein *link*, der diese Strukturen nicht beeinflusst, sinnvoll zu sein, um eben diese Epitope zu erhalten. Es zeigt sich zudem, dass alle Antigen-Konstrukte aller Dengue-Serotypen mit den Antikörpern der jeweiligen Patientenseren reagieren, daher sind die hergestellten Antigene nicht für die Serotyp-spezifische Detektion von Antikörpern geeignet. In Kolumbien sind alle vier Dengue-Serotypen vertreten (Villar *et al.*, 2015). Jedoch ist es sehr unwahrscheinlich, dass der Großteil der getesteten Patienten mit allen Dengue-Serotypen infiziert war. Neben dem Gelbfiebervirus (YFV) zirkuliert zudem auch das Chikungunyavirus (CHIKV) in Kolumbien. Beide Viren weisen eine hohe Kreuzreaktivität mit Dengue auf (Houghton-Triviño, 2008; Yap *et al.*, 2010). Die Test-Streifen mit den Dengue negativen Seren zeigen in den meisten Fällen eine positive Reaktion. Da alle diese Patienten gegen das Gelbfiebervirus vakziniert sind, findet wahrscheinlich eine Kreuzreaktion zwischen den Dengue-Antigen-Konstrukten und den YFV-Antikörpern statt. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die Patienten auch CHIKV-Antikörper besitzen, die mit den Dengue-Antigenen kreuzreagieren können.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die Reaktivität von der Menge der eingesetzten Konstrukte und nicht von den Konstrukten selbst abhängt. Jedoch war eine Abhängigkeit der Reaktionsintensität der erfolgten Reaktionen von den Konstrukten zu beobachten. So konnte pro Domäne und Serotyp je ein Konstrukt entwickelt werden, das in großen Mengen hergestellt werden kann und mit Patientenseren zu intensiven Reaktionen führt. Die Reaktionshäufigkeit dieser Konstrukte ist im Folgenden dargestellt:

Domäne 1 DENV-1 Konstrukt 4.0 = 79 %

Domäne 1 DENV-3 Konstrukt 3.0 = 83 %

Domäne 2 DENV-1 Konstrukt 3.0 = 92 %

Domäne 2 DENV-3 Konstrukt 2.0 = 94 %

Diese Antigene stellen wertvolle Werkzeuge für verschiedene immunologische Tests dar, um mehr über die Spezifität der humoralen Immunantwort der Dengue- Viren zu lernen. Sie können in diagnostischen Tests, wie dem ELISA-Format, eingesetzt werden und eignen sich möglicherweise für die allgemeine Dengue-Diagnostik.

5. Zusammenfassung

Die Gruppe der Dengue-Viren (DENV) ist in vier Serotypen (DENV-1 bis DENV-4) unterteilt. Die meisten Epitope für Dengue-Antikörper bietet das virale Oberflächenprotein E, das aus den drei Proteindomänen ED1, ED2 und ED3 besteht. ED3 wird durch einen kontinuierlichen Genabschnitt bestimmt und kann daher einfach kloniert und als rekombinantes Protein exprimiert werden. Im Gegensatz dazu wird ED1 durch drei und ED2 durch zwei Sequenzabschnitte bestimmt, die nicht kontinuierlich vorliegen. Daher stehen rekombinante ED1- und ED2-Proteine nicht als separate Proteine zur Verfügung.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die separate Expression der ED1- und ED2-Domänen, um diese in einem serologischen Test einzusetzen. Da im Rahmen von Vorarbeiten die Herstellung reaktiver Antigene für die Serotypen DENV-2 und DENV-4 gelungen war, lag der Fokus dieser Arbeit auf Antigen-Konstrukten für DENV-1 und DENV-3.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene ED1- und ED2-Konstrukte hergestellt, indem die Sequenzabschnitte der Domänen mit drei Aminosäuren (Gly-Pro-Gly) verknüpft wurden, die ein *turn motif* bilden. Mit Hilfe von verschiedenen PCR-Methoden wurden zusammengesetzte Sequenzen für ED1 und ED2 erstellt und in das Plasmid pMAL-p4X inkliniert. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte in *E. coli*. Die Antigene wurden als MBP-Fusionsprotein exprimiert, wodurch eine Aufreinigung mittels MBP-Affinitätschromatografie durchgeführt werden konnte. Die Reaktivität der Antigene wurde mit Patientenseren aus Kolumbien ermittelt.

