



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT  
FÜR TROPENMEDIZIN



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

*Hamburg University of Applied Sciences*

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

**Expression und Charakterisierung von rekombinanten  
Denguevirus ED3-Antigenen zum serologischen Nachweis  
Serotyp-spezifischer Antikörper**

**Bachelorarbeit**

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

**Ines Rudnik**

2164150

Hamburg, 20. Februar 2019

Die Bachelorarbeit wurde durchgeführt in der Laborgruppe LG-Schreiber in der Abteilung für Virologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM).

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)  
**2. Gutachter:** Dr. Michael Schreiber (BNITM Hamburg)

## Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Schreiber dafür bedanken, dass er mir diese Arbeit ermöglicht hat. Mein ganz besonderer Dank gilt auch Kerstin Krausz. Sie hat mir bei der Ausführung der Versuche immer hilfreich zur Seite gestanden. Ihre Unterstützung war mir eine große Hilfe. Auch möchte ich mich bei Patrycja Kadlubowska und bei Maibritt Kretschmer für die guten Labortipps bedanken, die mir bei der Durchführung meiner Versuche sehr geholfen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Lebenspartner Simon dafür bedanken, dass er mich während meiner Arbeit den Haushalt übernommen hat, sodass ich mich mehr auf meine Arbeit konzentrieren konnte. Außerdem möchte ich mich auch bei ihm und bei meiner Mutter für die moralische Unterstützung bedanken.

*Auch ist das Suchen und Irren gut, denn durch Suchen und Irren lernt man.*

Johann Wolfgang von Goethe  
Gespräche. Mit Johann Peter Eckermann , 1. Mai 1825

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
1.1	Das Denguevirus.....	1
1.2	Die humorale Immunantwort gegen die Denguevirus-Hüllproteine .....	3
1.3	Die serologische Denguevirus-Diagnostik .....	6
1.4	Ziel der Arbeit.....	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	
2.1	Material	
2.1.1	Laboraausstattung.....	10
2.1.2	Bakterien.....	10
2.1.3	Klonierungsvektoren.....	10
2.1.4	Chemikalien .....	11
2.1.5	Sequenzprimer .....	11
2.1.6	Enzyme .....	12
2.1.7	Medien .....	12
2.1.8	Puffersysteme und Lösungen.....	13
2.1.9	Gele.....	14
2.1.10	Molekulargewichtsstandards .....	14
2.1.11	Reagenzien-Kits.....	14
2.1.12	Oligonukleotide für die <i>assembly</i> -PCR .....	15
2.2	Methoden	
2.2.1	Kultivierung von Bakterien .....	17
2.2.2	Herstellung kompetenter Zellen.....	17
2.2.3	Hitzeschock-Transformation .....	17
2.2.4	Plasmid-Präparation.....	18
2.2.5	Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen.....	18
2.2.6	Gelelektrophorese .....	19
2.2.7	DNA-Gelextraktion .....	19
2.2.8	DNA- <i>assembly</i> .....	20

2.2.9	TA-Klonierung .....	22
2.2.10	Klonierung in pMAL-p5X oder pMAL-c5X .....	23
2.2.11	Proteinexpression in BL21(DE3) .....	23
2.2.12	Bakterienernte .....	23
2.2.13	Ultraschall-Zellaufschluss .....	24
2.2.14	Chromatische Aufreinigung der MBP-ED3- Fusionsproteine .....	24
2.2.15	Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung der Fusionsproteine .....	25
2.2.16	SDS-PAGE .....	26
2.2.17	Antigen-ELISA .....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Sequenzvergleich zur Bestimmung einer Konsensus-Sequenz für die ED3-Region der Dengueviren 1 bis 4 .....	28
3.2	Klonierung der MBP-ED3-Fusionsproteine .....	31
3.3	Affinitätschromatische Reinigung von MBP-ED3-Fusionsproteinen .....	38
3.4	Nachweis Serotyp-spezifischer Antikörper mit MBP-ED3-Fusionsproteinen.....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Auswahl der kolumbianischen ED3-Antigene für den ELISA .....	52
4.2	Antikörper-Antigen Spezifität .....	53
4.3	Antikörper Nachweis in Impfstudien.....	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	57
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	59
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	
7.1	Denguesequenzen (GenBank-Nummern und Herkunftsländer).....	62
7.1.1	DENV-1 Sequenzen.....	62
7.1.2	DENV-2 Sequenzen.....	63
7.1.3	DENV-3 Sequenzen.....	64
7.1.4	DENV-4 Sequenzen.....	65
7.2	Klonierungsvektor pCR2.1 .....	66
7.3	Klonierungsvektor pMAL-c5x .....	67

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Ausbeuten der MBP-ED3-Fusionsprotein Expression in BL21 (DE3).....	39
---------	--	----

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Aufbau und Struktur des Denguevirus .....	2
Abb. 2	Verlauf der Virämie und Antikörpertiter bei DENV-Infektionen .....	3
Abb. 3	Struktur des E-Protein-Homodimers .....	5
Abb. 4	Neutralisierende humane DENV-spezifische Antikörperantwort nach einer primären oder sekundären DENV-Infektion .....	7
Abb. 5:	Sequenzvergleich der E-Protein ED3-Regionen von DENV-1-4.....	29
Abb. 6:	Sequenzvergleich der ED3-Regionen von kolumbianischen Dengueviren mit der ED3-Konsensus-Sequenz .....	30
Abb. 7:	Strategie der ED3-Klonierung .....	32
Abb. 8:	Expressionsvektor pMAL-c5x.....	33
Abb. 9:	Ergebnisse der <i>assembly</i> -PCR .....	35
Abb. 10:	Klonierung in pMAL-c5x .....	36
Abb. 11:	Sequenzen der ED3-Klone .....	37
Abb. 12:	Vergleich der Expression von ED3 <sup>3</sup> in pMAL-p5x und pMAL-c5x.....	39
Abb. 13:	Expression von ED3-Antigenen für DENV-1-4 in pMAL-c5x.....	40
Abb. 14:	Vergleich der ED3-Antigensequenzen .....	41
Abb. 15:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-1 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 343). .....	44
Abb. 16:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-1 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 14). .....	45
Abb. 17:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-1 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 364). .....	46
Abb. 18:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-2 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 108). .....	47
Abb. 19:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-2 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 19). .....	48

Abb. 20:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-3 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 272). .....	49
Abb. 21:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-4 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 74). .....	50
Abb. 22:	DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-4 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 348). .....	51

## Abkürzungen

bp	Basenpaare
DENV	Denguevirus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED1, -2, -3	Domäne 1, -2, -3 des Denguevirus-Hüllproteins E
ED3 <sup>1, -2, -3, -4</sup>	ED3 Antigen des DENV-1, -2, -3, -4
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
E-Protein	Hüllprotein des Denguevirus
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ-1
IgG IgM	Immunglobulin G bzw. M Antikörper
kb	Kilobasenpaare
MBP	Maltose-bindendes Protein
OD	Optische Dichte
prM	Vorläufer des Denguevirus M-Proteins
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (DNA-Polymerase)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## Nukleobasen

A Adenin  
C Cytosin  
G Guanin  
T Thymin

## Aminosäuren

A Ala Alanin  
C Cys Cystein  
D Asp Aspartat  
E Glu Glutamat  
F Phe Phenylalanin  
G Gly Glycin  
H His Histidin  
I Ile Isoleucin  
K Lys Lysin  
L Leu Leucin  
M Met Methionin  
N Asn Asparagin  
P Pro Prolin  
Q Gln Glutamin  
R Arg Arginin  
S Ser Serin  
T Thr Threonin  
V Val Valin  
W Trp Tryptophan  
Y Tyr Tyrosin



# 1 Einleitung

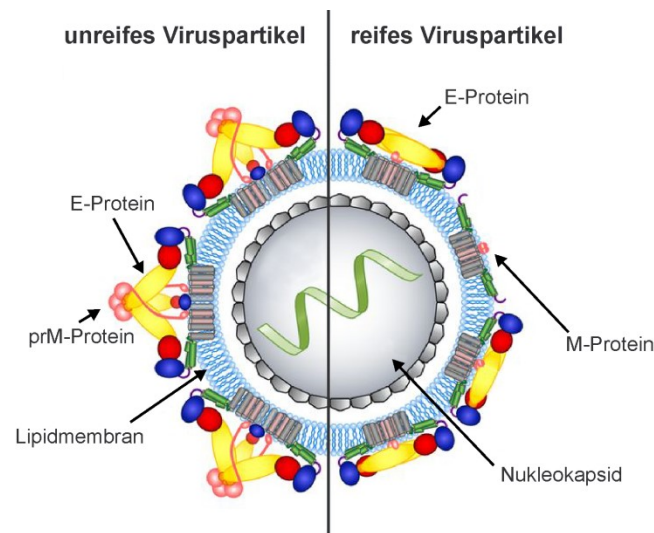
## 1.1 Das Denguevirus

Denguevirus wird der Familie *Flaviviridae* zugeordnet, genauer der Gattung Flavivirus. Andere Vertreter dieser Gattung sind beispielsweise das Gelbfieberevirus und das Zikavirus. Weiterhin lässt sich das Denguevirus in vier Serotypen unterteilen (DENV1-4). Das Genom des DENV besteht aus einem (+)RNA-Einzelstrang, welcher ca. 10700 Basenpaare lang ist und ein offenes Leseraster besitzt. Der RNA-Einzelstrang codiert für ein Polyprotein, welches aus drei Struktur- und sieben Nichtstrukturproteinen besteht. Die drei Strukturproteine werden Kapsid (C), Hüllprotein (E) und prä-Membran-Protein (prM), bzw. Membran-Protein (M) genannt (Abb. 1) (Patterson, Sammon, & Garg, 2016).

Das Kapsid ist ein hochbasisches Protein mit einer Größe von 12 kDA, welches eine Proteinhülle um die virale RNA formt. Über die Bindung an die RNA fungiert das Kapsid zudem auch als Chaperon für die RNA und verhindert so eine Fehlfaltung der RNA. Der positive RNA-Einzelstrang bildet zusammen mit mehreren Kapsid-Proteinen den Kern des Virions, genannt Nukleokapsid. Das Nukleokapsid ist von einer Lipid-Doppelschicht umgeben, in welche prä-Membran-Proteine im unreifen bzw. Membran-Proteine im reifen Zustand und Hüllproteine eingebettet sind (Byk & Gamarnik, 2016). Die Viruspartikel weisen eine sphärische Form auf und besitzen einen Durchmesser von ca. 50 nm.

Ein Dengue-Virion trägt insgesamt 180 Kopien des Hüllproteins auf seiner Oberfläche, welche entweder zu 90 dichtgepackten Dimeren im reifen Zustand oder zu Trimeren im unreifen Zustand angeordnet sind. Durch die unterschiedliche Anordnung der Hüllproteine im reifen und unreifen Zustand, weist das Dengue-Virion im reifen Zustand eine sogenannte glatte und im unreifen Zustand eine raue Oberfläche auf, verursacht durch herausragende Spitzen der Hüllprotein-Trimere und der Abdeckung der Fusionsregion durch das prM-Protein (siehe Abb. 1) (Wahala & Silva, 2011). Die Dimerisierung des Hüllproteins wird von der Domäne 2 (ED2) vermittelt, das Hüllprotein besteht aus insgesamt drei Domänen (Auerswald, 2016). Domäne 1 (ED1) ist die zentrale Domäne und trägt Virus-spezifische und kreuzreaktive Antikörperbindende Epitope. Domäne 2 (ED2) beinhaltet die Fusionsschleife und bewirkt die Fusion der Wirtszell- mit der Virusmembran. Domäne 3 (ED3) weist eine Immunglobulin-artige Struktur auf (Ramanathan *et al.*, 2016) und ist die Bindungsstelle für den Zellrezeptor der Wirtszellen (Wahala & Silva, 2011).

Dengueviren infizieren Zellen über Endozytose, d. h. sie binden an einen bisher unbekanntem Zellrezeptor auf den Wirtszellen, werden so in die Zelle transportiert und fusionieren dann mit der Wirtszell-Membran. Dadurch gelangt die virale RNA (vRNA) in das Cytoplasma der Wirtszelle. Nach der Vervielfältigung der viralen RNA lesen die Ribosomen der Wirtszelle die vRNA ab und synthetisieren ein Polyprotein, welches von viralen und zellulären Proteasen zu den drei Struktur- und sieben Nichtstrukturproteinen prozessiert wird. Die viralen Nichtstrukturproteine replizieren das virale Genom, welches mit den Strukturproteinen an der Membran des endoplasmatischen Retikulums zu unreifen Viruspartikeln zusammengefügt wird. Die virale Doppel-Lipidmembran stammt hierbei von der Membran des endoplasmatischen Retikulums ab. Die Reifung der Viruspartikel erfolgt im trans-Golgi-Netzwerk (Tuiskunen Bäck & Lundkvist, 2013), indem zelluläre Proteasen die prM-Proteine zu M-Proteinen spalten, wodurch sich die E-Proteine zu Dimeren umlagern. Da infizierte Zellen neben reifen Viruspartikeln auch unreife und partiell-reife Viruspartikel ausschütten, wird davon ausgegangen, dass der Reifungsprozess nicht vollständig ist, jedoch können partiell-reife und sogar unreife Viruspartikel unter bestimmten Bedingungen ebenfalls infektiös sein (Wahala & Silva, 2011).

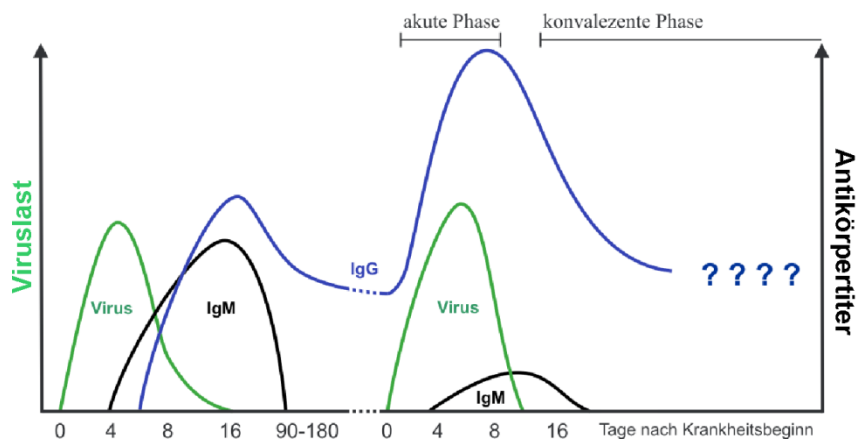


**Abb. 1 Aufbau und Struktur des Denguevirus**

Rosa, prM und M; Rot, ED1; Gelb, ED2; Blau, ED3; Grün, vRNA

## 1.2 Die humorale Immunantwort gegen die Denguevirus-Hüllproteine

Die humorale Immunantwort bei einer primären Infektion unterscheidet sich von der einer sekundären Infektion. Bei einer primären Dengue-Infektion beginnt ca. 4-5 Tage nach Fieberbeginn die Bildung von IgM-Antikörpern (Wahala & Silva, 2011). Diese weisen jedoch meistens einen niedrigen Titer auf (Auerswald, 2016), welcher für ca. 2-3 Monate nachweisbar ist. Eine Woche nach Fieberbeginn setzt auch die Bildung von IgG-Antikörpern ein. Der IgG-Titer ist höher und hält wochenlang an, bevor der Antikörper-Titer etwas absinkt. Diese IgG-Immunantwort besteht dann über Dekaden hinweg (Wahala & Silva, 2011). Sekundäre Infektionen zeichnen sich durch einen deutlich schnelleren und höheren Anstieg des IgG-Antikörper-Titers aus. So können bereits am ersten Tag, an dem Symptome auftreten, IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Die IgM-Antwort variiert in sekundären Infektionen, die Gründe hierfür sind bisher noch nicht bekannt. Die schnellere und höhere IgG-Immunantwort ist auf die Stimulierung von Gedächtnis-B-Zellen zurückzuführen, welche während der primären Infektion angelegt wurden (Wahala & Silva, 2011).

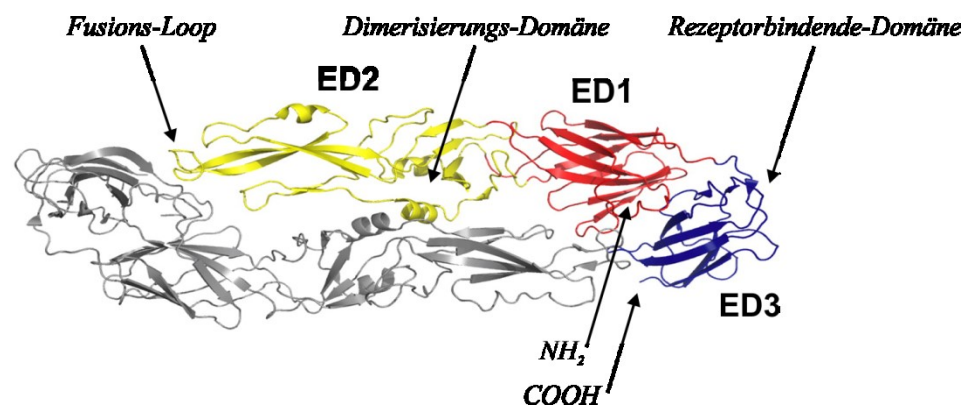


**Abb. 2 Verlauf der Virämie und Antikörpertiter bei DENV-Infektionen**

DENV-infizierte Mücken übertragen das DENV auf den Menschen. Die erste Form der humoralen Immunantwort ist die Ausbildung von IgM-Antikörpern. Eine weitere Differenzierung führt zur Bildung einer IgG-Immunantwort, welche eine bleibende Immunität gegen das spezielle DENV verursacht. In der akuten Phase der sekundären Infektion kommt es zum Anstieg der IgG-Antikörper. Die IgM-Immunantwort fällt schwach aus, was als ein diagnostischer Marker zur Differenzierung von primärer und sekundärer DENV-Infektion benutzt wird.

Symptomatische sekundäre Infektionen sind in der Regel heterologe Infektionen, d. h. Infektionen mit einem anderen Serotyp als in der primären Infektion, da eine überstandene Infektion mit einem bestimmten DENV-Serotyp vor homologen Infektionen schützt (Wahala & Silva, 2011). Homologe Reinfektionen wurden jedoch ebenfalls beobachtet (Chaudhury *et al.*, 2017). Zudem treten sekundäre Infektionen in der Regel nicht direkt nach der primären Infektion auf, da man nach überstandener Infektion mit Dengue kurzfristig (2-3 Monate) auch Immunität gegen die anderen Serotypen besitzt. Symptomatische tertiäre und quaternäre (heterologe) Infektionen sind zwar selten (Wahala & Silva, 2011), unterscheiden sich allerdings nicht von sekundären und werden daher zum Teil auch als sekundäre Infektionen bezeichnet (Auerswald, 2016). Bei einer zweiten Infektion mit Dengue oder bei Säuglingen mit abnehmender, mütterlicher Anti-Dengue-Immunität, ist das Risiko schweres Dengue-Fieber zu bekommen deutlich höher. Dies wird auf eigene Antikörper der infizierten Person zurückgeführt, sogenannte infektionsverstärkende Antikörper. Dieses Phänomen wird als die Antikörper-vermittelte Verstärkung (*antibody dependant enhancement*, kurz ADE) einer Infektion bezeichnet (Flipse *et al.*, 2016). Demnach kann die Bindung von schwach-neutralisierenden Antikörpern von der primären Infektion bei der sekundären Infektion die Infektion von FcγR-tragenden Zellen (z. B. Makrophagen) verstärken, wodurch eine erhöhte Virusproduktion ermöglicht wird (Wahala & Silva, 2011). Die infektionsverstärkende Wirkung konnte *in vivo* und *in vitro* sowohl bei heterotypischen, sub-neutralisierenden Antikörpern, als auch bei niedrigen Konzentrationen von homotypischen Antikörpern beobachtet werden (Flipse *et al.*, 2016). Die Antikörper unterscheiden sich in ihrer Spezifität und werden dementsprechend in Serotyp-spezifische und kreuzreaktive Antikörper unterteilt. Während Serotyp-spezifische Antikörper nur gegen einen bestimmten DENV-Serotyp wirksam sind, sind kreuzreaktive Antikörper auch gegen andere Serotypen wirksam (Chaudhury *et al.*, 2017). Zum Teil sind die kreuzreaktiven Antikörper nicht nur gegen Dengueviren wirksam, sondern auch gegen andere Viren aus der Flavivirus-Gruppe (Wahala & Silva, 2011) und zum Teil sogar gegen Alphaviren (Shamala, 2015). Die Kreuzimmunität ist auf gleiche Epitome zurückzuführen (Wahala & Silva, 2011). Ein weiterer Unterschied in der humoralen Immunantwort zwischen primären und sekundären Infektionen ist, dass sich die Immunantwort bei primären Infektionen gegen andere Epitome richtet, als bei sekundären Infektionen, wodurch die Immunantwort bei primären Infektionen Serotyp-spezifischer und kreuzreaktiver als bei sekundären Infektionen ist (Chaudhury *et al.*, 2017).