Die Herstellung rekombinanter ED1- und ED2-Antigene der Serotypen DENV-1 und DENV-3 wurde erfolgreich realisiert. Es wurde festgestellt, dass die ED1-Antigene in größeren Mengen als die ED2-Antigene exprimiert werden können. Die Nutzung des Stamms *E. coli* BL21(DE3) war dabei von Vorteil. Es konnte pro Domäne und Serotyp je ein geeignetes Konstrukt ermittelt werden, welches in großen Mengen hergestellt werden kann und mit Patientenseren intensiv reagiert. Diese Konstrukte können nun als diagnostische Antigene in verschiedenen immunologischen Tests eingesetzt werden.

5.1 Summary

Dengue virus (DENV) is subdivided into four serotypes (DENV-1 to DENV-4). Viral surface protein E contains of three structural domains and is the major target for antibodies. It is formed by three domains, ED1, ED2 and ED3. ED3 can easily be cloned and expressed as a recombinant protein since it is coded by a single gene segment. In contrast, ED1 and ED2 sequences are organized differentially. The ED1 coding sequence is divided into three segments, and two gene segments encoding for ED2. Thus, recombinant forms of ED1 and ED2 are not available as separate proteins.

Major goal of this thesis was to accomplish a separate expression of ED1 and ED2 to test these antigens with an immunological assay. In previous trials the productions of reactive antigens for DENV-2 and DENV-4 was accomplished, so that this thesis focused on DENV-1 und DENV-3.

Therefore, different expression constructs for ED1 and ED2 were created by linking the gene segments with three amino acids (Gly-Pro-Gly) forming a turn motif. Using several PCR methods constructs for ED1 and ED2 were created and cloned into the pMAL-p4X plasmid. *E. coli* was used to express the recombinant protein as MBP-fusionprotein, allowing easy protein purification using affinity chromatography. Patients sera from Columbia were used to examine the reactivity of these antigens.

The production of recombinant ED1 and ED2 antigens could be realised successfully for DENV-1 and DENV-3, although ED1 antigens were expressed in higher rates than ED2 antigens. Expression in *E. coli* BL21(DE3) was advantageous. For each domain and serotype a construct was determined, which could be expressed in high rates and leads to intensive reactions with patients sera. These constructs can be used as diagnostic antigens in several immunological assays.

6. Literaturverzeichnis

- Bryksin, Anton V., und Ichiro Matsumura. „Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids.“ *Biotechniques.*, 2010: 463–465.
- Bundesgesundheitsbl. „Dengue Fieber Virus (DENV).“ *Bundesgesundheitsbl 2011*, 2011.
- Calisher, C. H., et al. „Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera .“ *The Journal of General Virology*, 70, 37–43 , 1989.
- Cockburn, JJ, et al. „Structural insights into the neutralization mechanism of a higher primate antibody against dengue virus.“ *The EMBO journal*, 2012: 767–79.
- Deubel, V, et al. „Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood.“ *J Virol Methods*, 1990.
- Di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs, und H. Inouye. „Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein.“ *Gene*, 67(1) 21-30, 1988.
- Emmerich, P., A. Mika, und H. Schmitz. „Detection of serotype-specific antibodies to the four dengue viruses using an immune complex binding (ICB) ELISA.“ *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013.
- Fairbanks, G., T. L. Steck, und D. F Wallach. „Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane .“ *Biochemistry* , 1971.
- Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, und L.A Ball. „The positive sense single stranded RNA viruses.“ *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, 8th Report of the International Comittee on Taxonomy of Viruses*, 2005.
- Ferreira, G. L. C. „Global dengue epidemiology trends.“ *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 54 Suppl 1, S5–6 , 2012.
- Fox, J. D., K. M. Routzahn, M. H. Bucher, und D. S. Waugh. „Maltodextrin-binding proteins from diverse bacteria and archaea are potent solubility enhancers. .“ *FEBS Letters*, 537(1-3), 53–7., 2003.
- Franzke, Kati. „Identifizierung antigener Determinanten der E-Proteine von Dengue-Viren zum Nachweis Dengue- sowie Serotyp-spezifischer Antikörper .“ 2014.
- Fritz, Richard, Karin Stiasny, und Franz X. Heinz. „Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion.“ *J Cell Biol.*, 2008: 353–361.