Allgemein richten sich Antikörper nach primären Dengue-Infektionen vorwiegend gegen Epitope, die auf dem Hüllprotein, dem prM-Protein und dem Nichtstrukturprotein 1 (NS1) vorkommen (Auerswald, 2016). Nach sekundären Infektionen bilden sich Antikörper verstärkt gegen die Fusionsschleife und ED2-Dimerisierungs-Region. Ein Teil der Epitope, gegen die sich die Antikörper einer sekundären Infektion richten, werden mit schlechter Neutralisierung und somit auch mit ADE in Verbindung gebracht (Chaudhury *et al.*, 2017). Neutralisierende Antikörper, die Serotyp-spezifisch reagieren, sind effektiv und gegen Teile des E-Proteins gerichtet. Dabei spielen die ED3-gerichteten Antikörper eine besondere Rolle, da sie Schutz vor Infektionen bewirken können (Capeding *et al.*, 2014; Fahimi, Sadeghizadeh, Hassan, Auerswald, & Schreiber, 2018). Insgesamt macht die E-spezifische, Serotyp-spezifische Immunantwort 1 % der Gesamtantwort aus (Wanwisa Dejnirattisai *et al.*, 2010).



**Abb. 3 Struktur des E-Protein-Homodimers**

Das DENV E-Protein unterteilt sich in drei wesentliche Domänen, ED1, ED2 und ED3. ED2 (gelb) exponiert an seiner Spitze den Fusions-Loop, der sich in die Membran der Wirtszelle integriert. ED2 trägt zusätzlich die Dimerisierungs-Domäne für die Bildung des E-Protein Homodimers. ED3 (blau) hat die Rezeptorbindende Funktion. Da ED3 direkt an die ED1-Sequenz anschließt und linear codiert ist, können MBP-ED3-Fusionsproteine einfach kloniert werden. Die Abbildung stammt aus der Veröffentlichung Wahala, 2012 und wurde modifiziert (Wahala, Huang, Butrapet, White, & de Silva, 2012).

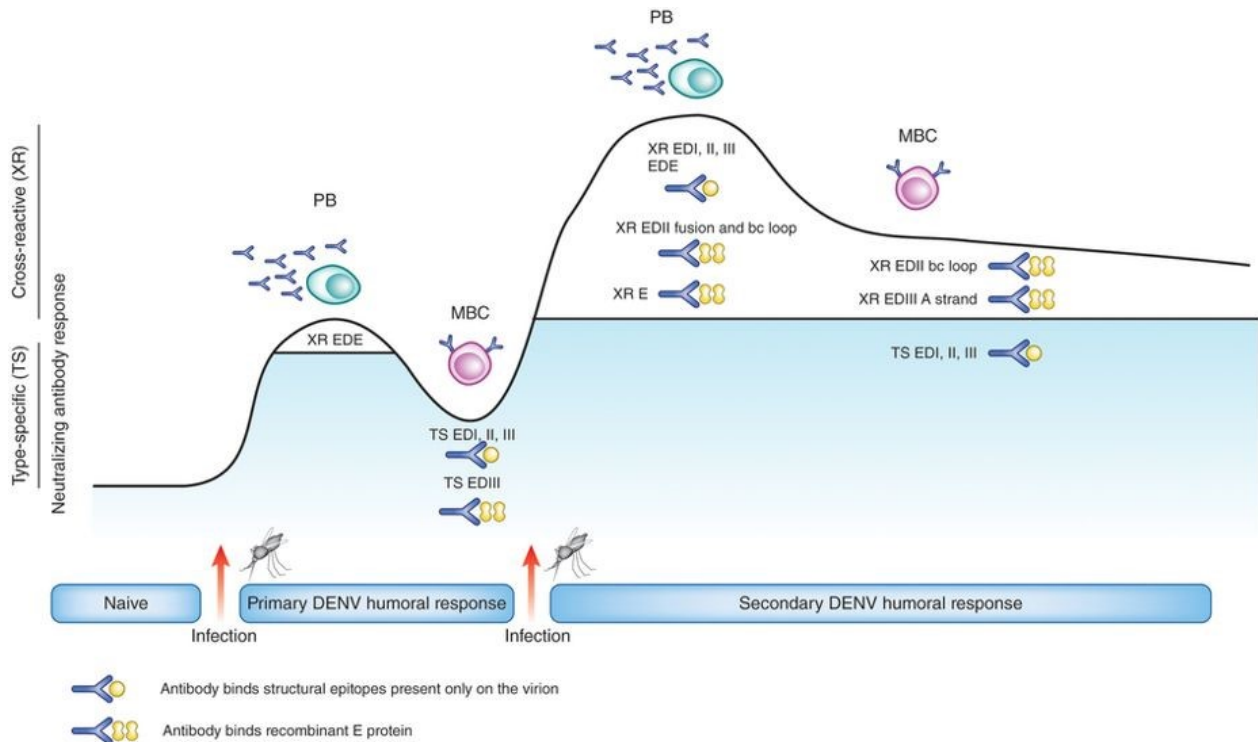
### 1.3 Die serologische Denguevirus-Diagnostik

Dengue-Infektionen können entweder direkt virologisch oder indirekt serologisch nachgewiesen werden. Bei der virologischen Diagnostik werden die Patientenproben auf virale RNA oder das NS1-Antigen getestet, während bei der serologischen Diagnostik Blutproben (Auerswald, 2016) oder auch Speichelproben (Shamala, 2015) auf Dengue-spezifische Antikörper getestet werden. Die virologische Diagnostik kann nur während der virämischen, akuten Phase zur Bestimmung einer Dengue-Infektion angewandt werden, dagegen kann mit der serologischen Diagnostik auch in der konvaleszenten Phase noch eine Dengue-Infektion nachgewiesen werden.

In der serologischen Diagnostik werden in der Regel IgM-Antikörper und IgG-Antikörper erfasst, hierbei sind IgM-Antikörper ein Indiz für eine aktuelle Infektion, während hohe IgG-Antikörpertiter auch auf frühere DENV-Infektionen zurückzuführen sein können (Shamala, 2015). Das Verhältnis von IgM-Antikörpern zu IgG-Antikörpern kann als Marker zur Unterscheidung primärer und sekundärer Infektionen verwendet werden (Beatty *et al.*, 2010).

Da die Antikörper auch nach der Infektion noch im Körper persistieren, kann einerseits die Diagnose zeitlich flexibler erfolgen und der Patient auch noch Wochen nach der überstandenen Infektion auf eine Infektion mit Dengue getestet werden, andererseits können serologische Tests falsch-positive Ergebnisse durch vergangene Dengue-Infektionen zeigen, was die Diagnose der akuten Krankheit erschwert (Klei, 1986). IgM-Antikörper werden zwar beispielsweise als Indiz für eine akute Dengue-Infektion bestimmt, der IgM-Titer sinkt allerdings erst nach 2 bis 3 Monaten auf ein nicht-detektierbares Level (Klei, 1986).

Nachteil der serologischen Diagnostik ist, dass die Antikörper erst im Laufe der Krankheit gebildet werden und somit eine Dengue-Infektion erst ein paar Tage nach Fieberbeginn serologisch diagnostiziert werden kann. IgM-Antikörper sind beispielsweise erst 5 Tage nach Fieberbeginn nachweisbar. Da IgA-Antikörper früher als IgM- und IgG-Antikörper auftreten, werden auch IgA-Antikörper in der Dengue-Diagnostik zum Nachweis einer Infektion bestimmt. Diese sind auch im Speichel nachweisbar, sodass der Test nicht-invasiv durchgeführt werden kann (Shamala, 2015). Weitere Probleme der serologischen Dengue-Diagnostik werden durch die Kreuzreaktion von Dengue-Antikörpern mit Antikörpern anderer Serotypen und sogar anderen Flaviviren hervorgerufen, wodurch die Auswertung der serologischen Tests zum Teil nur eine akute Flavivirus-Infektion anzeigt, ohne eine Spezifizierung des Flavivirus (Klei, 1986).



**Abb. 4 Neutralisierende humane DENV-spezifische Antikörperantwort nach einer primären oder sekundären DENV-Infektion**

Zur Studie der Serotyp-spezifischen neutralisierenden Antikörper wurden humane monoklonale Antikörper (mAb) aus Plasma-B-Zellen (PB) und *memory*-B-Zellen (MBC) untersucht. XR, Serotyp-kreuzreagierende neutralisierende Antikörper (obere weiße Fläche); TS, Serotyp-spezifische neutralisierende Antikörper (untere blaue Fläche). Die nicht-neutralisierende Antikörperantwort ist nicht dargestellt. Untersuchungen ergaben, dass es in Patienten sowohl Serotyp-spezifische mAbs gegen die ED3 (EIII)-Region in Form rekombinanter Antigene gibt, als auch Serotyp-spezifische mAbs gegen Epitope, die so nur auf dem intakten Viruspartikel vorkommen (TS EDIII) (de Alwis et al., 2012; Fibriansah et al., 2014; Gromowski et al., 2010). Die Abbildung wurde mit Erlaubnis des Verlags Springer Nature aus dem Journal Nature Immunology übernommen (Coloma & Harris, 2015).

Zu den in der serologischen Dengue-Diagnostik verwendeten Methoden gehört der Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA), der Fluoreszenz-Antikörpertest (IFA), die Analyse der Hämagglutinationsinhibition (HI) und der Neutralisationstest (NT). Zur Bestimmung von Serotyp-spezifischen Antikörpern wurden Nachweisverfahren basierend auf der E-Protein Domäne 3 (ED3) publiziert, die eine Korrelation zum Neutralisationstest zeigten (Libraty, Zhang, Obcena, Brion, & Capeding, 2015a; Premkumar *et al.*, 2017). Allerdings zeigen die ED3-Antigene nicht nur eine Serotyp-Spezifität. Es wird vermutet, dass ED3 sehr typenspezifisch reagiert und somit auch Immunantworten innerhalb einer Serotyp-Gruppe unterschieden werden können. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit ED3-Antigene hergestellt werden, die den Sequenzen von Virusisolaten aus Kolumbien entsprechen, da eine Sammlung DENV-positiver Seren aus Kolumbien für diese Arbeit zur Verfügung stand. In Abbildung 4 ist der aktuelle Stand der Spezifität der anti-DENV Immunantwort nach primärer und sekundärer Infektion zusammengefasst (Coloma & Harris, 2015). Serotyp-spezifische Antikörper finden sich sowohl gegen rekombinante als auch virale ED3-Strukturen. Frage ist, ob eine bessere Erkennung der Antigene erreicht wird, wenn Antigen-Strukturen eingesetzt werden, die möglichst genau den Sequenzen der Viren entsprechen, die in den endemischen Regionen vorherrschen aus denen auch die Patienten stammen.

#### **1.4 Ziele der Arbeit**

Die Variation der Dengue-Hüllproteine und besonders die Variation in der Rezeptor-bindenden Domäne ED3 verursacht eine komplexe Immunantwort im Menschen, wobei es bisher nicht geklärt ist, wie typenspezifisch die humorale Immunantwort gegen die ED3-Region ist. Daher sollen ED3-Antigene hergestellt werden, die DENV-Serotypen entsprechen, die in der Region endemisch sind aus der die zu untersuchenden Serumproben von DENV-infizierten Personen stammen.

Das erste Ziel der Arbeit war daher, aus den in der Datenbank vorhandenen Aminosäuresequenzen der vier Dengue-Serotypen, DENV-1-4, eine Konsensus-Sequenz für die Domäne 3 (ED3) des E-Proteins zu ermitteln. Als nächstes sollte anhand der Sequenzanalyse für jeden DENV-Serotyp eine ED3-Sequenz ermittelt werden, die sich möglichst weit von dem Konsensus unterscheidet und repräsentativ für kolumbianische Dengueviren ist.



Das zweite Ziel war die DNA-Synthese der ausgewählten ED3-Sequenzen. Dafür sollte die Methode der *assembly*-PCR eingesetzt werden. Anhand der DNA-Sequenz sollte mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide das entsprechende DNA-Fragment hergestellt werden. Durch PCR-Amplifikation mit spezifischen Oligonukleotid-Primern sollten an die Enden der DNA-Fragmente die Schnittstellen, BamHI und HindIII, für die Klonierung angefügt werden.

Das dritte Ziel der Arbeit war es, die synthetisierten DNA-Fragmente in die Expressionsvektoren pMAL-p5X und pMAL-c5X einzufügen. Hierfür sollte die aufgereinigte DNA zuerst in den pCR2.1-Vektor kloniert werden. Die entsprechenden Klone sollten durch DNA-Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden. Das kontrollierte ED3 DNA-Fragment für DENV-1-4 (ED3<sup>1</sup>, ED3<sup>2</sup>, ED3<sup>3</sup>, ED3<sup>4</sup>) sollte dann als BamHI/HindIII geschnittenes DNA-Fragment in die Expressionsvektoren kloniert werden. Ziel war die Herstellung von Klonen, die die ED3-Domäne als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindendem-Protein (MBP) exprimieren. Die MBP-ED3-Fusionsproteine sollten aus dem Lysat der Bakterien affinitätschromatografisch mit Hilfe einer Amylose-Matrix aufgereinigt werden.

Das fünfte Ziel der Arbeit war es, die hergestellten und aufgereinigten ED3-Fusionsproteine auf ihre Funktionalität als Antigen mit kolumbianischen Seren von DENV-infizierten Patienten im ELISA zu testen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborausstattung

Tischzentrifuge (Biofuge)	[1] Heraeus
Centrifuge 5810 R	[2] Eppendorf
Avanti Centrifuge J-26 XP mit JA-14 Rotor	[3] Beckman Coulter
UV/VIS Photometer UV160A	Shimadzu
Inkubator GFL 3031	GFL
TC7-Roller-Drum	New Brunswick
CAT RM 5	neoLab
Thermocycler	Eppendorf
Thermomixer compact	Eppendorf
Schüttelkultivator	Memmert
Vortexer	neoLab
Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Wärmeschränke	37 °C, 56 °C
Heizblöcke	37 °C, 42 °C, 72 °C
Kühlschränke	-20 °C, 4 °C

#### 2.1.2 Bakterien

für Plasmidpräparation

DH5 $\alpha$ : lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) supE44 thi-1 gyrA96 relA1

für Proteinexpression

BL21(DE3): fhuA2 (lon) ompT gal ( $\lambda$  DE3) (dcm)  $\Delta$ hsdS  $\lambda$  DE3 =  $\lambda$  sBamHIo  $\Delta$ EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21  $\Delta$ in5

#### 2.1.3 Klonierungsvektoren

pMAL-c5X	cytoplasmatische Expression Ampicillin-Resistenz Sequenzprimer: MBP-F	New England Biolabs
pMAL-p5X	periplasmatische Expression Ampicillin-Resistenz Sequenzprimer: MBP-F	New England Biolabs
pCR2.1	<i>blunt-end</i> -Klonierung Ampicillin-Resistenz Sequenzprimer: M13-29R und M13-21F	invitrogen

#### 2.1.4 Chemikalien

Aceton	Carl Roth
Acrylamid	Carl Roth
Agar	Carl Roth
Agarose	Biozym Scientific
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth
Amylose Resin	New England Biolabs
APS	Merck
Brilliantblau	Carl Roth
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth
D(+)-Maltose-Monohydrat	Carl Roth
ddH <sub>2</sub> O	BNITM / Carl Roth
DMF	Merck
DTT	Thermo Fisher Scientific
NTP's	AB Analytica
EDTA	Carl Roth
Essigsäure	Carl Roth
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Glycerin	Carl Roth
Glucose	Carl Roth
Hefeextrakt	AppliChem
Incidin	EcoLab
IPTG	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
KCl	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth
Na <sub>2</sub> EDTA	Carl Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Natriumchlorid	Carl Roth
Natronlauge	Carl Roth
Salzsäure	Carl Roth
SDS	Carl Roth
TEMED	Merck
Tris-HCl	Carl Roth
Trypton / Pepton aus Casein	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth
X-Gal	PEQLAB Biotechnologie

#### 2.1.5 Sequenzprimer

MBP-F:	5'-GATGAAGCCCTGAAAGACGCGCAG-3'
M13-29R:	5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'
M13-21F:	5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'

## 2.1.6 Enzyme

BamHI	Fermentas
HindIII	Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Lysozym	Sigma-Aldrich

## 2.1.7 Medien

<b>yt-Medium</b>	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	Natriumchlorid
<b>dyt-Medium</b>	16 g	Trypton
	10 g	Hefeextrakt
	5 g	Natriumchlorid
<b>yt-Agar</b>	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	Natriumchlorid
	15 g	Agar

Die Einwaagen wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und zum Autoklavieren gegeben. Ggf. wurden nach dem Abkühlen auf ca. 45 °C hitzeempfindliche Reagenzien hinzugegeben.

### Zusätze für je 1 Liter Medium:

Für die Plasmid-Präparation:  
5 ml Ampicillin (60 mg/ml)

Für die Proteinexpression:  
3,5 ml Ampicillin (60 mg/ml)  
3,0 ml IPTG (100 mM)  
5,0 ml Glucose (40 %)

Für yt-Amp-Platten:  
5,0 ml Ampicillin (60 mg/ml)

Für yt-Amp/IPTG/X-Gal-(OJA)-Platten:  
5,0 ml Ampicillin (60 mg/ml)  
3,0 ml IPTG (100 mM)  
3,0 ml X-Gal (2 %, in DMF)

## 2.1. 8 Puffersysteme und Lösungen

<b>BamHI-Puffer</b>		Fermentas
<b>GC-Puffer</b>		New England Biolabs
<b>T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)</b>		New England Biolabs
<b>10x PBS</b>	2,00 g 80,00 g 26,80 g 2,40 g	KCl NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 800 ml H <sub>2</sub> O lösen mit HCl den pH-Wert auf 7,4 einstellen und dann auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
<b>PBST</b>	1x 0,05 %	PBS Tween 20
<b>Bicarbonat/Carbonat-Puffer</b>	8,40 g 4,00 g	NaHCO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (anhydrid) in 900 ml lösen pH-Wert auf 9,2 - 9,6 einstellen
<b>Laemmli-Puffer</b>	3,03 g 14,40 g 1,00 g	Tris-Base Glycin SDS in 900 ml H <sub>2</sub> O lösen und auf 1000 ml auffüllen.
<b>Bindungspuffer A</b>	2,42 g 11,69 g 0,45 g	Tris NaCl EDTA mit HCl oder NaOH den pH-Wert auf 7,4 einstellen auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen und dann sterilfiltrieren
<b>Elutionspuffer B</b>	2,42 g 11,69 g 0,45 g 3,60 g	Tris NaCl EDTA Maltose mit HCl oder NaOH den pH-Wert auf 7,4 einstellen auf 1 l mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen und dann sterilfiltrieren
<b>Coomassie-Lösung</b>	25 % 10 % 0,05 %	Isopropanol Essigsäure Brillantblau

<b>TAE-Puffer (50x)</b>	242,20 g	Tris
	57,10 ml	Eisessig (100 % Essigsäure)
	18,61 g	Na <sub>2</sub> EDTA*H <sub>2</sub> O

Der pH-Wert sollte bei 8,5 ± 0,2 liegen,  
ggf. mit HCl oder NaOH einstellen  
auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen.

<b>SDS-Ladepuffer (3x)</b>	1,75 ml	Tris 0,5 M (pH = 6,8)
	1,50 ml	Glycerin
	5,00 ml	SDS (10 %)
	0,50 ml	DTT (1 M)
	1,25 ml	Bromphenolblau (0,1 %)

## 2.1.9 Gele

### DNA-Gelelektrophorese

0,8 % Agarose in TAE Puffer + 0,25 µg/ml Ethidiumbromid

### Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

<b>Trenngel 10 %</b>	4 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	3 ml	1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8), 0,31 % SDS
	5 ml	ddH <sub>2</sub> O
	120 µl	10 % APS
	8 µl	TEMED

<b>Sammelgel 4 %</b>	1,06 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	1,6 ml	0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8), 0,61 % SDS
	5,34 ml	ddH <sub>2</sub> O
	150 µl	10 % APS
	9 µl	TEMED

## 2.1.10 Molekulargewichtsstandards

100 bp	DNA-Marker	Fermentas
1 kb	DNA-Marker	Fermentas
170-10 kDa	Protein Marker	Thermo Fisher Scientific

## 2.1.11 Reagenzien-Kits

GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific
QIAquick Gel extraction Kit	QIAGEN
TA Cloning Kit	invitrogen

## 2.1.12 Oligonukleotide für die *assembly-PCR*

Die Oligonukleotide wurden mit dem Programm *Assembly PCR Oligo Maker* berechnet. Für DENV-4 wurde die DNA-Sequenz mit dem *Codon optimization tool* (Integrated DNA Technologies, Inc.) für die Expression in *E. coli* optimiert.