- Gibson, DG, L Young, RY Chuang, JC Venter. „Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.“ *Nat Methods.*, 2009: 343-5
- Guzman, Maria G., et al. „Dengue: a continuing global threat .“ *Nature Reviews Microbiology* , 2010.
- Halstead, S. B., S. Udomsakdi. „Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. I. Experience with classification of dengue viruses .“ *Yale J Biol Med* , 1970.
- Halstead, S. B., und E. J. O'Rourke. „Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes .“ *Nature* 265(5596): 739-741, 1977.
- Harris, E., et al. „Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single- tube multiplex reverse transcriptase PCR .“ *Journal of Clinical Microbiology*, 1998: 2634–9.
- Houghton-Triviño, N, D Montaña, und J. Castellanos. „Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis.“ *Rev Salud Publica (Bogota)*. 10(2):299-307., 2008.
- Huanga, Claire Y.-H., et al. „The dengue virus type 2 envelope protein fusion peptide is essential for membrane fusion.“ *Virology*, 2010: 305–315.
- Jaiswal, S., und N. Khanna. „High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*.“ *Protein Expr Purif*, 2004: 80-91.
- Kapust, R. B., und D. S Waugh. „*Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused .“ *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 8(8), 1668–74 , 1999.
- Kurane, I. „Dengue hemorrhagic fever with special emphasis on immunopathogenesis.“ *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2007.
- Kurosu, Takeshi. „Quasispecies of dengue virus.“ *Tropical Medicine and Health Vol. 39 No. 4 Supplement*, 2011: 29-36.
- Laemmli, U.K. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 .“ *Nature*, 1970.
- Lanciotti, R. S., C. H. Calisher, D. J. Gubler, G. J. Chang, und A. V. Vorndam. „Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction .“ *Journal of Clinical Microbiology*, 1992: 545–551.

- Laoprasopwattana, K, DH Libraty, TP Endy, A Nisalak, S Chunsuttiwat, und FA Ennis. „Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by plasma obtained before secondary dengue virus infections: potential involvement in early control of viral replication.“ *Infect Dis*, 2007.
- Leitmeyer, K. C., et al. „Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis.“ *Journal of Virology*, 73(6), 4738–47, 1999.
- Li, L., S. M. Lok, et al, und et al. „The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation.“ *Science*, 2008.
- Lindenbach, B. D., H.-J. Thiel, C.M. Rice, und D. M. Knipe. „Flaviviridae: the viruses and their replication.“ *Fields Virology, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, PA., 2007.*
- Ludolfs, D., S. Schilling, J. Altenschmidt, und H. Schmitz. „Serological Differentiation of Infections with Dengue Virus Serotypes 1 to 4 by Using Recombinant Antigens.“ *Journal of Clinical Microbiology*, 2002.
- Maina, C. V, et al. „An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein.“ *Gene*, 74(2), 365–73, 1988.
- Matsui, K, GD Gromowski, L Li, AJ Schuh, JC Lee, und AD Barrett. „Characterization of dengue complex-reactive epitopes on dengue 3 virus envelope protein domain III.“ *Virology*, 2009: 16-20
- Mattia, K., et al. „Dengue reporter virus particles for measuring neutralizing antibodies against each of the four dengue serotypes.“ *PloS One*, 2011.
- Merril, C.R., D. Goldman, S.A. Sedman, und M.H. Ebert. „Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins.“ *Science*, 1981.
- Miller, Jason, Montserrat Arrasate, Benjamin A. Shaby, Siddhartha Mitra, Eliezer Masliah, und Steven Finkbeiner. „Quantitative relationships between huntingtin levels, polyglutamine length, inclusion body formation, and neuronal death provide novel insight into Huntington’s disease molecular pathogenesis.“ *J Neurosci.*, 2010: 10541–10550.
- Modis, Y, S Ogata, D Clements, und SC Harrison. „Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein.“ *J.Virol.*, 2005: 1223.

- Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison. „A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003: 6986–91.
- Modrow, Susanne, Dietrich Falke, Uwe Truyen, und Hermann Schätzl. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2010.
- Nawa, M, KI Yamada, T Takasaki, T Akatsuka, und I. Kurane. „Serotype-cross-reactive immunoglobulin M responses in dengue virus infections determined by enzyme-linked immunosorbent assay.“ *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000.
- Nayak, V, M Dessau, K Kucera, K Anthony, M Ledizet, und Y Modis. „Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion.“ *J.Virol.*, 2009: 4338.
- NewEnglandBiolabs. „Protein Expression & Analysis pMAL™ Protein Fusion & Purification System.“ 2015. <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/FF91B67397D945E0956F3483174CF7E3/Datacards%20or%20Manuals/manualE8200.pdf> (Zugriff am August 2015).
- Nybakken, G. E., und C. A. Nelson. „Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein.“ *J Virol*, 2006: 11467-11474.
- Osatomi, K, und H Sumiyoshi. „Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA.“ *Virology*, 1990.
- Pierson, T. C., und M. S. Diamond. „Molecular mechanisms of antibody-mediated neutralisation of flavivirus infection .“ *Expert Rev Mol Med* 10: e12 , 2008.
- Puttikhunt, C., et al. „The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus.“ *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* , 2011: 314–9.
- Rainwater-Lovett, K., I. Rodriguez-Barraquer, D. A. T. Cummings, und J. Lessler. „Variation in dengue virus plaque reduction neutralization testing: systematic review and pooled analysis .“ *BMC Infectious Diseases*, 12, 233, 2012.
- Rey, F. A., F. X. Heinz, et al. „The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution.“ *Nature* , 1995: 291-298.
- Rico-Hesse, R. „Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature .“ *Virology*, 174(2), 479–93, 1990.
- Russell, P. K., A. Nisalak, P. Sukhavachana, und S. Vivona. „A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies .“ *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 99(2), 285–90, 1967 .

- Sabin, AB. „Research on dengue during World War II.“ *Am J Trop Med Hyg*, 1952.
- Schieffelin, John S, et al. „Neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies against dengue virus E protein derived from a naturally infected patient .“ *Virology Journal* , 2010.
- Schreiber, M., et al. „The V3-directed immune response in natural human immunodeficiency virus type 1 infection is predominantly directed against a variable, discontinuous epitope presented by the gp120 V3 domain .“ *Journal of Virology* 71(12), 9198–205 , 1997.
- Studier, F. William, und Barbara A. Moffatt. „Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes.“ *J. MoZ. Biol.*, 1986: 113-130 .
- Tripathi, N. K., und J. P. Babu. „Production and characterization of recombinant dengue virus type 4 envelope domain III protein .“ *J Biotechnol* , 2008: 278-286.
- Tsouchnikasdes, Georgios. „Production, purification and characterisation of flavivirus antigens.“ *Universität Wien, Fakultät für Lebenswissenschaften, AC08791851*, 2011.
- Vaughn, D. W., et al. „Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity.“ *J Infect Dis* 181(1): 2-9., 2000.
- Villar, Luis Angel, Diana Patricia Rojas, Sandra Besada-Lombana, und Elsa Sarti. „Epidemiological Trends of Dengue Disease in Colombia (2000-2011): A Systematic Review.“ *PLoS Negl Trop Dis*. 9(3): e0003499., 2015.
- Volk, D. E., und F. J. May.„Structure of yellow fever virus envelope protein domain III .“ *Virology*, 2009: 12-18.
- Volk, D. E., und Y. C. Lee. „Solution structure of the envelope protein domain III of dengue-4 virus .“ *Virology*, 2007: 147-154.
- WHO. *WHO.int*. 2015. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/> (Zugriff am 2015).
- WHO/TRD. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. 2009. <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf> (Zugriff am August 2015).
- Yap, Grace, et al. „Evaluation of Chikungunya Diagnostic Assays: Differences in Sensitivity of Serology Assays in Two Independent Outbreaks.“ *PLOS neglected tropical diseases*, 2010.
- Zhang, Y, et al. „Structures of immature flavivirus particles.“ *EMBO J.*, 2003: 2604-13.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker für die Betreuung der Arbeit als Erstgutachter und für die immer sehr netten Gespräche bedanken.