### DENV-1:

Oligo-1: 5'-AAGGGGATGT CATATGTGAT GTGCACAGGC TCATTTAAGC TAGAGAAGGA  
AGTGGCTGAG AC-3'

Oligo-2: 5'-CGCGTCTGTT CCTTCGTATT TGACCTGCAC TAGAACAGTT CCATGCTGGG  
TCTCAGCCAC TTCCTTCTCT-3'

Oligo-3: 5'-ACGAAGGAAC AGACGCGCCA TGCAAGATCC CTTTCTCGAC CCAAGATGAG  
AAAGGAGTGA CCCAGAATG-3'

Oligo-4: 5'-GACTGATTTT TCTTTGTCAG TAACTATGGG ATTGGCTGTT ATCAATCTCC  
CATTCTGGGT CACTCCTTTC-3'

Oligo-5: 5'-GTTACTGACA AAGAAAAATC AGTCAACATT GAGACAGAAC CACCTTTTGG  
TGAGAGCTAC ATCGTGGTAG GGCAG-3'

Oligo-6: 5'-GCTTCCTTTC TTGAACCAGC TTAGTTTCAA GGCTTTTCA CCTGCCCTA  
CCACGAT-3'

Primer *forward* (BamHI): 5'-CACGGATCCAAGGGGATGTCATATGTGATGTG-3'

Primer *reverse* (HindIII): 5'-CACAAGCTTGCTTTCCTTTCTTGAACCAGCT-3'

### DENV-2:

Oligo-1: 5'-TCATACTCTA TGTGTACAGG AAAGTTTAAA ATTGTGAGAG AAATAGCAGA  
AACACAACAT G-3'

Oligo-2: 5'-CATGGAGAAC CGTCCCCTTC ATATTGTATT CTGATAACTA TTGTTCCATG  
TTGTGTTTCT GCTATTTCTC-3'

Oligo-3: 5'-GGGGACGGTT CTCCATGTAA GATCCCTTTT GAAATAACAG ACTTGAAAA  
AAGACACGTC TTAGGTCGC-3'

Oligo-4: 5'-CTATGTTGAC TGGGCTATCT TTTTCTATTA CGATTGGGTT AACTGTAATC  
AGGCGACCTA AGACGTGTCT TTTT-3'

Oligo-5: 5'-AATAGAAAAA GATAGCCCAG TCAACATAGA AGCAGAACCTCC ATTCGGAGAC  
AGCTACATCA TCATAGGAGT AGAG-3'

Oligo-6: 5'-ACTTCCCTTC TAAACCAAT TGAGTTTCAA TTGTCCCGGC TCTACTCCTA  
TGATGATGTA GCTGT-3'

Primer *forward* (BamHI): 5'-CACGGATCCTCATACTCTATGTGTACAGGAAAGTTTAAA-3'

Primer *reverse* (HindIII): 5'-GTGAAGCTTACTTCCCCTCTTAAACCAATTGAGT-3'

### DENV-3:

Oligo-1: 5'-AAGGGGATGA GCTATGCAAT GTGCACGAGT ACCTTTGTGT TG  
Oligo-2: 5'-ATGAGTATTG TCCCATGTTG CGTTTCTGAG ACTTCTTTCT TCAACACAAA  
GGTACTCGTG C-3'  
Oligo-3: 5'-CGCAACATGG GACAATACTC ATCAAGGTCG AGTACAAAGG GGAAGATGTA  
CCTTGCAAG-3'  
Oligo-4: 5'-TGTGAGCTTT CCCTTGTCCA TCCTCTGTGG AGAAAGGAAT CTTGCAAGGT  
ACATCTTCCC C-3'  
Oligo-5: 5'-TGGACAAGGG AAAGCTCACA ATGGCAGACT GATTACAGCC AACCCAGTGG  
TGAATAAGAG-3'  
Oligo-6: 5'-CCAAAAGGAG GTTCAGCCTC AATATTGACA GGCTCCTCCC TCTTAGTCAC  
CACTGGGTTG-3'  
Oligo-7: 5'-TGAGGCTGAA CCTCCTTTTG GGGAAAGTAA TATAGTAATT GGAATTGGAG  
ACAACGCCTT-3'  
Oligo-8: 5'-GCTTCCCTTC TTGTACCAGT TGATTTTCAA GGC GTTGTCT CCAATTCC-3'  
Primer *forward* (BamHI): 5'-CACGGATCCAAGGGGATGAGCTATGCAATG-3'  
Primer *reverse* (HindIII): 5'-GTGAAGCTTGCTTCCCTTCTTGTACCAGTTG-3'

### DENV-4:

Oligo-1: 5'-AAAGGTATGT CTTACACGAT GTGTTCGGGC AAGTTTAGTA TTGATAAAGA  
AATGGCGGAA ACG-3'  
Oligo-2: 5'-GGGGGCTCCC GCCCCTTCGT ATTTGACTTT CACCACTGTC GTTCCGTGCT  
GCGTTTCCGC CATTTCTTTA TC-3'  
Oligo-3: 5'-CGAAGGGGCG GGAGCCCCCT GTAAAGTCCC CATTGAAATT CGGGACGTGA  
ACAAGGAGAA AGTCGTAGG-3'  
Oligo-4: 5'-CTATATTCGT GACACTGTTC GTATTTTCTG CCAGAGGTGT TGCAGAGATC  
ACACGTCCTA CGACTTTCTC CTTGTTC-3'  
Oligo-5: 5'-CGAACAGTGT CACGAATATA GAACTTGAAC CGCCCTTTGG CGACAGCTAT  
ATAATGATAG GGGTGGGC-3'  
Oligo-6: 5'-CGATCCTTTT CTGAACCAAT GAAGGGTTAA TGCAGAATTG CCCACCCCTA  
TCATTATATA GC-3'  
Primer *forward* (BamHI): 5'-CACGGATCCAAGGTATGTCTT-3'  
Primer *reverse* (HindIII): 5'-CACAAAGCTTCGATCCTTTTCTG-3'



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung von Bakterien**

Vor dem Ansetzen der Übernachtskultur wurden die Arbeitsfläche und die Pipettierhilfe mit einem mit Incidin-getränkten Tuch desinfiziert. Während des Ansetzens wurde in Nähe einer Bunsenbrennerflamme gearbeitet. Mit einer sterilen Glaspipette wurden 3 ml Medium in ein Reagenzröhrchen überführt. Hierbei ist zu beachten, dass die Medium-Flasche möglichst kurz offensteht, um die Wahrscheinlichkeit, dass das Medium mit Keimen aus der Luft kontaminiert wird, weiter zu senken. Anschließend wurde mit einem sterilen Glasstäbchen eine Kolonie von der Platte gepickt und das Medium mit dem Glasstäbchen angeimpft. Die Reagenzröhrchen wurden über Nacht auf einer TC7-Roller-Drum bei 37 °C kultiviert.

### **2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen**

Zuerst wurde eine CaCl<sub>2</sub>-Lösung (1 M) angesetzt und durch Sterilfiltration sterilisiert. Die CaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde bei 4 °C gelagert und für die Herstellung einer 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung verwendet. Medium (100 ml yt) wurde mit 1 ml Übernachtskultur (2.2.1, DH5α oder BL21(DE3) in 3 ml yt-Medium) angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm im Inkubator geschüttelt bis die optische Dichte der Kultur bei der Wellenlänge 600 nm einen Wert von 0,3 - 0,5 erreicht hatte. Im Anschluss daran wurde die Bakterien-Suspension bei 4 °C und 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert (50 ml Falconröhrchen, Rotor FA45-6-30, Eppendorf). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die beiden Bakteriensedimente wurden vereinigt und in 50 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (50 mM) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment wurde in 2-3 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung (50 mM) resuspendiert und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.3 Hitzeschock-Transformation**

Um die Kühlkette nicht zu unterbrechen, wurde das Reaktionsgefäß, in welchem die Zellen transformiert wurden, zuvor auf Eis gelagert. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente DH5α-Bakterien mit der Plasmid-DNA (2 µl Plasmid/10-20 µl Ligationsansatz) in das gekühlte Reaktionsgefäß pipettiert. Die kompetenten Bakterien wurden mit der Plasmid-DNA für 30 Minuten auf dem Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 Sekunden bei

42 °C einem Hitzeschock unterzogen, bevor sie für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Danach wurde 1 ml yt-Medium nahe der Bunsenbrennerflamme hinzugefügt und die Bakterien wurden für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 8000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Bakteriensediment wurde in dem restlichen Überstand (ca. 100 µl) durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf einer yt-Amp-Platte mit einem Glasstab ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Platten im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.4 Plasmid-Präparation**

Für die Plasmid-Präparation wurden 3 ml Übernachtskultur (2.2.1) mit dyt-Amp-Medium angesetzt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft, welche das aufzureinigende Plasmid trägt. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und das Plasmid aus dem Bakteriensediment unter Verwendung des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Fisher Scientific) nach Anleitung des Herstellers durch Verwendung einer DNA-bindenden Filtersäule aufgereinigt. Das DNA-haltige Eluat wurde anschließend für 10 Minuten bei 72 °C inkubiert und bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.5 Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen**

Alle Verdauungsansätze wurden für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Enzyme für 10 Minuten bei 72°C inaktiviert. Für den HindIII- und BamHI-Doppelverdau wurden folgende Reaktionen angesetzt:

HindIII/BamHI-Doppelverdau von pMAL-p5X oder pMAL-c5X:

10 µl	pMAL-p5X oder pMAL-c5X (ca. 1 µg/µl)
10 µl	BamHI-Puffer (10x)
0,5 µl	BamHI (10 U/µl)
0,5 µl	HindIII (10 U/µl)
79 µl	ddH <sub>2</sub> O

HindIII/BamHI-Doppelverdau von pCR2.1:

50 µl	pCR2.1 (ca. 1 µg/µl)
10 µl	BamHI-Puffer (10x)
0,5 µl	BamHI (10 Units/µl)
0,5 µl	HindIII (10 Units/µl)
39 µl	ddH <sub>2</sub> O

### **2.2.6 Gelelektrophorese**

Für das Gel wurden 1,6 g Agarose eingewogen und 200 ml TAE-Puffer hinzugegeben. Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde die Agarose in Lösung gebracht und bei 56 °C gelagert. Zum Gießen des Gels wurden die Enden eines Gelschlittens mit Klebeband abgedichtet und auf einen Gießtisch platziert. Zuvor wurde mit einer Wasserwaage sichergestellt, dass der Gießtisch flach liegt, ggf. wurden hierfür die Stützen über die Rädchen des Gießtisches verstellt. Auf dem Gelschlitten wurde 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (2,5 mg/ml) mit einer Pipette verteilt. Anschließend wurde die Agaroselösung zugegeben und der Gelkamm eingesteckt. Nachdem das Gel geliert war, wurden die Klebebänder und der Kamm entfernt. Das Gel wurde samt Gelschlitten in die Gelkammer gelegt, welche mit TAE-Puffer gefüllt wurde, ggf. wurde TAE-Puffer nachgefüllt bis das Gel mit Puffer bedeckt war und sich keine Luft mehr in den Geltaschen befand. Vor dem Beladen wurden fünf Teile Probe mit einem Teil Ladepuffer (6-fach) gemischt. Zum Auswerten der DNA-Fragmente wurden zusätzlich DNA-Marker verwendet. Die Proben wurden bei 230 mA und 100 V für 45 Minuten aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht durchleuchtet und die dadurch sichtbaren DNA-Banden wurden fotografiert. Beim Ausschneiden von DNA-Banden wurde das Gel im Anschluss zur Kontrolle erneut fotografiert. Das ausgeschnittene Gelstück wurde bei -20 °C gelagert.

### **2.2.7 DNA-Gelextraktion**

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegel erfolgt mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Anleitung des Herstellers QIAGEN. Das ausgeschnittene Gelstück wurde zuerst aufgetaut und in QG-Puffer gelöst. Die gelöste DNA wurde auf eine Säule aufgetragen, welche DNA absorbiert. Die Säule wurde anschließend gewaschen. Für die Elution der DNA wurden 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O verwendet.

### 2.2.8 DNA-assembly

Bei der Methode des DNA-assembly wird aus zum Teil überlappenden Oligonukleotiden ein doppelsträngiges DNA-Fragment hergestellt. Die Methode gliedert sich in zwei Schritte: die Hybridisierung, bei der die Oligonukleotide sich aneinanderlagern und eine anschließende PCR mit endständigen Primern, bei der das DNA-Fragment vervielfältigt wird.

**PCR-assembly:** Im ersten Schritt des DNA-assembly wurden die entsprechenden Oligonukleotide hybridisiert. Hierfür werden die Oligonukleotide (100 µM) 1:10 verdünnt. Mit den verdünnten Oligonukleotiden wurde folgende 30 µl Reaktion angesetzt:

6 µl	GC-Puffer (5-fach, enthält MgCl <sub>2</sub> )
1,95 µl	Oligo-1
1,95 µl	Oligo-2
1,95 µl	Oligo-3
1,95 µl	Oligo-4
1,95 µl	Oligo-5
1,95 µl	Oligo-6
0,6 µl	dNTP's (10 mM)
0,3 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen auf 30 µl	

Der assembly-Ansatz wurde dann in fünf Reaktionsgefäße zu je 5 µl aufgeteilt. Für die fünf Ansätze wurden verschiedene Temperaturen während der annealing-Phase über einen Gradienten getestet, um die optimale annealing-Temperatur für die Oligonukleotide herauszufinden.

#### PCR-Programm des assembly:

98 °C	7:00 min	
98 °C	1:30 min	} 10 Zyklen
* °C	2:00 min	
72 °C	2:00 min	
72 °C	5:00 min	
12 °C	(on hold) ∞	
*: 45-65 °C		

**PCR-Amplifikation:** Als DNA-Polymerase wurde für die PCR eine *Taq*-DNA-Polymerase verwendet, da die *Taq*-DNA-Polymerase einen 3'-Adenin-Überhang erzeugt und zum Klonieren ein TA-Vektor (pCR2.1) verwendet wurde. Das synthetisierte DNA-Fragment wurde mit der Methode der Gelelektrophorese aufgereinigt und zum Sequenzieren in den TA-Vektor kloniert. Für die *assembly*-PCR wurde folgende Reaktion angesetzt:

20 µl	5x GC-Puffer (enthält MgCl <sub>2</sub> )
5 µl	Primer <i>for</i>
5 µl	Primer <i>rev</i>
2 µl	dNTP's (10 mM)
1 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)

mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen auf 100µl

Jeweils 19,6 µl der PCR-Mischung wurden auf fünf Reaktionsgefäße aufgeteilt und 0,4 µl *template* hinzugegeben. Die *annealing*-Temperatur der fünf Ansätze entsprach hierbei der des jeweiligen *templates*. Nachdem die optimale *annealing*-Temperatur bestimmt wurde, wurden die 2 µl *template* direkt zum Ansatz hinzugegeben und der Ansatz wurde für die PCR nicht weiter aufgeteilt.

**PCR-Programm der Amplifikation:**

98 °C	3:00 min	
98 °C	0:50 min	} 45 Zyklen
* °C	1:00 min	
72 °C	2:00 min	
72 °C	7:00 min	
12 °C	( <i>on hold</i> ) ∞	

\*: 45-65 °C

### 2.2.9 TA-Klonierung

Nachdem das DNA-Fragment aus der *assembly*-PCR, nach Gelelektrophorese und Gelextraktion, aufgereinigt worden war, wurde es mit Hilfe des TA-Cloning Kits (Invitrogen) in den pCR2.1-Vektor kloniert. Im ersten Schritt wurde die benötigte Menge an PCR-Produkt mit folgender Formel bestimmt:

$$x \text{ ng PCR – Produkt} = \frac{y \text{ bp (Größe PCR–Produkt)} \cdot (50 \text{ ng pCR@ 2.1–Vektor})}{3900 \text{ bp (Größe des pCR@ 2.1–Vektors)}}$$

y: 306 bp für Domäne 3 des E-Proteins (ED3)

x: PCR-Produkt für die Ligation

Die DNA-Konzentration des PCR-Produkts wurde anhand der Bandenintensität im Vergleich zur Bandenintensität des DNA-Markers abgeschätzt. Hierfür wurde ein Teil der aufgereinigten Probe neben dem 100 bp-DNA-Marker auf ein Agarosegel aufgetragen und durch die Methode der Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Banden im 100 bp-Marker entsprechen jeweils 0,5 µg. Für die Klonierung wurde folgende Reaktion in Σ 10 µl angesetzt:

x ng	aufgereinigtes PCR-Produkt
2 µl	5 x T4 DNA Ligase-Puffer
2 µl	pCR2.1 Vektor (25 ng/µl)
mit ddH <sub>2</sub> O auf 9 µl auffüllen	
1 µl	ExpressLink T4 DNA Ligase (5 U/µl)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und am folgenden Tag (ohne Inaktivierung) zur Transformation verwendet. Die transformierten Bakterien wurden für die Blau-Weiß-Selektion auf OJA-Platten ausgestrichen. Mit weißen Kolonien wurden Übernachtskulturen für die Plasmid-Präparation angesetzt und das aufgereinigte Plasmid wurde zur Kontrolle der inserierten DNA sequenziert.

### **2.2.10 Klonierung in pMAL-p5X oder pMAL-c5X**

Für die Klonierung in einen der beiden Expressionvektoren wurde folgende Reaktion in  $\Sigma$  20  $\mu$ l angesetzt:

10 $\mu$ l	DENV-ED3-DNA-Fragment (doppeltverdaut & aufgereinigt)
6 $\mu$ l	pMAL-c5X/p5X (doppeltverdaut & aufgereinigt)
2 $\mu$ l	10x T4 DNA Ligase-Puffer
2 $\mu$ l	T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu$ l)

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und am folgenden Tag in DH5 $\alpha$  transformiert. Mit den Kolonien wurden Übernachtskulturen für die Plasmidpräparation angesetzt. Vom Plasmid wurden Proben zum Sequenzieren eingeschickt. Wenn sich in dem Plasmid die richtige Sequenz befand, wurden mit dem Plasmid kompetente BL21(DE3) Bakterien transformiert.

### **2.2.11 Proteinexpression in BL21(DE3)**

Zur Vorbereitung wurden 3 ml Medium (yt-Amp) mit einer BL21(DE3)-Kolonie angeimpft, welche das ED3-Gen im Expressionsvektor (pMAL-p5X oder pMAL-c5X) enthält. Die Kulturen wurden für 3 bis 4 Stunden bei 37 °C auf der TC7-Roller-Drum (New Brunswick) kultiviert. Mit jeweils 20  $\mu$ l der Kultur wurden 300 ml Medium angeimpft. Insgesamt wurden neun Kulturen zu je 300 ml in 1 l-Erlenmeyerkolben angesetzt. Hierfür wurde dyt-Medium verwendet, zu welchem pro Liter Medium 3 ml IPTG (100 mM), 3,5 ml Ampicillin (60 mg/ml) und 5 ml Glucoselösung (40 %, sterilfiltriert) zugegeben wurden. IPTG induziert die Expression des MBP-Fusionsproteins, an welchem das DENV-ED3-Peptid hängt. Die Glucose inhibiert die Expression der Maltose-spaltenden Enzyme (Katabolitrepession des Maltose-Operons), welche die Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins behindern würde. Die angeimpften Kulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und 180 rpm über Nacht geschüttelt.

### **2.2.12 Bakterienernte**

Vor der Ernte wurde eine Probe entnommen, 1:10 verdünnt und die optische Dichte der verdünnten Probe bei 600 nm bestimmt. Anhand der optischen Dichte wurde das Volumen an Zellsuspension bestimmt, welches als Probe für die SDS-PAGE zentrifugiert wurde. Der

Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment mit SDS-Ladepuffer (3-fach) vermischt und bei -20 °C gelagert.

Das benötigte Volumen an Bakteriensuspension wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\frac{1}{OD_{600\text{ nm}}} = 0,5 \cdot \frac{\text{ml (Zellsuspension)}}{200\ \mu\text{l SDS – Ladepuffer(3 fach)}}$$

Insgesamt wurden 2,52 l Bakteriensuspension zentrifugiert (7000 rcf, 9 Minuten, 4 °C, Rotor JA-14). Der Überstand wurde verworfen. Die Bakterien wurden gewogen und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.13 Ultraschall-Zellaufschluss**

Die Bakterien (2.2.12) wurden mit einer 10 ml Pipette in Puffer A mit Lysozym aufgenommen. Hierfür wurden jeweils 5 ml Puffer A + Lysozym (5 mg/ml) verwendet. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Die Bakterien wurden mittels einer Ultraschallsonde aufgeschlossen, pro Bakteriensuspension wurden 3-4 mal je 30 Impulse mit einer Amplitude von max. 20 µm angewendet. Zwischendurch wurde die Bakteriensuspension auf Eis gekühlt um eine Erwärmung zu verhindern. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (15000 rcf, 30 Minuten, 8 °C, [2]). Die oberste „Bläsenschicht“ wurde verworfen. Von dem Bakteriensediment wurde eine Probe für die SDS-PAGE entnommen und der Überstand, bzw. das Bakterienlysat bei 4 °C gelagert. 100 µl des Lysats wurden für die SDS-PAGE entnommen, mit 50 µl SDS Ladepuffer (3-fach) gemischt und bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurde das Lysat für die Affinitätschromatografie eingesetzt.

### **2.2.14 Chromatische Aufreinigung der MBP-ED3-Fusionsproteine**

Eine Chromatographiesäule wurde mit 20 ml Amylose-Matrix (Amylose Resin, E8021L V.BioLabs) befüllt und das Ethanol, in welchem sich die Amylose-Matrix befand, wurde abgelassen. Um die Amylose-Matrix weiter zu reinigen, wurde die Matrix zweimal mit 50 ml destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 50 ml Puffer A gespült, um das Säulenmaterial zu equilibrieren. Im nächsten Schritt wurde das untere Ende der Säule geschlossen und das Lysat wurde auf die Säule aufgegeben. Der Deckel wurde auf die Säule gesteckt, sodass sie dicht verschlossen war. Das Lysat wurde mit der Amylose-Matrix für



eine Stunde auf einem horizontalen Roller inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule wieder in das Stativ gehängt und das Lysat wurde in einem 50 ml-Becher aufgefangen und bei 4 °C gelagert. Die Säule wurde erneut zweimal mit je 50 ml Puffer A gewaschen, der Durchfluss der Waschschriffe wurde verworfen. Zur Elution wurden 60 ml Puffer B auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde in sechs Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen und von jeder Fraktion wurde eine Probe für die SDS-PAGE (100 µl Probe + 50 µl SDS-Ladepuffer (3-fach)) entnommen. Die Proben für die SDS-PAGE wurden bei -20 °C gelagert, der Durchfluss wurde bei 4 °C gelagert.

### **2.2.15 Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung der Fusionsproteine**

Nach der chromatografischen Aufreinigung des Fusionsproteins und Kontrolle durch die SDS-PAGE, wurden die Fusionsprotein-haltigen Fraktionen (2.2.14) vereinigt und auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt. Hierfür wurde zuerst die Proteinkonzentration mit Hilfe eines Nanodrop-Geräts bestimmt, indem die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen wurde. Über die Berechnung des Aufkonzentrierungsfaktors AF wurde anschließend das Zielvolumen berechnet, auf das die Proteinlösung eingestellt werden sollte, um die gewünschte Proteinkonzentration von 1 mg/ml zu erhalten:

$$AF = \frac{\text{Zielkonzentration}}{\text{Ausgangskonzentration}} \quad \text{Zielvolumen} = \frac{\text{Ausgangsvolumen}}{AF}$$

Zur Aufkonzentrierung wurde die Methode der Ultrafiltration (Amicon® Ultra-15 10K Centrifugal Filter Device) eingesetzt. Es wurde ein 10K Amicon Röhrchen verwendet, dessen Porengröße deutlich kleiner war als die Größe der Fusionsproteine mit ca. 53 kDa. Dadurch verblieb das Fusionsprotein im Retentat. Die Zentrifugation erfolgte für 20 Minuten bei 9 °C und 4800 rpm (Eppendorf 5810R). Nach der Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen und der Filter erneut mit Proteinlösung befüllt, bis das Zielvolumen erreicht war. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurde die Proteinlösung zwischen der Filterfläche mit einer Pipette auf- und abpipettiert, um eine Verstopfung des Filters durch Ablagerung des Fusionsproteins zu verhindern. Anschließend wurde die Proteinkonzentration erneut gemessen und ggf. mit Puffer B eingestellt. Nachdem die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt war, wurde die Proteinlösung sterilfiltriert.

## 2.2.16 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurde ein Gel gegossen, welches aus zwei Bereichen besteht: dem Sammelgel und dem Trenngel. Für die Herstellung des SDS-PAGE-Gels wurde eine große Glasplatte in die Gelkammerhalterung eingeschoben und zwei Spacer am Rand der Glasplatte platziert. Auf die Spacer wurde eine kleinere Glasplatte platziert und festgespannt, hierbei galt es zu beachten, dass die unteren Ränder der Glasplatten bündig abschließen mussten, damit das Gel nicht auslief. Die Glasplatten wurden samt Gelkammerhalterung mit der bündigen Seite nach unten auf einen Gummistreifen in das Gießgestell eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel angesetzt und zwischen die Glasplatten bis ca. 2 cm vor Ende der kleineren Glasplatte gegossen. Um den Gelrand des Trenngels zu glätten, wurde vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert war, wurde das Isopropanol abgegossen und mit ddH<sub>2</sub>O vorsichtig ausgewaschen. Die restliche Flüssigkeit wurde mit einem Papiertuch zwischen den Glasplatten entfernt. Das Sammelgel wurde angesetzt und zwischen die Glasplatten gefüllt, der Gelkamm wurde mittig eingesetzt und nach der Polymerisation des Sammelgels vorsichtig entfernt. Das fertige SDS-Gel wurde aus dem Gießgestell gelöst und in die Halterung für die Gelelektrophorese eingespannt und in die Gelkammer eingesetzt. Die Gelkammer wurde mit Laemmli-Puffer gefüllt und die Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Anschließend wurde der Deckel aufgesetzt und die Spannung geregelt bis der Stromfluss ca. 2,5 mA betrug. Sobald die Proben vollständig aus den Taschen gelaufen waren und den Rand zum Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung erhöht, bis der Stromfluss 5 mA betrug. Als das Gel fertig gelaufen war, wurde die Spannung abgeschaltet und das Gel vorsichtig aus den Glasplatten befreit, das Sammelgel wurde entfernt und das Gel wurde in eine Schale mit der Coomassie- Färbelösung überführt, wo es für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert wurde. Zum Entfärben wurde das Gel in 10 % Essigsäure auf einem Schüttler vorsichtig bis zum nächsten Tag inkubiert. Zur schnelleren Entfärbung wurde zusätzlich ein aufgerolltes Papiertuch an das Ende der Schale gelegt. Nach der Entfärbung wurde das Gel mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und auf einem Flachbettscanner (Epson 4990) gescannt.

### 2.2.17 Antigen-ELISA

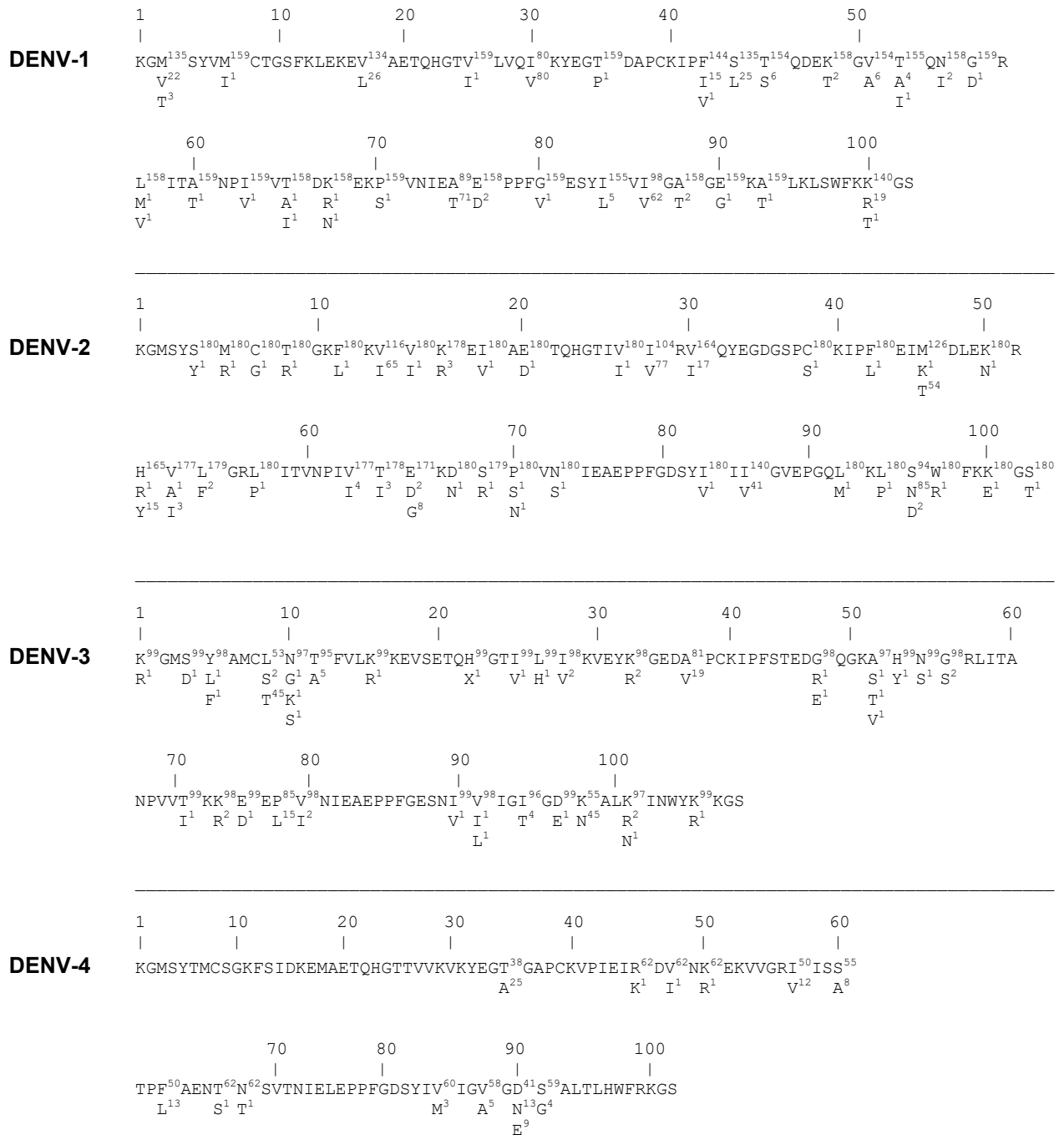
Die Antigenkonzentration wurde in Bicarbonat/Carbonatpuffer (100 mM, pH = 9,4) auf 2,5 µg/ml eingestellt. Für die Antigenbeschichtung wurde in jeweils zwei Reihen zu je acht *wells* jeweils 100 µl/*well* der Antigenverdünnung gegeben (96-*well*-Mikrotiterplatte, Maxisorb, Greiner Bio-One). Die Mikrotiterplatte wurde mit einem Klebefilm verschlossen und bei 8 °C über Nacht inkubiert. Die Seren wurden 1:100 in 3 % Milchpulver/PBS verdünnt und es wurde Affinitäts-gereinigtes MBP-Protein hinzugefügt, bis eine Konzentration von 75 µg/ml erreicht war. Die Serum-MBP-Mischung wurde über Nacht bei 8 °C inkubiert. Jedes *well* der beschichteten Platte wurde mit 300 µl Blockpuffer (PBS, 3% Milchpulver) befüllt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Die Platten wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal mit PBST (PBS, 0,05% Tween 20) gewaschen. In jedes *well* wurde 100 µl des Serum-MBP-Mischung gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mischung verworfen und die Platten wurden erneut dreimal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100 µl des anti-Human-Detektionsantikörpers (Ziegen anti-Human-IgG-Antikörper konjugiert mit HRP (*horseradish peroxidase*, BioRad) in der Verdünnungsstufe 1:2000 in die *wells* pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten dreimal mit PBST und dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurden in jedes *well* 50 µl TMB-Substrat (SureBlue, KPL) hinzugegeben. Nach 15 Minuten wurde die Farbreaktion gestoppt, indem 50 µl/*well* 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben wurden. Die Intensität der Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Sequenzvergleich zur Bestimmung einer Konsensus-Sequenz für die ED3-Region der Dengueviren 1 bis 4**

Für die Bestimmung der Konsensus-Sequenz wurden 160 Aminosäuresequenzen der ED3-Region für DENV-1, 181 Aminosäuresequenzen für DENV-2, 100 Aminosäuresequenzen für DENV-3 und 63 Aminosäuresequenzen für DENV-4 aus verschiedenen Ländern gefunden. Die Aminosäuresequenzen wurden für den Sequenzvergleich mit GenBank-Nummer und Herkunftsland in eine Excel-Tabelle übertragen. Mit einem Excel-Makro wurde die Konsensus-Sequenz berechnet. Die Aminosäure, die an der jeweiligen Stelle am häufigsten vorkam, wurde dann als Konsensus aufgefasst, das Vorkommen von anderen Aminosäuren an der gleichen Stelle als Variationen. In Abbildung 5 sind die berechneten Konsensus-Sequenzen der Aminosäuren der ED3-Region von DENV-1 bis DENV-4 aufgeführt, inklusive der Art und Häufigkeit von Variationen. Hierbei ist zu erwähnen, dass der Konsensus nicht überall eindeutig ist, so wurde an Position 30 der DENV-1-Sequenz die Aminosäure I als Konsensus aufgefasst, obwohl die Aminosäure V an dieser Position die gleiche Häufigkeit aufweist. Dass die Aminosäure I und nicht die Aminosäure V an dieser Position als Konsensus aufgefasst wird, liegt hierbei an der Art wie das Makro die Aminosäuren zählte und hat keine weitere Bedeutung. Die kolumbianische Aminosäuresequenz mit den meisten Abweichungen von der Konsensus-Sequenz des jeweiligen DENV-Serotypen wurde über Zählen der Variationen ausgewählt. Abbildung 6 zeigt die zuvor ermittelten Konsensus-Aminosäuresequenzen für DENV-1 bis DENV-4, sowie die Art und Häufigkeiten an Variationen, die bei den kolumbianischen Sequenzen auftraten. Die oberste angegebene Sequenz ist hierbei jeweils immer diejenige, welche für die Synthese des DNA-Fragments ausgewählt wurde. Sequenzen, welche die gleichen Variationen aufwiesen, wurden zusammengefasst, die Häufigkeit der Variante ist rechts neben der Sequenz angegeben.

Das Ergebnis war, dass die kolumbianische DENV-1-Sequenz JQ581618 mit vier Variationen am meisten von der DENV-1-Konsensus-Sequenz abweicht, die kolumbianische DENV-2-Sequenz KU878568 mit sechs Variationen am meisten von der DENV-2-Konsensus-Sequenz, die kolumbianische DENV-3-Sequenz FJ189466 mit fünf Variationen am meisten von der DENV-3-Konsensus-Sequenz und die kolumbianische DENV-4-Sequenz KC009636 mit sechs Variationen am meisten von der DENV-4-Konsensus-Sequenz.



**Abb. 5: Sequenzvergleich der E-Protein ED3-Regionen von DENV-1-4**

Die Abbildung zeigt die Konsensus-Sequenzen mit den entsprechenden Variationen für DENV-1 (160 Aminosäuresequenzen), DENV-2 (181 Aminosäuresequenzen), DENV-3 (100 Aminosäuresequenzen) und DENV-4 (63 Aminosäuresequenzen). Die einzelnen GenBank-Nummern der zum Vergleich herangezogenen 504 ED3-Sequenzen sind in Anhang 7.1 aufgeführt

DENV-1	KGMSYVMCTG	SFKLEKEVAE	TOHGTIVLVQI	KYEGIDAPCK	IPFSTQDEKG	VTONGRLITA	NPIVIDKEKP	VNIEAEPPFG	ESYIIVIGAGE	KALKLSWFKK	GS	1/10
JQ581618	-----V	-----V	-----V	-----S	-----T	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	9/10
JQ581628	-----V	-----V	-----V	-----S	-----T	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	9/10
DENV-2	KGMSYVMCTG	KFKVVKELAE	TOHGTIVIRV	QYEGDGPCK	IPFEIMDLEK	RHVIGRLITV	NPIVTEKDS	VNIEAEPPFG	DSYIIVIGVEP	GQLKLSWFKK	GS	3/12
KU878568	-----I	-----R	-----I	-----T	-----T	-----I	-----I	-----N	-----N	-----N	-----N	3/12
KU878564	-----I	-----I	-----I	-----T	-----T	-----F	-----F	-----N	-----N	-----N	-----N	2/12
KU878570	-----I	-----I	-----I	-----T	-----T	-----F	-----F	-----N	-----N	-----N	-----N	2/12
KU878572	-----I	-----I	-----V	-----T	-----T	-----F	-----F	-----N	-----N	-----N	-----N	2/12
KU878574	-----I	-----V	-----V	-----T	-----T	-----F	-----F	-----N	-----N	-----N	-----N	1/12
KU878575	-----T	-----I	-----I	-----N	-----N	-----I	-----I	-----T	-----T	-----T	-----T	1/12
DENV-3	KGMSYAMCLN	TFVLKKEVSE	TOHGTILIKV	EYKGEDAPCK	IPFSTEDGQG	KAHNGRLITA	NPVVTKKEEP	VNIEAEPPFG	ESNIVIGIGD	KALKINWYKK	GS	1/19
FJ189466	-----TS	-----V	-----V	-----R	-----R	-----R	-----R	-----N	-----N	-----N	-----N	1/19
FJ189462	-----T	-----T	-----E	-----E	-----E	-----E	-----E	-----N	-----N	-----N	-----N	1/19
FJ189454	-----T	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----N	-----N	-----N	-----N	1/19
FJ189467	-----T	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----N	-----N	-----N	-----N	1/19
FJ189468	-----T	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----V	-----N	-----N	-----N	-----N	15/19
DENV-4	KGMSYVMCTG	KFSIDKEMAE	TOHGTIVVKV	KYEGIDAPCK	VPIEIRDVNK	EKVVERLISS	TPFAENTNSV	TNIELEPPFG	DSYIIVIGVD	SALLHWFRK	GS	3/09
KC009636	-----A	-----A	-----V	-----A	-----L	-----L	-----L	-----M	-----N	-----N	-----N	3/09
KC009635	-----A	-----A	-----V	-----A	-----L	-----L	-----L	-----M	-----N	-----N	-----N	2/09
KC009637	-----A	-----A	-----V	-----A	-----L	-----L	-----L	-----M	-----N	-----N	-----N	2/09
KC009634	-----A	-----A	-----V	-----A	-----L	-----L	-----L	-----M	-----N	-----N	-----N	1/09
KC009638	-----A	-----A	-----V	-----A	-----L	-----L	-----L	-----M	-----N	-----N	-----N	1/09

**Abb. 6 Sequenzvergleich der ED3-Regionen von kolumbianischen Dengueviren mit der ED3-Konsensus-Sequenz**

In der Datenbank waren für DENV-1 zehn, DENV-2 zwölf, DENV-3 19 und für DENV-4 neun kolumbianische ED3-Sequenzen vorhanden. In der rechten Spalte sind die Häufigkeiten der Sequenz in der jeweiligen Gruppe angegeben. Alle GenBank-Nummern des Sequenzvergleichs sind im Anhang in Abschnitt 7.1 angegeben.