Bei Herrn Dr. Michael Schreiber möchte ich mich für die Aufnahme in seine Laborgruppe, die Vergabe des sehr spannenden Themas und für die Übernahme des Zweitgutachters bedanken.

Heidi Auerswald danke ich für die Betreuung und die nette Zusammenarbeit im Labor und für die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern der Laborgruppe, Leonard Klepsch und Kerstin Krausz, für die freundschaftliche Unterstützung und die guten Gespräche im Labor bedanken.

Dr. Simone Kann danke ich für die Bereitstellung der Patientenseren aus Kolumbien.

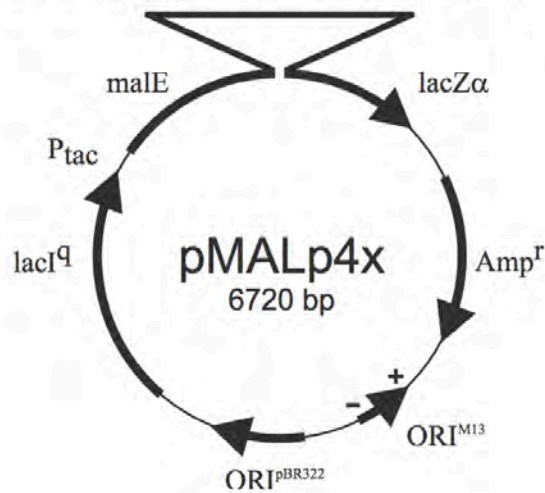
Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums immer unterstützt und ermutigt haben.

II Anhang

A Plasmidkarte: pMAL-p4X

Polylinker mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme

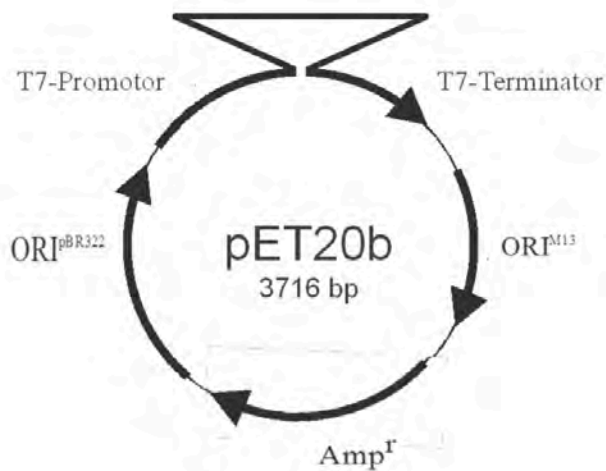
		EcoRI	BamHI	XbaI	SaliI	PstI	
malE...	ATT TCA	<u>GAA TTC</u>	<u>GGA TCC</u>	<u>TCT AGA</u>	<u>GTC GAC</u>	<u>CTG CAG</u>	...lacZa
	I S	E F	G S	S R	V D	L Q	



B Plasmidkarte: pET20b

Polylinker mit Schnittstellen der Restriktionsenzyme

		BamHI		HindIII	
T7-Promoter ...	CCG AAT	<u>TCG AGC</u>	TCC GTC GAC	<u>AAG CTT</u>	GCG ...T7-Term.
	P N	S S	S V	D K	L A