### 3.2 Klonierung der MBP-ED3-Fusionsproteine

Für die Klonierung der in 3.1 ausgewählten Aminosäuresequenzen wurde zuerst die entsprechende DNA-Sequenz anhand der GenBank-Nummer ermittelt. Die DNA-Sequenz der ausgewählten ED3-Region von DENV-4 wurde mit dem *Codon optimization tool* (von Integrated DNA Technologies, Inc.) für die Expression in *E. coli* angepasst. Für ED3<sup>1</sup> wurde ein Codon GGC>GCT (Oligo 6) ausgetauscht, da sich in der DENV-1 Sequenz eine interne HindIII-Schnittstelle befand. Folgende Sequenzen wurden für die Klonierung verwendet:

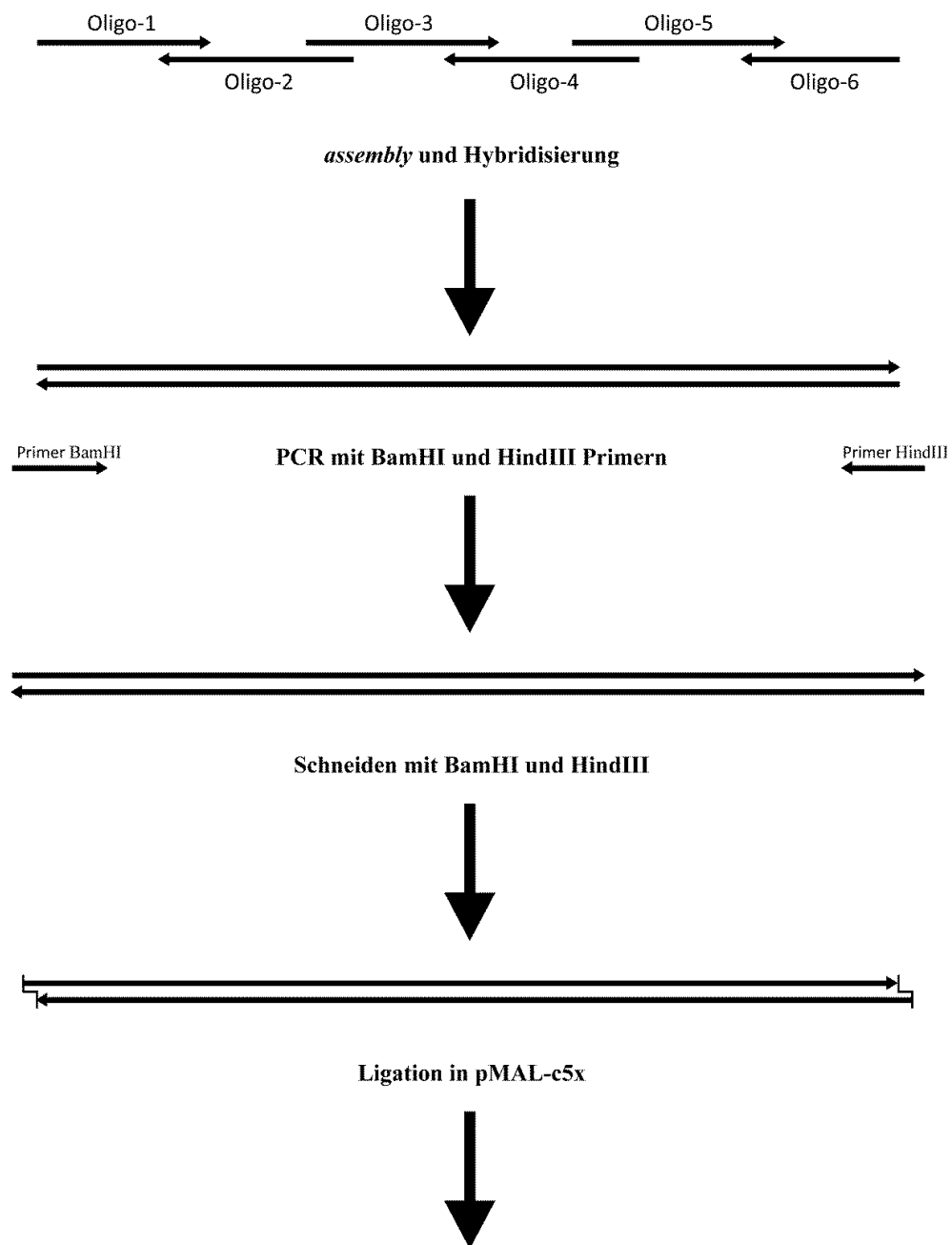
DENV-1-Sequenz JQ581618

DENV-2-Sequenz KU878568

DENV-3-Sequenz FJ189466

DENV-4-Sequenz KC009636

Für die Synthese der ED3-DNA-Fragmente wurden die Sequenzen in Oligonukleotide aufgegliedert, deren Enden ca. 20 bp lang komplementär zu den benachbarten Oligonukleotiden waren. Die Strategie der DNA-Synthese und Klonierung sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Berechnung der Oligonukleotide und der für die Synthese benötigten endständigen Primer erfolgte mit dem Online-Programm *Assembly PCR Oligo Maker* (siehe Methoden 2.2.8). Für ED3<sup>1</sup>, ED3<sup>2</sup> und ED3<sup>4</sup> wurden sechs Oligonukleotide berechnet. Für ED3<sup>3</sup> mussten aufgrund der Sequenz acht Oligonukleotide synthetisiert werden. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Abschnitt 2.1.12 aufgeführt. Anschließend wurden die berechneten Oligonukleotide auf ausreichende Länge (ca. 20 bp) der komplementären Bereiche überprüft. Nach manueller Überprüfung wurden die komplementären Bereiche der Oligonukleotide im Einzelfall angepasst um Fehlhybridisierungen beim *assembly* zu vermeiden. Ein Kriterium war zum Beispiel, dass die Oligonukleotide am 3'-Ende eines doppelsträngigen Abschnitts möglichst ein G oder C trugen und nicht auf A oder T endeten. Dies ist für die Effizienz der PCR-Amplifikation von Vorteil, wird aber von dem Programm zur Berechnung der Oligonukleotide nicht berücksichtigt. An die Primer-Sequenzen für die Amplifikation des DNA-Fragments wurden für die Klonierung in den Expressionsvektor die Restriktionsschnittstellen für BamHI und HindIII angefügt. Verwendet wurden ein Expressionsvektor für die C-terminale Fusion an MBP. Der Vektor pMAL-c5X ist in Abbildung 8 dargestellt. Die berechneten Oligonukleotide (siehe 2.1.12) wurden im nächsten Schritt für die Synthese des DNA-Fragments eingesetzt. Dazu wurde die Methode der *assembly-PCR* verwendet.



**Abb. 7: Strategie der ED3-Klonierung**

Die Herstellung des ED3-Fragments ist am Beispiel des ED3<sup>1</sup> dargestellt.

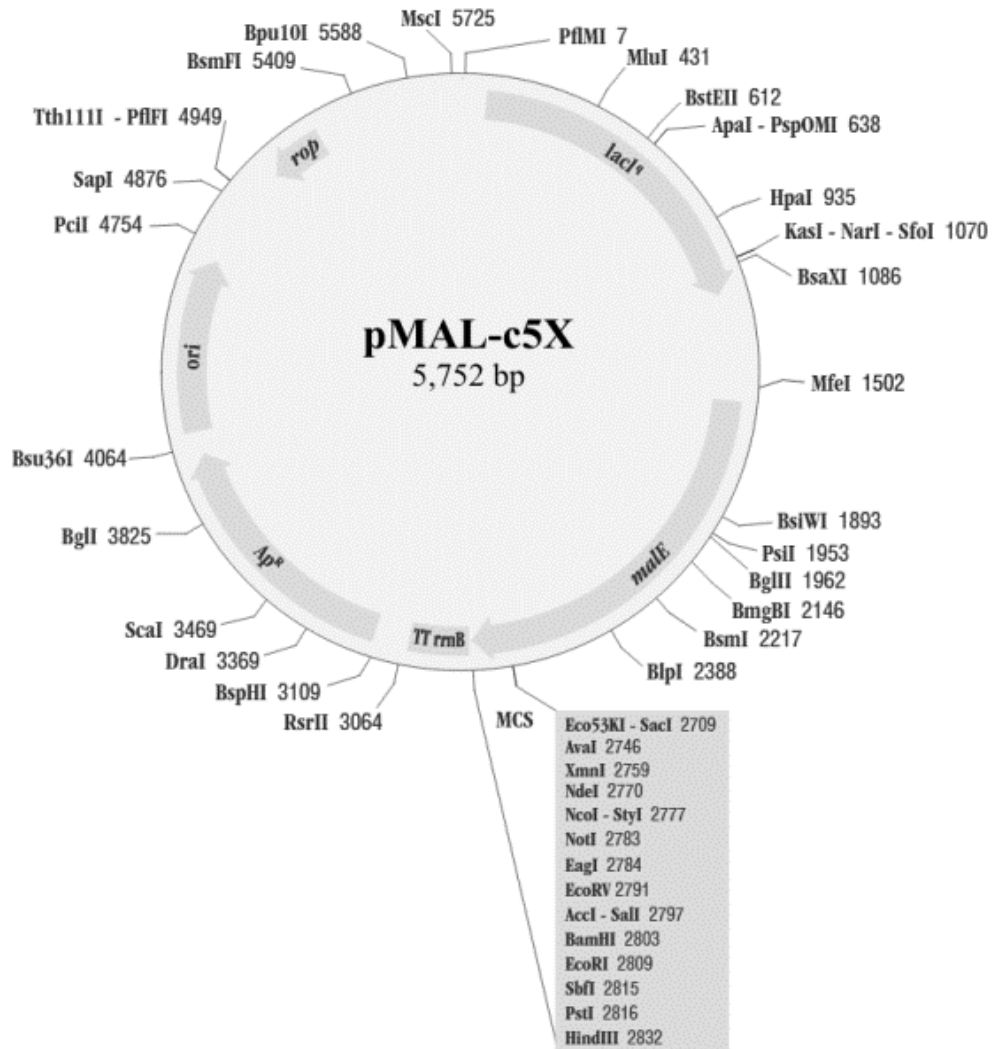
Oligo-1: 62 bp; Oligo-2: 70bp; Oligo-3: 69bp;

Oligo-4: 70bp; Oligo-5: 76bp; Oligo-6: 57bp;

Primer BamHI: 32bp; Primer HindIII: 30bp.



## pMAL-c5X



## pMAL-c5X Polylinker

```

                SacI
2701 malE...tcg agc tcg aac aac aac aac aat aac aat aac aac aac ctc ggg atc gag gga

                XmnI      NdeI      NcoI      NotI      EcoRV      SalI      BamHI      EcoRI      SbfI
2761 agg att tca cat atg tcc atg ggc ggc cgc gat atc gtc gac gga tcc gaa ttc cct gca

                HindIII
2821 ggt aat taa at a agc tt c aaa taa aac gaa agg ctc agt cga aag act ggg cct ttc gtt
  
```

### Abb. 8: Expressionsvektor pMAL-c5x

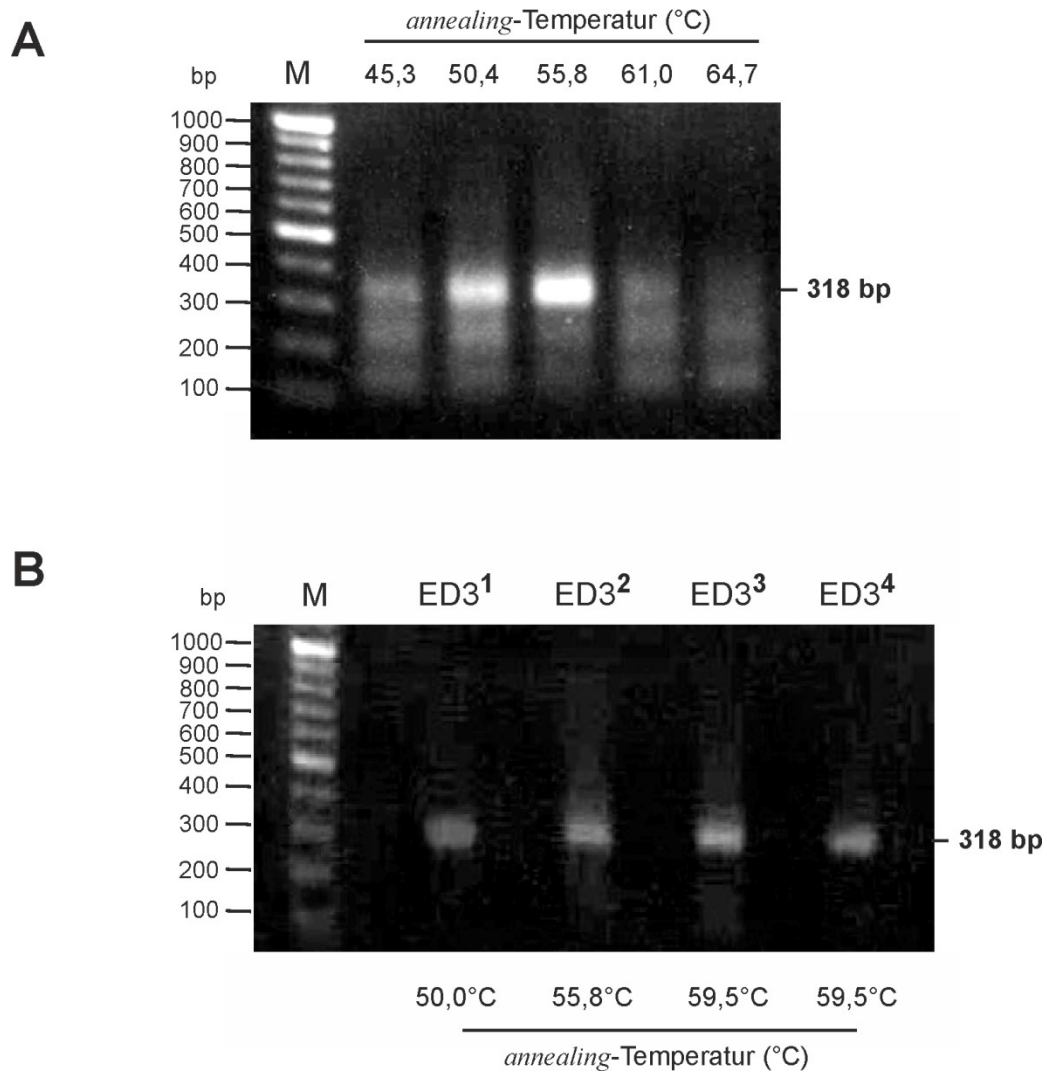
Die ED3-Fragmente wurden in die BamHI - HindIII Schnittstellen des pMAL-c5X Polylinkers kloniert. Der Polylinkerbereich ist identisch mit dem Polylinker des Expressionsvektors pMAL-p5x.

Die Synthese der DNA-Fragmente erfolgte durch die Methode der *assembly*-PCR, die sich in zwei Schritte unterteilt. Zuerst wurden die Oligonukleotide bei einer bestimmten Temperatur hybridisiert und die Lücken wurden teilweise durch die *Taq*-Polymerase aufgefüllt. Diese Reaktion wird ca. 10x durchgeführt (siehe 2.2.8). Anschließend wird mit den endständigen Primern das vollständige Fragment amplifiziert (Abb. 7). Für die Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur wurden je DNA-Fragment fünf Reaktionen angesetzt, bei verschiedenen *annealing*-Temperaturen hybridisiert und anschließend amplifiziert. Die Abbildung 9A zeigt am Beispiel des ED3<sup>2</sup>-DNA-Fragments eine solche Analyse. Für die Synthese des ED3<sup>2</sup>-DNA-Fragments war die Ausbeute an DNA bei der *annealing*-Temperatur von ca. 55,8 °C am höchsten (Abb. 9A). Für die anderen drei DNA-Synthesen ergaben sich folgenden optimalen *annealing*-Temperaturen (Abb. 9B):

DENV-1	ED3 <sup>1</sup>	50,0°C
DENV-2	ED3 <sup>2</sup>	55,8°C
DENV-3	ED3 <sup>3</sup>	59,5°C
DENV-4	ED3 <sup>4</sup>	59,5°C

Die synthetisierten ED3-DNA-Fragmente wurden zur Sequenzkontrolle *blunt-end* in den Vektor pCR2.1 kloniert und in DH5 $\alpha$  transformiert. Weiße Kolonien, die DENV-ED3-tragenden Plasmide aufwiesen, wurden mit BamHI und HindIII geschnitten. Mit der Methode der Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion wurde das BamHI/HindIII-Fragment aufgereinigt. Der Expressionsvektor wurde ebenfalls mit BamHI und HindIII geschnitten und über Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt. Das aufgereinigte ED3-DNA-Fragment wurde in den BamHI/HindIII geschnittenen Expressionsvektor ligiert. Das Ergebnis waren pMAL-c5X, bzw. pMAL-p5X-Vektoren, welche in dem Polylinker zwischen den Schnittstellen BamHI und HindIII das ED3-Gen für die jeweils ausgewählte Sequenz des DENV-Serotyps trugen. Abbildung 10 zeigt exemplarisch für ED3<sup>1</sup> die Restriktionsanalyse mit dem ausgeschnittenen BamHI/HindIII-Fragment von 318 bp. Alle Expressionsvektoren wurden zur Kontrolle der inserierten Sequenzen sequenziert (Abb. 11). Hergestellte Expressionsvektoren:

ED3	pMAL-c5x	pMALp5x
DENV-1	+	-
DENV-2	+	+
DENV-3	+	+
DENV-4	+	+

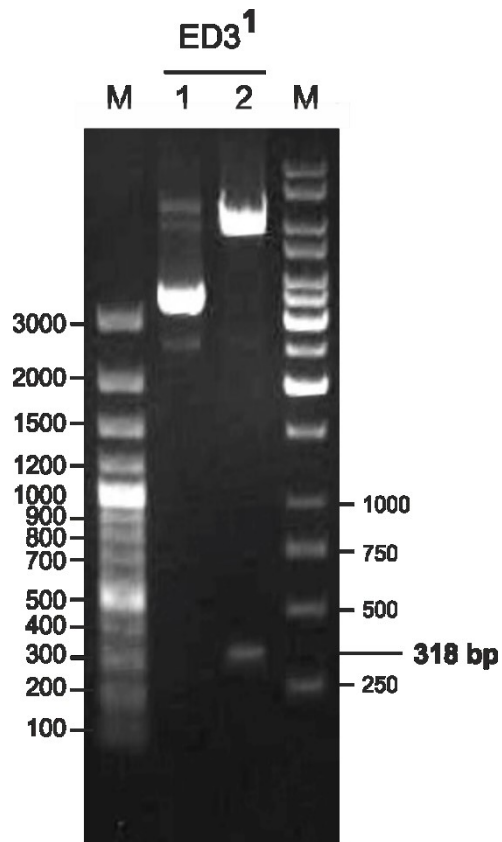


**Abb. 9: Ergebnisse der *assembly*-PCR**

(A) Die Abbildung zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer Temperatur-Gradienten-PCR für das ED3<sup>2</sup>-DNA Fragment. Als optimale *annealing*-Temperatur für die *assembly*-PCR wurde eine Temperatur von 55,8°C ermittelt.

(B) Die Abbildung zeigt die vier DNA-Fragmente nach der *assembly*-PCR für die ED3-Sequenzen der DENV-1-4 (ED3<sup>1</sup>, DENV-1; ED3<sup>2</sup>, DENV-2; ED3<sup>3</sup>, DENV-3; ED3<sup>4</sup>, DENV-4).

M: Molekulargewichtsmarker



**Abb. 10: Klonierung in pMAL-c5x**

Die Klonierung der ED3-DNA-Fragmente erfolgte in pMAL-c5X. Exemplarisch ist für das DENV-1 ED3-Fragment (ED3<sup>1</sup>) der HindIII/BamHI-Verdau gezeigt.

M: Molekulargewichtsmarker

1: unverdaut ED3<sup>1</sup> in pMAL-p5X

2: HindIII und BamHI geschnitten

## ED3<sup>1</sup> in pMAL-c5X

```
GGA TCC AAG GGG ATG TCA TAT GTG ATG TGC ACA GGC TCA TTT AAG CTA GAG AAG GAA GTG GCT GAG ACC CAG CAT GGA ACT GTT CTA GTG < 90
G S K G M S Y V M C T G S F K L E K E V A E T Q H G T V L V
10 20 30 40 50 60 70 80

CAG GTC AAA TAC GAA GGA ACA GAC GCG CCA TGC AAG ATC CCC TTC TCG ACC CAA GAT GAG AAA GGA GTG ACC CAG AAT GGG AGA TTG ATA < 180
Q V K Y E G T D A P C K I P F S T Q D E K G V T Q N G R L I
100 110 120 130 140 150 160 170

ACA GCC AAT CCC ATA GTT ACT GAC AAA GAA AAA TCA GTC AAC ATT GAG ACA GAA CCA CCT TTT GGT GAG AGC TAC ATC GTG GTA GGG GCA < 270
T A N P I V T D K E K S V N I E T E P P F G E S Y I V V G A
190 200 210 220 230 240 250 260

GGT GAA AAA GCC TTG AAA CTA AGC TGG TTC AAG AAA GGA AGC AAG CTT < 318
G E K A L K L S W F K K G S K L
280 290 300 310
```

## ED3<sup>2</sup> in pMAL-c5X

```
GGA TCC TCA TAC TCT ATG TGT ACA GGA AAG TTT AAA ATT GTG AGA GAA ATA GCA GAA ACA CAA CAT GGA ACA ATA GTT ATC AGA ATA CAA < 90
G S S Y S M C T G K F K I V R E I A E T Q H G T I V I R I Q
10 20 30 40 50 60 70 80

TAT GAA GGG GAC GGT TCT CCA TGT AAG ATC CCT TTT GAA ATA ACA GAC TTG GAA AAA AGA CAC GTC TTA GGT CGC CTG ATT ACA GTT AAC < 180
Y E G D G S P C K I P F E I T D L E K R H V L G R L I T V N
100 110 120 130 140 150 160 170

CCA ATC GTA ATA GAA AAA GAT AGC CCA GTC AAC ATA GAA GCA GAA CCT CCA TTC GGA GAC AGC TAC ATC ATC ATA GGA GTA GAG CCG GGA < 270
P I V I E K D S P V N I E A E P P F G D S Y I I I G V E P G
190 200 210 220 230 240 250 260

CAA TTG AAA CTC AAT TGG TTT AAG AAG GGA AGT AAG CTT < 309
Q L K L N W F K K G S K L
280 290 300
```

## ED3<sup>3</sup> in pMAL-c5X

```
GGA TCC AAG GGG ATG AGC TAT GCA ATG TGC ACG AGT ACC TTT GTG TTG AAG AAA GAA GTC TCA GAA ACG CAA CAT GGG ACA ATA CTC ATC < 90
G S K G M S Y A M C T S T F V L K K E V S E T Q H G T I L I
10 20 30 40 50 60 70 80

AAG GTC GAG TAC AAA GGG GAA GAT GTA CCT TGC AAG ATT CCT TTC TCC ACA GAG GAT GGA CAA GGG AAA GCT CAC AAT GGC AGA CTG ATT < 180
K V E Y K G E D V P C K I P F S T E D G Q G K A H N G R L I
100 110 120 130 140 150 160 170

ACA GCC AAC CCA GTG GTG ACT AAG AGG GAG GAG CCT GTC AAT ATT GAG GCT GAA CCT CCT TTT GGG GAA AGT AAT ATA GTA ATT GGA ATT < 270
T A N P V V T K R E E P V N I E A E P P F G E S N I V I G I
190 200 210 220 230 240 250 260

GGA GAC AAC GCC TTG AAA ATC AAC TGG TAC AAG AAG GGA AGC AAG CTT < 318
G D N A L K I N W Y K K G S K L
280 290 300 310
```

## ED3<sup>4</sup> in pMAL-c5X

```
GGA TCC AAA GGT ATG TCT TAC ACG ATG TGT TCG GGC AAG TTT AGT ATT GAT AAA GAA ATG GCG GAA ACG CAG CAC GGA ACG ACA GTG GTG < 90
G S K G M S Y T M C S G K F S I D K E M A E T Q H G T T V V
10 20 30 40 50 60 70 80

AAA GTC AAA TAC GAA GGG GCG GGA GCC CCC TGT AAA GTC CCC ATT GAA ATT CGG GAC GTG AAC AAG GAG AAA GTC GTA GGA CGT GTG ATC < 180
K V K Y E G A G A P C K V P I E I R D V N K E K V V G R V I
100 110 120 130 140 150 160 170

TCT GCA ACA CCT CTG GCA GAA AAT ACG AAC AGT GTC ACG AAT ATA GAA CTT GAA CCG CCC TTT GGC GAC AGC TAT ATA ATG ATA GGG GTG < 270
S A T P L A E N T N S V T N I E L E P P F G D S Y I M I G V
190 200 210 220 230 240 250 260

GGC AAT TCT GCA TTA ACC CTT CAT TGG TTC AGA AAA GGA TCG AAG CTT < 318
G N S A L T L H W F R K G S K L
```

### Abb. 11: Sequenzen der ED3-Klone

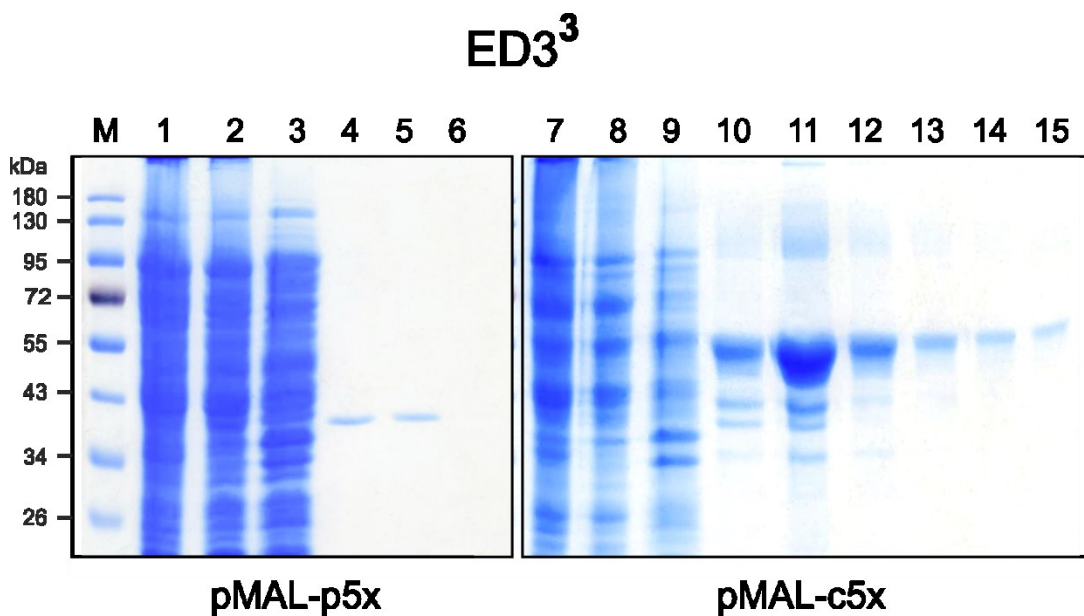
Gezeigt sind die DNA-Sequenzen von BamHI bis HindIII der ED3-Klone im Expressionsvektor pMAL-c5X. (ED3<sup>1</sup>, DENV-1; ED3<sup>2</sup>, Denv-2; ED3<sup>3</sup>, DENV-3; ED3<sup>4</sup>, DENV-4).

### 3.3 Affinitätschromatische Reinigung von MBP-ED3-Fusionsproteinen

Mit den in 3.2 hergestellten Expressionsvektoren wurden BL21(DE3) Bakterien transformiert und die resultierenden Klone für die Expression von MBP-ED3-Fusionsproteinen eingesetzt. Anschließend wurden die Bakterien geerntet, mithilfe von Ultraschall aufgeschlossen und affinitätschromatografisch aufgereinigt. Für jede Expression mit anschließendem Ultraschall-Aufschluss und affinitätschromatografischer Aufreinigung wurden Proben für die SDS-PAGE zurückbehalten. In der Abbildung 12 ist der Vergleich einer Expression in den beiden verschiedenen Expressionsvektoren dargestellt. Verwendet wurde das MBP-ED3 Konstrukt für DENV-3 aus der Expression in pMAL-c5x, da es in diesem Vektor die höchsten Ausbeuten ergab (Tab. 1). Das Ergebnis der Expression in pMAL-p5x war, dass zum größten Teil MBP und nur wenig MBP-ED3 exprimiert wurde. Daher wurde in dieser Arbeit die Expression nur noch mit ED3-Klonen in dem pMAL-c5x Vektor durchgeführt. Die Abbildung 13 zeigt SDS-PAGE-Gelbilder der Expressionen von MBP-ED3-Fusionsproteinen der vier DENV-Serotypen (ED3<sup>1</sup>, ED3<sup>2</sup>, ED3<sup>3</sup>, ED3<sup>4</sup>) in dem Expressionsvektor pMAL-c5X. Das MBP weist eine molekulare Größe von ca. 42,5 kDa auf, die Aminosäuresequenz des Fusionsproteins ED3-MBP ist um 92 Aminosäuren länger als die 408 Aminosäuren des MBP und besitzt somit eine molekulare Größe von ca. 52 kDa. In Abbildung 12 sind in den Eluat-Fractionen Proteinbanden auf Höhe von MBP-ED3-Fusionsproteinen und auf Höhe von MBP-Proteinen, sowie weitere Banden zwischen diesen beiden Proteinbanden, zu finden. Die Banden auf Höhe der MBP-ED3-Fusionsproteine von DENV-2 und -3 sind hierbei die am stärksten ausgeprägten Banden, bei DENV-1 sind die Banden des MBP-ED3-Fusionsproteins und des MBP-Proteins ungefähr gleich intensiv. Bei DENV-4 ist die Proteinbande des MBP stärker als die des MBP-ED3-Proteins ausgeprägt. Da die anschließende Aufkonzentrierung sich nach der Gesamtproteinkonzentration richtet und die unterschiedlichen Verhältnisse von MBP-ED3-Fusionsproteinen zu Gesamtprotein in den Eluat-Fractionen nicht herausgerechnet wurden, ergaben sich dadurch unterschiedliche ED3-Antigenanteile. Anhand der SDS-PAGE-Gelbilder wurden Eluat-Fractionen für die Aufkonzentrierung vereint und die Proteinkonzentration im vereinten Eluat gemessen. Die Eluate wurden auf eine Proteinkonzentration von ca. 1 mg/ml mit Hilfe einer 10K-Filterssäule aufkonzentriert und anschließend sterilfiltriert. Die Ergebnisse der Expression, Aufreinigung und Aufkonzentrierung von MBP-ED3-Fusionsproteinen, sowie die Ausbeuten vor der Sterilfiltration sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tab. 1: Ausbeuten der MBP-ED3-Fusionsprotein Expression in BL21 (DE3)**

Fusionsprotein	pMAL-c5x				pMAL-p5x
	ED3 <sup>1</sup>	ED3 <sup>2</sup>	ED3 <sup>3</sup>	ED3 <sup>4</sup>	ED3 <sup>3</sup>
<b>Eluat (ml)</b>	120	130	230	100	60
Protein (mg/ml)	0,135	-	0,7	0,32	0,2
Ausbeute (mg)	16,2	-	161	32	12
<b>Konzentrat (ml)</b>	15	30	150	20	4
Protein (mg/ml)	1,07	1,0	1,0	1,05	1,05
Ausbeute (mg)	16,1	30	150	21	4
<b>Bakterien (g)</b>	21,2	50,1	54,5	48,9	27,9
Protein (mg/g)	0,76	0,6	2,75	0,43	0,15



**Abb. 12: Vergleich der Expression von ED3<sup>3</sup> in pMAL-p5x und pMAL-c5x**

Unterschied der Expression für die Expressionsvektoren pMAL-p5x und -c5x am Beispiel des MBP-ED3<sup>3</sup>-Fusionsproteins (Polyacrylamidgel 10 %).

M = PAGERuler *Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific)

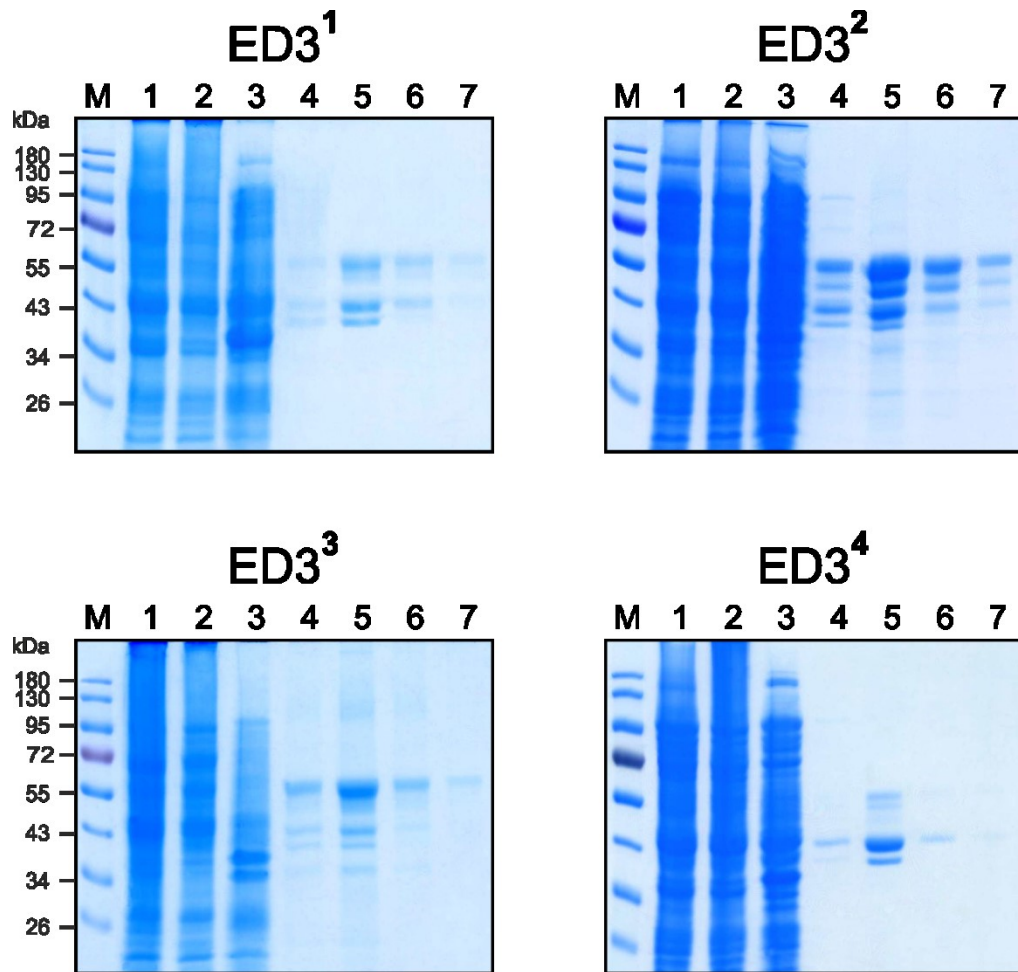
1, 7 = Durchfluss der Affinitätschromatografie

2, 8 = Lysat nach Zellaufschluss                      6, 12 = Eluat Fraktion 3

3, 9 = Lysat nach Expression                              13 = Eluat Fraktion 4

4, 10 = Eluat Fraktion 1                                      14 = Eluat Fraktion 5

5, 11 = Eluat Fraktion 2                                      15 = Eluat Fraktion 6



**Abb. 13: Expression von ED3-Antigenen für DENV-1-4 in pMAL-c5x**  
(Polyacrylamidgel 10 %).

M = PAGERuler *Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific)

1 = Durchfluss der Affinitätschromatografie

2 = Lysat nach Zellaufschluss

3 = Lysat nach Expression

4 = Eluat Fraktion 1

5 = Eluat Fraktion 2

6 = Eluat Fraktion 3

7 = Eluat Fraktion 4



### 3.4 Nachweis Serotyp-spezifischer Antikörper mit MBP-ED3-Fusionsproteinen

Für den Nachweis von Antikörpern im Serum von Patienten wurden RT-PCR positive Seren ausgewählt. Diese Seren wurden mit den kolumbianischen Antigenen getestet und die Ergebnisse mit vorhandenen Daten verglichen. ELISA-Daten mit den ED3-Antigenen der WHO empfohlenen Dengueviren wurden von Kerstin Krausz (LG-Schreiber, BNITM) zur Verfügung gestellt. Daten zur RT-PCR, dem Antikörpernachweis mit Hilfe des mED3-Tests und die Daten zur Virusneutralisation wurden aus der Arbeit von Heidi Auerswald entnommen (Auerswald, 2016). In Abbildung 14 werden die ausgewählten Sequenzen, die zur Synthese der MBP-ED3-Fusionsproteine verwendet wurden, mit den Sequenzen der WHO ED3-Antigene verglichen. Das kolumbianische ED3-Antigen von DENV-1 weist an drei Positionen Aminosäureunterschiede auf. Die ED3-Antigene von DENV-2 und -3 unterscheiden sich an jeweils fünf Positionen, die ED3-Antigene für DENV-4 unterscheiden sich an sechs Positionen.

#### DENV-1

Col 1 KGMSYVMCTGSFKLEKEVAETQHGTVLVQVKYEGTDAPCKIPFSTQDEKGVTONGRRLITANPIVTDKEKSVNIETEPFPGESYIVVGAGEKALKLSWFKKGS  
16007 -----S-----P-----A-----

#### DENV-2

Col 1 SYSMCTGKFKIVREIAETQHGTVIRIQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHLVGRRLITVNPVIEKDSPVNIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLKLNWFKKGS  
16681 -----V-K-----V-----M-----T-----

#### DENV-3

Col 1 KGMSYAMCTSTFVLKKEVSETQHGTVILIKVEYKGEDVPCKIPFSTEDGQGAHNGRLITANPVVTKREEPVNIIEAEPFPGESNIVIGIGDNALKINWYKKS  
H87 -----LN-----A-----K-----R---

#### DENV-4

Col 1 KGMSYTMCSGKFSIDKEMAETQHGTVVVKVYEGAGAPCKVPIEIRDVNKEKVVGRVISATPLAENTNSVTNIELEPPFPGDSYIMIGVNSALTLHWFRKGS  
H241 -----I-S-F-Y-----V-----D-----

**Abb. 14: Vergleich der ED3-Antigensequenzen**

Col: kolumbianische ED3-Antigensequenzen

DENV-1	ED3 <sup>1</sup>	JQ581618
DENV-2	ED3 <sup>2</sup>	KU878568
DENV-3	ED3 <sup>3</sup>	FJ189466
DENV-4	ED3 <sup>4</sup>	KC009636
WHO ED3-Antigene		
DENV-1	Isolat 16007	AF180817
DENV-2	Isolat 16681	U87411
DENV-3	Isolat H87	M93130
DENV-4	Isolat H241	S66064

Ein erstes Ergebnis war, dass alle vier Antigene im ELISA reagierten. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen z. B. für die vier kolumbianischen ED3-Antigene Reaktionen deutlich über dem *cut-off* und deutlich über den Werten der MBP-Kontrolle. Insgesamt wurden in den getesteten Seren die stärksten Reaktionen gegen die DENV-1 und DENV-3-Antigene beobachtet. Reaktionen gegen DENV-4 ED3 waren spezifisch aber schwächer ausgeprägt.

Das zweite Ergebnis war, dass die Reaktivität der Seren gegen die Antigene am stärksten war, die nicht dem Virustyp (RT-PCR) aus der akuten Phase der Infektion entsprachen. In Serum 343 (Abb. 15) war der Patient akut mit DENV-1 infiziert, der Antigen ELISA mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigte aber in der Serumprobe die höchsten Antikörpertiter gegen DENV-2 und DENV-3. Dagegen ist die Antwort gegen DENV-1 und DENV-4 ED3-Antigene am schwächsten. Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen ließ sich die Immunantwort somit gut differenzieren, während diese Serotyp-Differenzierung mit den WHO ED3-Antigenen nicht möglich war. Der mED3-Antikörpertest sowie der Neutralisationstest zeigten ebenfalls die höchsten Intensitäten für DENV-2 spezifische Antikörper obwohl der Patient mit DENV-1 infiziert war.

In Serum 14 (Abb. 16) war der Titer gegen die kolumbianischen ED3-Antigene für alle vier Antigene höher als mit den WHO ED3-Antigenen. Im kolumbianischen ED3-ELISA war der höchste Titer gegen DENV-3. Auch hier war die DENV-1 Immunantwort nicht dominierend, obwohl der Titer gegen DENV-1 der zweitstärkste war. Die Daten stimmen mit der Typisierung durch den mED3-Antikörpertest und dem Neutralisationstest überein. Der WHO ED3-Antigen ELISA zeigte für dieses Serum allerdings DENV-1 anstelle von DENV-3 an. Die Differenzen der DENV-1 und DENV-3 Typisierung waren aber in beiden Testen gering.

In Serum 364 (Abb. 17) war mit den WHO ED3-Antigenen keine Differenzierung zu beobachten. Die Titer gegen die WHO ED3-Antigene waren durchweg schwach  $< 0,6 \text{ OD}_{450\text{nm}}$ . Im Unterschied dazu waren die Titer gegen die kolumbianischen ED3-Antigene deutlich höher und zeigten Serotyp-spezifische Reaktivitäten ab einer Serumverdünnung von 1/600. Dabei war der Antikörpertiter für DENV-3 am höchsten. Auch hier stimmte die Typisierung mit den Vergleichsdaten aus dem mED3 Antikörpertest und der Virusneutralisation überein.

In Serum 108 (Abb. 18) war eine Differenzierung der DENV-Antikörperspezifität mit den WHO ED3-Antigenen möglich. Die Unterschiede traten aber mit den kolumbianischen ED3-Antigenen stärker zum Vorschein. Die Antikörper in Serumprobe 108 waren spezifisch gegen

DENV-1 und DENV-3 gerichtet, Antikörper gegen DENV-2 und DENV-4 konnten ebenfalls nachgewiesen werden, aber mit einem deutlich schwächeren Antikörpertiter. In dieser Serumprobe waren die Antikörpertiter gegen das DENV-2 aus der akuten Infektion in beiden ELISAs am niedrigsten.

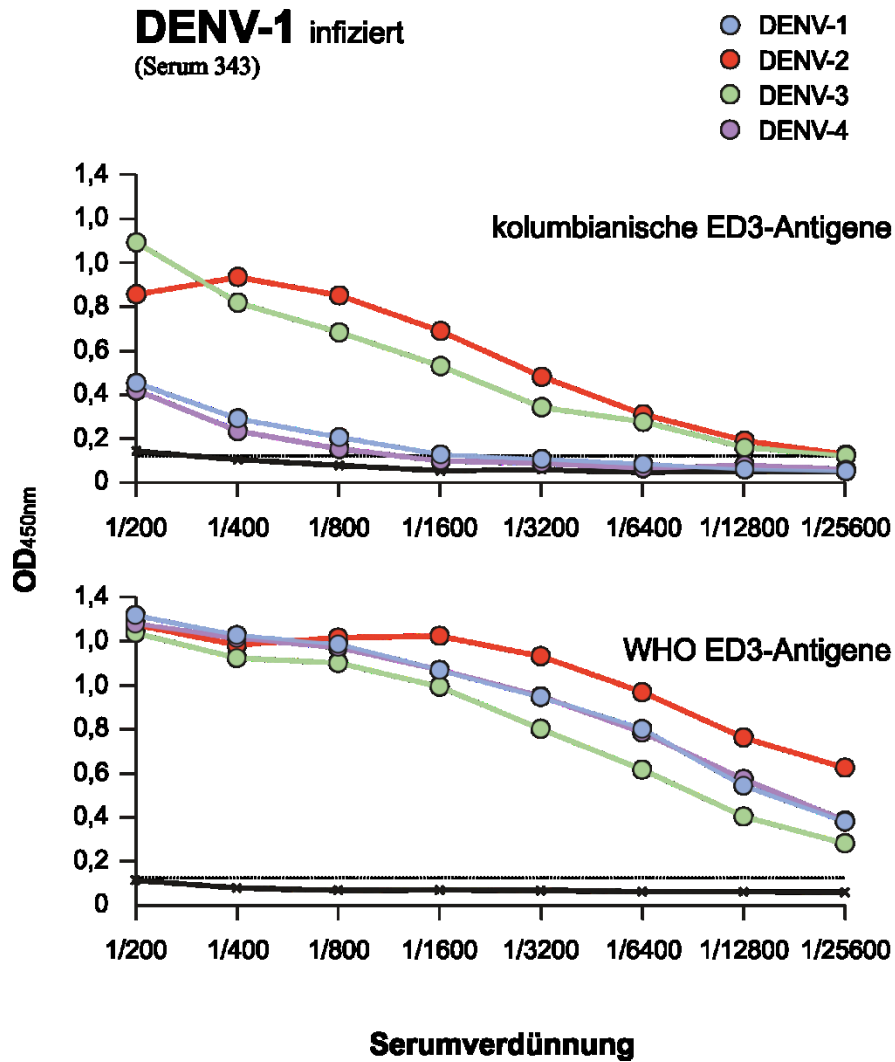
In Serum 19 (Abb. 19) wies der Antigen-ELISA mit den kolumbianischen ED3-Antigenen die höchsten Antikörpertiter gegen DENV-1 und DENV-3 auf, und in deutlich geringerem Maße gegen DENV-2 und DENV-4. Dabei reagierten die Antikörper in Serum 19 deutlich stärker gegen das kolumbianische ED3-Antigen des Serotyps 3 als das entsprechende WHO ED3-Antigen. Der mED3-Antikörpertest sowie der Neutralisationstest zeigten ebenfalls eine Antikörperspezifität für DENV-1. Auch in diesem Serum waren die Antikörpertiter gegen Antigene am höchsten, die nicht mit dem DENV-2 Serotyp der Infektion übereinstimmten.