C Primer

	<i>Forward Primer Sequenz</i>	<i>Reverse Primer Sequenz</i>
ED1 ₁ _2.0	(inkl. EcoRI)5' TCAGAATTCATGCGCTGCGTGGGC 3'	(inkl. PstI)5' TGCCTGCAGCGCGCCTTTCAGGGT 3'
ED1 ₁ _2.1	5'CTGAAAGGCGCGTAACTGCAGGCAAG C 3'	5'GCTTGCCTGCAGTTACGCGCCTTTCAG G 3'
ED1 ₁ _3.0	5'GTGACCGGCCCGGGCGAAAACCTGAA ATATAGCG 3'	5'CGCTATATTTTCAGGTTTTTCGCCCGGG CCGGTCAC 3'
ED1 ₁ _4.0	5'GCTGAAAACCGAAGTGATTGGCCCGG GCGAAAACCTG 3'	5'CAGGTTTTTCGCCCGGGCCAATCACTT CGGTTTTTCAGC 3'
ED1 ₁ _5.0	5'GAAAACCGAAGTGGGCCCGGGCAAC 3'	5'GTTGCCCGGGCCCACTTCGGTTTTTC3 '
ED1 ₁ _6.0	5'GTGGGCCCGGGCCTGAAATATAGCG3 '	5'CGCTATATTTTCAGGCCCGGGCCAC3 '
ED1 ₃ _3.0	5'GCAACCGGCCCGGGCGAAAATCTGAA ATATACCG 3'	5'CGGTATATTTTCAGATTTTCGCCCGGG CCGGTTGC 3'
ED1 ₃ _4.0	5'CAAAAACCGAAGCAACCATTGGCCC GGGCGAAAATCTG 3'	5'CAGATTTTCGCCCGGGCCAATGGTTG CTTCGGTTTTTTTG 3'
ED2 ₁ _2.0	5'GAAGGCAAATTTGGTCCGGGTCGTAC C 3'	5'GGTACGACCCGGACCAATTTTGCCTT C 3'
ED2 ₁ _3.0	5'CTGGAAGGCAAATTTGTTATGGGTCC GGGTTCGTACCGG 3'	5'CCGGTACGACCCGGACCCATAACAAT TTTGCCTTCCAG 3'
ED2 ₁ _4.0	5'CAAATTTGGTCCGGGTAATGAAATGG TTCTG3'	5'CAGAACCATTTTCATTACCCGGACCAA TTTTG3'
ED2 ₃ _2.0	5'CATTGAAGGCAAAGTTGTTATTGGTC CGGGTCGTACCGGTC 3'	5'GACCGGTACGACCCGGACCAATAACA ACTTTGCCTTCAATG 3'
ED2 ₃ _3.0	5'CATTGAAGGCAAAGTTGTTATGGGTC CGGGTCGTACCGG 3'	5'CCGGTACGACCCGGACCCATAACAAC TTTGCCTTCAATG 3'

D Oligonukleotide für ED1₃_2.0 assembly PCR

	Oligonukleotid Sequenz
Oligonukleotid1	5' GATTTTCAGAATTCGGAATGCGTTGTGTTGGTGTGGCAATCGTGATTT TGTTG 3'
Oligonukleotid 2	5' TCGAGAACAACGTCGACCCAGGTTGCACCGCTCAGACCTTCAACAAAA TCACGATTGCCAAC 3'
Oligonukleotid 3	5' GGTTCGACGTTGTTCTCGAGTATGGTGGTTGTGTTACCACCATGGCAAA AAACAAACCGACC 3'
Oligonukleotid 4	5' CCGGGCCGTTGCTTCGGTTTTTTTGCAGTTCAATATCCAGGGTCGGTT TGTTTTTTTGCCA 3'
Oligonukleotid 5	5' AAGCAACCGGCCCGGCAATCTGAAATATACCGTGATTATCACCGTGC ATACCGGTG 3'
Oligonukleotid 6	5' CTGCGGTAACGCCCTGGGTTTCATTACCAACCTGATGCTGATCACCGG TATGCACGG 3'
Oligonukleotid 7	5' AGGGCGTTACCGCAGAAATTACACCGCAGGCAAGCACCGCAGAAGCAA TTCTGCCGGAA 3'
Oligonukleotid 8	5' GACCGGTACGCGGACTACACTCGAGGCCAGGGTGCCATATTCGGCA GAATTGCTTCTG 3'
Oligonukleotid 9	5' GTCCGCGTACCGGTCCTGGTCATCTGAAATGTCGTCTGAAAATGGATA AACTCGAGCTGAAA 3'
Oligonukleotid 10	5' CAGGTCGACTCTAGAGTCAATAGCTCATACCTTTCAGCTCGAGTTTAT CCATTTTC 3'
<i>Flanking PrimerA</i>	5' GATTTTCAGAATTCGGAATGCGTT 3'
<i>Flanking PrimerB</i>	5' CAGGTCGACTCTAGAGTCAATAGC 3'