In Serum 272 (Abb. 20) war eine Antikörper-Differenzierung gegenüber dem Virusnachweis für DENV-3 nicht möglich. Die DENV-3-spezifische Antigenreaktivität differenzierte sich nicht von den Reaktionen mit den DENV-2 und DENV-1 Antigenen. Hier waren die Daten der Virusneutralisation entscheidend, die zeigen, dass die Neutralisation gegen DENV-1 und DENV-2 dominierte und gegen das RT-PCR nachgewiesene DENV-3 schwächer ausgeprägt war.

In Serum 74 (Abb. 21) war der infizierende Virustyp DENV-4. In beiden Testen war der DENV-4 Antikörpertiter nicht dominierend. Eine Differenzierung zwischen DENV-4 und DENV-1, -2, und -3 war besonders intensiv mit den kolumbianischen ED3-Antigenen.

In Serum 348 (Abb. 22) war der infizierende Virustyp ebenfalls DENV-4 und in beiden Testen war der Antikörpertiter gegen die verwendeten DENV-4 ED3-Antigene am schwächsten. Dies zeigt wieder, dass der Titer gegen den Virustyp aus der akuten Phase der Infektion nicht die dominante Immunantwort ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl mit dem WHO ED3-Antigen ELISA und dem kolumbianischen ED3-Antigen ELISA gezeigt wurde, dass die Immunantwort gegen das Virus aus der akuten Phase der Infektion nicht die dominierende Antikörperantwort in den Patientenseren war.

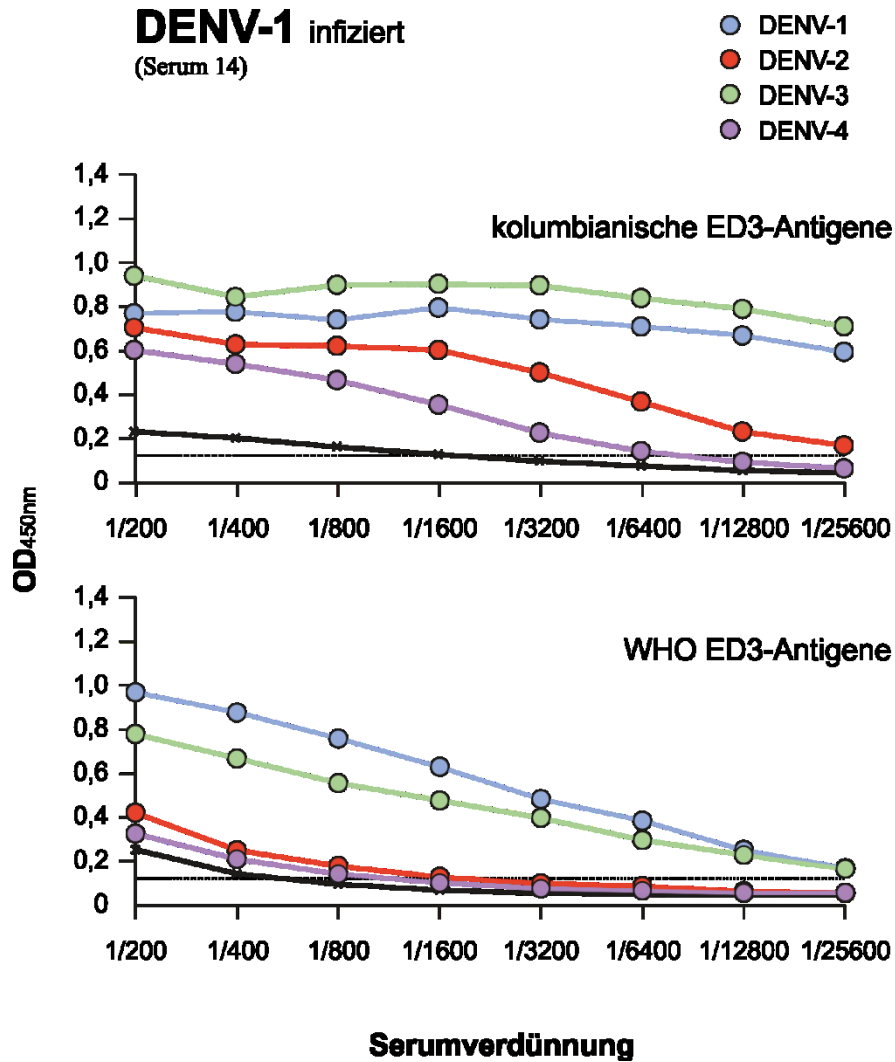


**Abb. 15: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-1 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 343).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigte sich für DENV-2 und DENV-3 der höchste Antikörpertiter. Der Titer gegen das DENV-1 aus der akuten Infektion war deutlich schwächer. Mit den WHO ED3-Antigenen war bei diesem Serum keine Differenzierung der DENV-spezifischen Immunantwort möglich.

**Serum 343-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-1			
mED3-Antikörpertest:	DENV-2			
FRNT90-Neutralisationstiter:	DENV-1	<b>DENV-2</b>	DENV-3	DENV-4
	640	<b>20480</b>	1280	5120

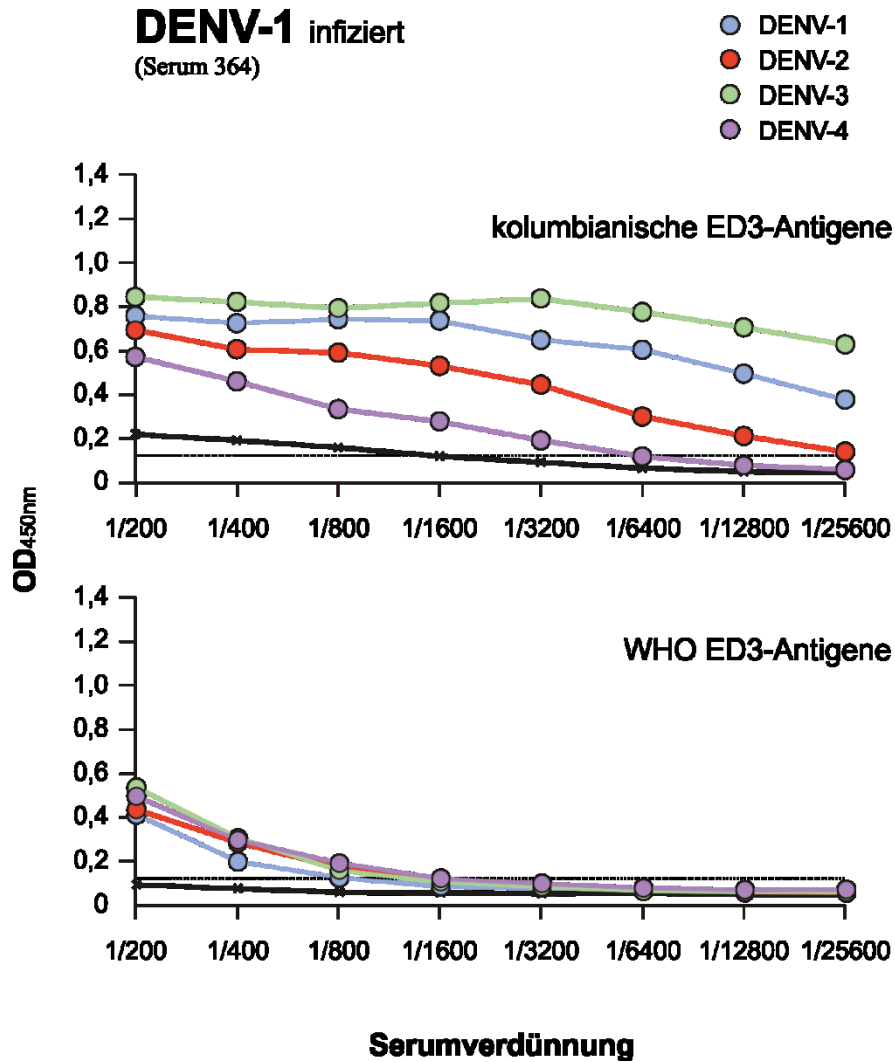


**Abb. 16: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-1 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 14).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigten sich für DENV-3 die höchsten Titer, was mit den mED3-Antikörpertest und dem Virusneutralisationstest übereinstimmt. Mit den WHO ED3-Antigenen war dagegen der DENV-1 Titer am höchsten.

**Serum 14-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-1			
mED3-Antikörpertest:	DENV-3			
FRNT90-Neutralisationstiter:	DENV-1	DENV-2	<b>DENV-3</b>	DENV-4
	2560	5120	<b>20480</b>	320

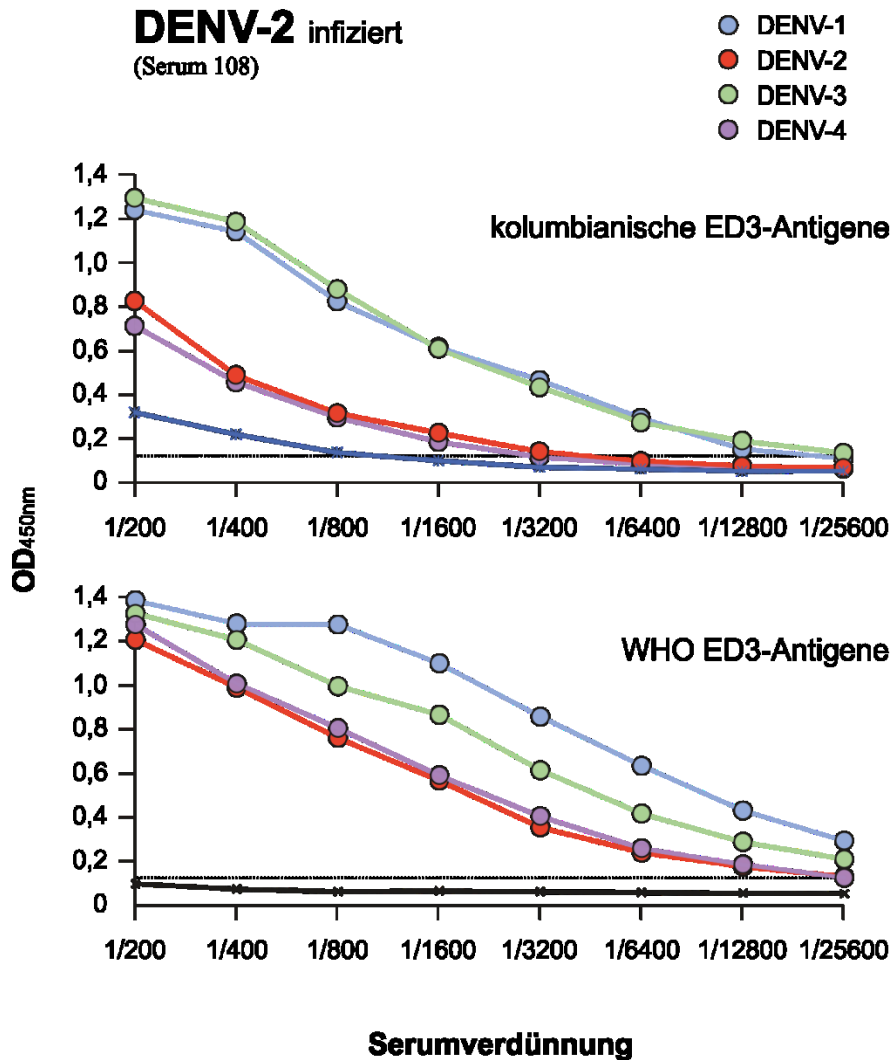


**Abb. 17: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-1 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 364).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigte sich für DENV-3 der höchste Antikörpertiter, gefolgt von DENV-1, DENV-2 und DENV-4. Mit den WHO ED3-Antigenen war eine Differenzierung der Antikörpertiter nicht zu beobachten.

**Serum 364-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-1			
mED3-Antikörpertest:	DENV-3			
FRNT90-Neutralisationstiter:	DENV-1	DENV-2	<b>DENV-3</b>	DENV-4
	640	1280	<b>2560</b>	640

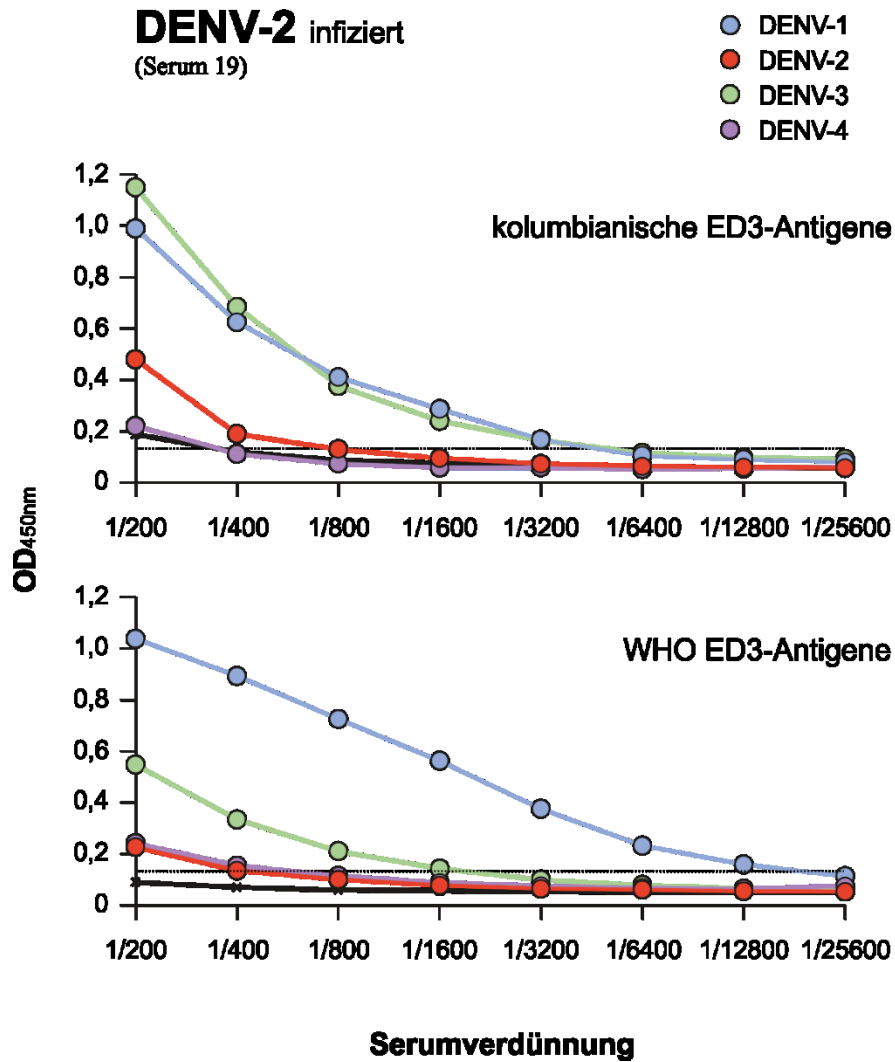


**Abb. 18: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-2 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 108).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigte sich für DENV-1 und DENV-3 der höchste Antikörpertiter. Der Titer gegen das DENV-2 aus der akuten Infektion war deutlich schwächer. Mit den WHO ED3-Antigenen war bei diesem Serum eine Differenzierung bei Serumverdünnungen von 1/800 bis 1/6400 möglich.

**Serum 108-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-2			
mED3-Antikörpertest:	DENV-1,2,3			
FRNT90-Neutralisationstiter:	<b>DENV-1</b>	DENV-2	DENV-3	DENV-4
	<b>10240</b>	2560	5120	2560



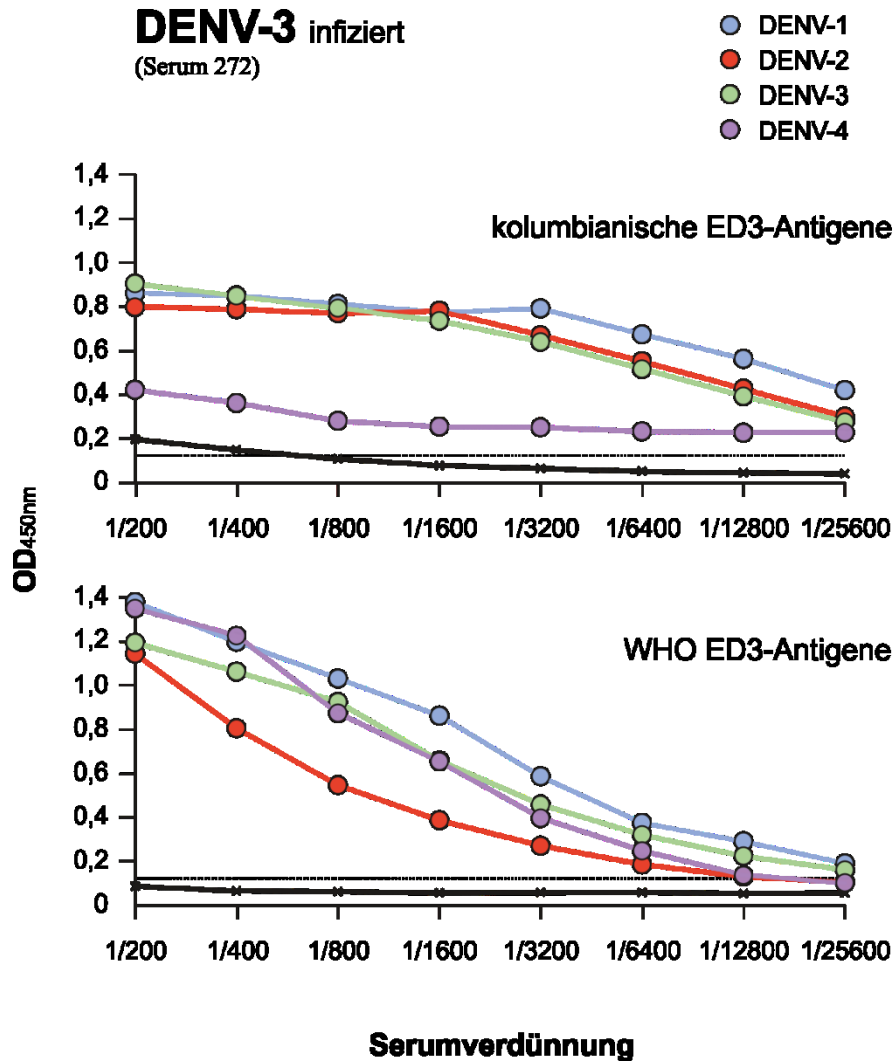
**Abb. 19: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-2 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 19).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigte sich für DENV-1 und DENV-3 der höchste Antikörpertiter. Der Titer gegen das DENV-2 aus der akuten Infektion war deutlich schwächer. Mit den WHO ED3-Antigenen war der Antikörpertiter für DENV-1 ebenfalls am höchsten gefolgt von DENV-3.

**Serum 19-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-2			
mED3-Antikörpertest:	DENV-1			
FRNT90-Neutralisationstiter:	<b>DENV-1</b>	DENV-2	DENV-3	DENV-4
	<b>10240</b>	2560	640	640



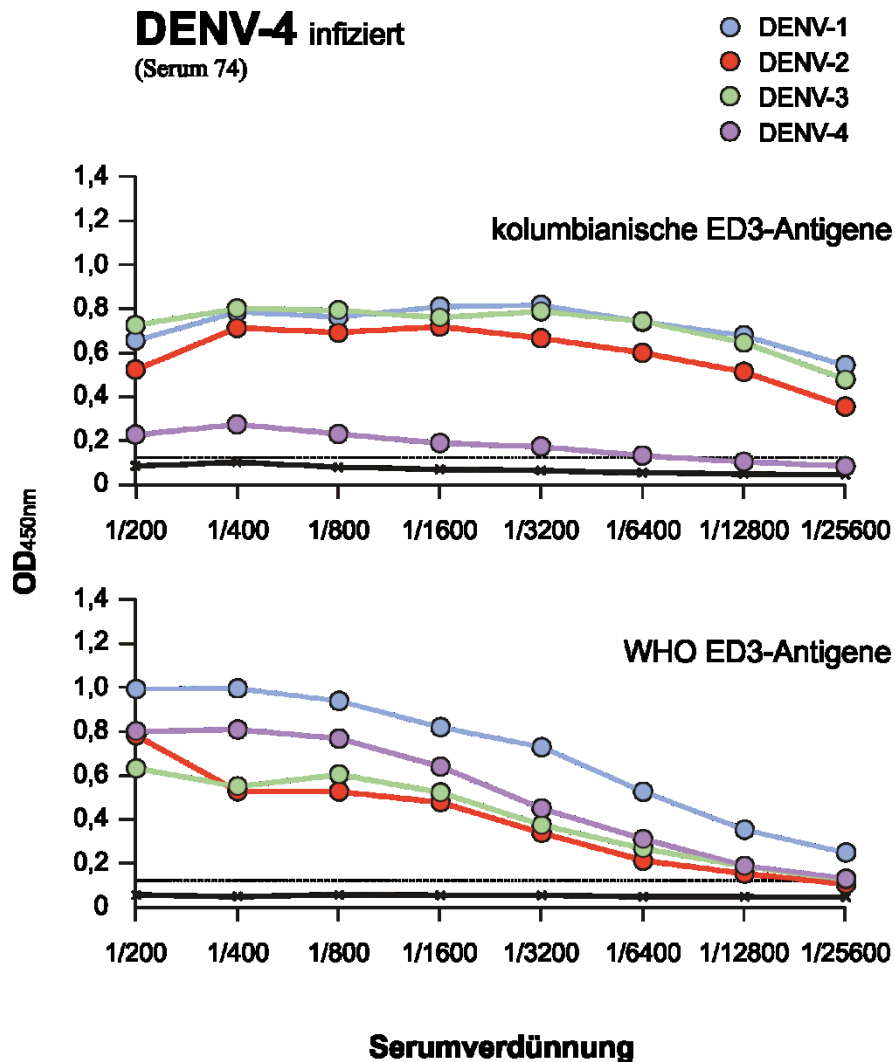


**Abb. 20: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-3 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 272).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen und den WHO-Antigenen war bei diesem Serum eine Differenzierung nicht möglich. Der DENV-2 Titer war allerdings bei den kolumbianischen ED3-Antigenen höher als bei den WHO ED3-Antigene, was zu den Daten der Virusneutralisation passt.

**Serum 272-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-3			
mED3-Antikörpertest:	DENV-1,3			
FRNT90-Neutralisationstiter:	<b>DENV-1</b>	<b>DENV-2</b>	DENV-3	DENV-4
	<b>5120</b>	<b>5120</b>	1280	2560

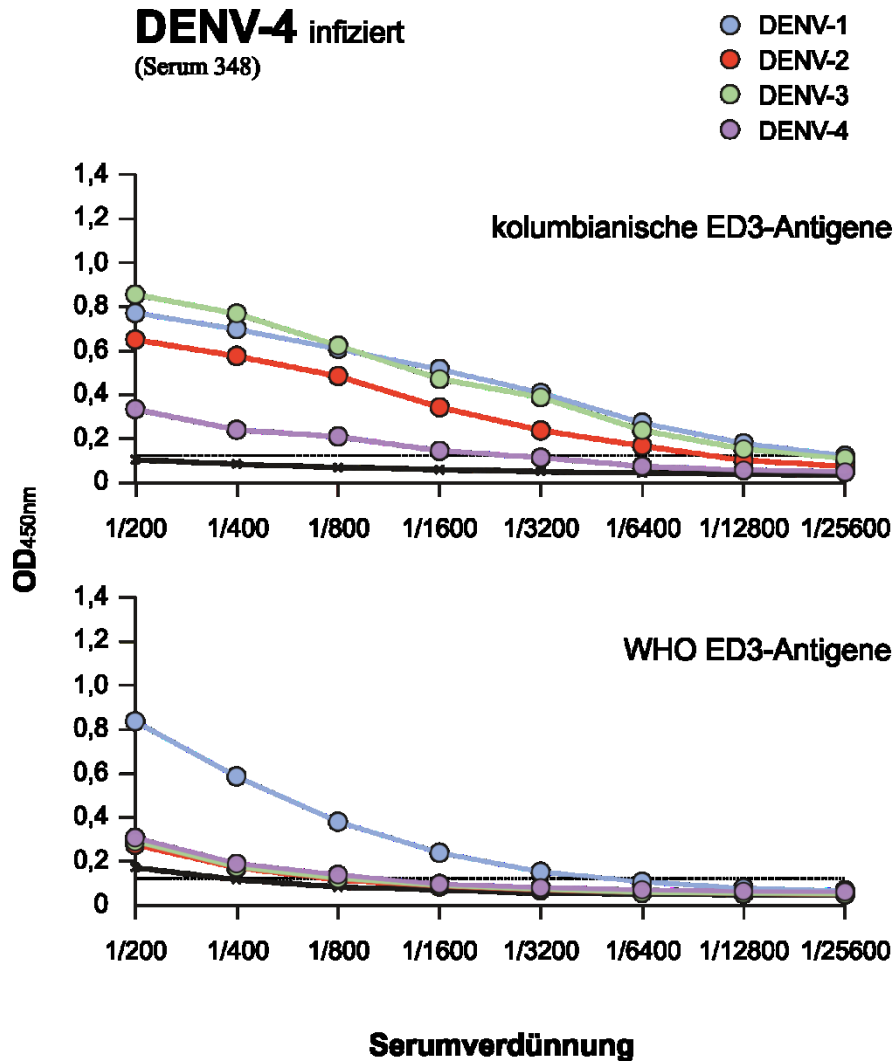


**Abb. 21: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-4 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 74).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigte sich für DENV-1, -2 und DENV-3 der höchste Antikörpertiter. Der Titer gegen das DENV-4 aus der akuten Infektion war deutlich schwächer. Diese Art der Differenzierung wurde mit den WHO ED3-Antigenen nicht beobachtet.

**Serum 74-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-4			
mED3-Antikörpertest:	DENV-1,3			
FRNT90-Neutralisationstiter:	DENV-1	<b>DENV-2</b>	DENV-3	DENV-4
	640	<b>2560</b>	640	640



**Abb. 22: DENV-spezifischer Antikörpernachweis im Serum eines DENV-4 infizierten Patienten aus Kolumbien (Serum 348).**

Mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigte sich für DENV-1, -3 und DENV-2 der höchste Antikörpertiter. Der Titer gegen das DENV-4 aus der akuten Infektion war deutlich schwächer. Mit den WHO ED3-Antigenen war der Antikörpertiter für DENV-1 ebenfalls am höchsten und für DENV-4 am niedrigsten.

**Serum 348-Vergleichsdaten:**

qRT-PCR-Virusnachweis:	DENV-4			
mED3-Antikörpertest:	-			
FRNT90-Neutralisationstiter:	<b>DENV-1</b>	DENV-2	DENV-3	DENV-4
	<b>10240</b>	2560	2560	320

## **4 Diskussion**

### **4.1 Auswahl der kolumbianischen ED3-Antigene für den ELISA**

Die Immunantwort gegen DENV ist sehr komplex, da sie kreuzreaktive und typspezifische Antikörper aufweist (W. Dejnirattisai *et al.*, 2010). Dengueviren werden anhand spezifischer Unterschiede bei der Quantifizierung serologischer Kriterien, z. B. der Virusneutralisation, in die vier Serotypen DENV-1-4 unterteilt (Porterfield *et al.*, 2008). Dabei ist der DENV-Serotyp das Virus, gegen den ein Serum den höchsten Neutralisationstiter zeigt. Die Unterteilung der DENV erfolgt direkt durch Neutralisationsteste mit standardisierten Seren oder indirekt durch die induzierte Immunantwort. Bei dem Neutralisationstest wird die Fähigkeit von DENV Serotyp-spezifischen monoklonalen Antikörpern benutzt um den DENV-Serotyp zu bestimmen. Monoklonale Antikörper gegen die ED3-Region sind stark neutralisierend (Crill & Roehrig, 2001) und daher ist die ED3-Region eine wichtige Neutralisationsdomäne, aber auch eine wichtige Domäne für die DENV-Serotypisierung. Eine Alternative zur Serotypisierung mit dem Neutralisationstest ist die Bestimmung der Antikörperspezifität in Seren. Ein Immun-ELISA, der Antigene der ED3-Region verwendet, kann als Ersatz für den aufwendigen Virusneutralisationstest dienen (Libraty, Zhang, Obcena, Brion, & Capeding, 2015b). Hierbei werden ED3-Antigene verschiedener Serotypen verwendet, die in Bakterien (Cardoso *et al.*, 2013) oder Hefen (Cardoso *et al.*, 2013) hergestellt wurden. Das Problem bei der Erfassung des DENV-Serotyps ist jedoch, dass auch innerhalb der einzelnen Serotyp-Gruppen genetische Variationen auftreten, die auch die ED3-Region betreffen. Daraus ergibt sich die Frage, wie die ED3-Antigene, welche zur Typisierung der Antikörperantwort verwendet werden, ausgesucht werden und ggf. besser angepasst werden könnten. Zur Typisierung werden meistens von der WHO vorgeschlagene DENV verwendet. Diese stammen aus Thailand, den Philippinen oder auch Hawaii.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die ED3-Region zur Typisierung der Immunantwort verwendet. In der Arbeitsgruppe existierte eine DENV-Serensammlung aus Kolumbien die bereits mit den WHO-Standards charakterisiert worden war und zu der auch RT-PCR Daten bekannt waren. Für diese Serensammlung sollte ein neues Set von ED3-Antigenen hergestellt werden. Vorteil dieser Serensammlung war, dass sie alle aus dem gleichen Land stammten und gut definiert waren. Die Daten zu dem DENV-Serotyp aus der akuten Phase der Infektion (RT-PCR) waren vorhanden, wie auch Daten zur Virusneutralisation (Auerswald, 2016) und zu den

Antikörperreaktivitäten mit WHO ED3-Antigen im ELISA (Kerstin Krausz, persönliche Mitteilungen, LG-Schreiber). Die bisherigen Ergebnisse mit den WHO ED3-Antigenen erlaubten nur in wenigen Fällen die Typisierung der DENV-spezifischen Immunantwort. Daher sollte getestet werden, ob der ED3-ELISA verbessert werden könnte. Im Unterschied zu den WHO-empfohlenen DENV-Varianten sollten daher ED3-Antigene für die vier DENV-Serotypen ausgewählt werden, welche DENV entsprechen, die aus dem gleichen Land wie die Seren stammten. Für die Auswahl wurden daher kolumbianische ED3-Sequenzen aus der bestehenden NCBI-Datenbank ausgewählt. Durch die Sequenzanalyse von 504 ED3-Sequenzen wurden Konsensus-Sequenzen ermittelt von denen ausgehend die kolumbianischen Sequenzen ausgewählt wurden. Es wurde darauf geachtet die Sequenzen auszuwählen, welche sich am meisten von den vier ermittelten Konsensus-Sequenzen unterschieden. Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da keine genauen Informationen über den Herkunftsort (Stadt, Bezirk) der Seren, sowie die am Patienten-Ort vorkommenden DENV-, bzw. ED3-Sequenzen zur Verfügung standen, sodass die ED3-Sequenzen nur passend zu dem Land Kolumbien ausgewählt werden konnten. Auch können aus der diagnostischen RT-PCR, die zur Bestimmung des DENV-Serotyps benutzt wurde, keine Rückschlüsse auf die Sequenz der ED3-Region gezogen werden.

#### **4.2 Antikörper-Antigen Spezifität**

Zum Nachweis der ED3-spezifischen IgG-Antikörper in Patientenserum wurden ED3-Sequenzen ausgewählt, die die meisten Abweichungen zu der ermittelten Konsensus-Sequenz besaßen. Die ausgewählten kolumbianischen ED3-Sequenzen hatten 4-6 Aminosäureaustausche in der 108-Aminosäuren-langen Sequenz der ED3-Region. Allerdings ist bekannt, dass bereits der Austausch einer Aminosäure im Hüllprotein eines Virus große Unterschiede bewirken kann. Am Beispiel des HIV-1 kann dies demonstriert werden. Es wurde gezeigt, dass der Austausch von zwei Aminosäuren im V3-Loop des HIV-1 gp120 (1. Austausch: S zu R an Position 306 und 2. Austausch: A zu T an Position 317, oder D zu Q an Position 320, oder D zu N an Position 324) ausreicht, um den Phänotyp des HIV-1 von CCR5-trop zu CXCR4-trop zu verändern. Hierbei korreliert das Auftreten des CXCR4-tropen Phänotyps mit einer rapiden Progression der HIV-Infektion und zu dem Entstehen des Krankheitsbildes AIDS (De Jong, De Ronde, Keulen, Tersmette, & Goudsmit, 1992). Dies zeigt, dass auch geringe Unterschiede in der Aminosäuresequenz großen Einfluss auf den veränderten Phänotyp haben.

Der gleiche Effekt wurde für die Interaktion von Antikörpern mit dem gp120-Hüllprotein beobachtet. So werden HIV-1-Varianten mit ein bis zwei Aminosäureaustauschen im V3-Loop des gp120 nicht mehr von neutralisierenden Antikörpern erkannt (Schreiber *et al.*, 1994). Da diese Varianten der Neutralisierung durch Antikörper aufgrund ihrer Mutationen entgehen, werden sie auch als Escape-Varianten bezeichnet und können sich im Patienten vermehren (Schreiber *et al.*, 1997). Der passende Antikörper fehlt und das Virus kann sich durchsetzen.

Somit ist auch beim Dengue-Virus zu erwarten, dass Mutationen innerhalb eines Serotyps dazu führen können, dass Antikörper die mutierte Variante nicht mehr neutralisieren können. In der Tat, ist in den untersuchten Seren die Neutralisation gegen das vorhandene Virus reduziert. Die Ergebnisse des Antigen-ELISA der Seren mit den kolumbianischen ED3-Antigenen im Vergleich zu den Ergebnissen mit den WHO ED3-Antigenen zeigten Unterschiede in der Erkennung durch Serumantikörper, welche nicht auf systematische Fehler (z. B. durch unterschiedliche Antigenbeschichtung der ELISA-Platten aufgrund von Verunreinigung mit MBP) zurückzuführen sind, da die Unterschiede bei verschiedenen Seren nicht gleich-gerichtet oder in gleicher „Titer-Höhe“ waren. Dies ist ein Indiz dafür, dass die drei bis sechs Unterschiede, die die kolumbianischen ED3-Sequenzen zu den WHO ED3-Sequenzen aufwiesen, ausreichen, damit die ED3-Antigene unterschiedlich stark mit den DENV-spezifischen Antikörpern im Serum reagieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zwar darauf hin, dass es für die Untersuchung der Immunantwort auf DENV-Infektionen notwendig ist Antigene zu verwenden, welche besser zu der Infektion des Patienten passen, allerdings muss dies in statistisch-signifikantem Maßstab validiert werden, indem mehr Seren mit unterschiedlichen ED3-Antigenen auf DENV-spezifische Antikörper untersucht werden. Idealerweise würde man für die Untersuchung von DENV-spezifischen Antikörpern die Antigene verwenden, aufgrund derer das Immunsystem des Patienten zuvor die Antikörper gebildet hatte. Dafür müssten allerdings die viralen RNA-Sequenzen früherer und aktueller DENV-Infektionen bekannt sein, was praktisch schwer durchführbar wäre. Alternativ könnte man allerdings für den Nachweis von DENV-spezifischen Antikörpern zumindest Antigene verwenden, welche typisch für die Region sind, aus der die zu untersuchenden Patientenseren stammen.

### 4.3 Antikörper Nachweis in Impfstudien

Aktuell steht die Denguevakzine Dengvaxia<sup>TM</sup> von Sanofi-Pasteur in der Kritik, denn auf den Philippinen ist es bei immunisierten Kindern zu Todesfällen gekommen, die mit der Immunisierung und einer danach durchlaufenden DENV-Infektion in Zusammenhang gebracht werden (Dans, Dans, Lansang, Silvestre, & Guyatt, 2018). Die Impfstrategie mit dem vierfach-Impfstoff Dengvaxia<sup>TM</sup> hat einen herben Rückschlag erlitten. Der Impfstoff hat eine kontraproduktive Wirkung: Anstatt den Probanden zu schützen verursacht er bei geimpften Personen mehr schwere Krankheitsverläufe als in der Gruppe der nicht-geimpften Personen. Dies ist besonders auffällig in der Gruppe der Kinder unter neun Jahren, die wahrscheinlich noch nie eine Dengue-Infektion durchgemacht haben. Das gleiche würde für Touristen gelten, die in DENV-verseuchte Gebiete reisen wollen und DENV Antikörper-negativ sind (Halstead & Aguiar, 2016). Die Immunisierung mit Virusantigenen, die einem weltweiten Konsensus entsprechen (den WHO-empfohlenen Sequenzen von DENV-1-4), scheint kontraproduktiv zu sein, wenn die Probanden vorher keine natürlich erworbene Immunität gegen die Viren aus ihrer Region entwickelt haben.

Der serologische Nachweis DENV Serotyp-spezifischer neutralisierender Antikörper ist daher sehr wichtig, da die Impfung gegen DENV nur bei Personen, welche DENV-spezifische Antikörper aufgrund einer vorherigen DENV-Infektion besitzen, ohne Risiken anwendbar ist. Personen, die DENV-spezifische Antikörper aufweisen, werden hierbei als seropositiv bezeichnet und Personen, bei denen diese fehlen, werden als seronegativ bezeichnet. Werden seronegative Personen geimpft, so besitzt die Impfung den adversen Effekt, sodass die geimpften Personen ein erhöhtes Risiko an schwerem Dengue-Fieber zu erkranken aufweisen, im Vergleich zu ungeimpften Personen, welche ebenfalls zuvor noch nicht mit DENV infiziert waren. Das Problem bei der Erfassung DENV-spezifischer Antikörper ist hierbei, dass es durch Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen andere Flaviviren zu falsch-positiven Ergebnissen kommen kann, während spezifische Antikörper-Nachweise ggf. eine geringere Sensitivität aufweisen und somit nicht alle seropositiven Personen, bei denen die Impfung angewendet werden könnte, erfassen (“Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations,” 2018). Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, wie komplex aber auch spezifisch die Immunantwort gegen DENV ist. In dem Test mit den kolumbianischen ED3-Antigenen zeigten alle Seren DENV-spezifische Reaktionen und können daher als

DENV-seropositiv betrachtet werden. Im Unterschied dazu zeigten die Seren teils schwache Reaktionen mit den WHO-Antigenen und ein Serum würde anhand der Resultate mit dem WHO ED3-Antigentest sogar als DENV-seronegativ diagnostiziert werden (Serum 364, Abb. 17). Dies zeigt, dass der kolumbianische ED3-Antigentest Vorteile hat. Er würde sich besonders gut für die Bestimmung der DENV-spezifischen Immunantwort vor und nach einer Impfung mit einem der Denguevirus Impfstoffkandidaten eignen. Damit könnte gezeigt werden, ob der Impfstoff die Immunantwort gegen alle DENV-Serotypen stimuliert.

Besonders wichtig scheint zu sein, dass sich bei infizierten Personen die DENV Serotyp-spezifische IgG-Immunantwort nicht präferenziell gegen das akute Virus richtet. Auch diese Hypothese konnte mit dem kolumbianischen ED3-Test weiter untermauert werden. Hieraus könnte man schlussfolgern, dass gezielt geimpft werden muss und zwar genau gegen die Viren die in den endemischen Regionen und Bezirken vorkommen. Dafür wäre es von Vorteil Antigene zu konstruieren, die genau den Strukturen auf diesen Viren entsprechen. Solche Daten könnten durch die Sequenzierung des viralen Genoms erhalten werden, das man z. B. vor Ort aus DENV-infizierten Mücken isolieren kann. Mit den heutigen gentechnischen Methoden wäre es ein Leichtes für jede Region einen genau passenden bi-, tri- oder tetravalenten DENV-Impfstoff herzustellen, ähnlich zu der Strategie im Kampf gegen die jährliche Influenza- bzw. Grippeepidemie (Doyle *et al.*, 2019).



## 5 Zusammenfassung

Für die Arbeit standen Seren von Denguevirus infizierten Patienten aus Kolumbien zur Verfügung. Diese Seren waren mit verschiedenen Virus und ED3-Antikörpertesten auf Denguevirus-spezifische Antikörper untersucht worden. Dazu wurden Viren und ED3-Antigene benutzt, welche den Denguevirus-Serotypen entsprachen, wie sie die WHO für die Serotypisierung empfiehlt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich der serologische Nachweis von Serotyp-spezifischen Antikörpern durch die Verwendung neuer Antigene, bzw. kolumbianischer ED3-Antigene, verbessern lässt. Die Arbeitshypothese war: Denguevirus-infizierte Patienten zeigen hohe Antikörpertiter gegen Dengueviren. Diese Antikörper sind aber hauptsächlich gegen Denguevirus-Serotypen gerichtet, die nicht dem Virustyp entsprechen, welcher in der akuten Phase der Infektion nachgewiesen wurde.

Zuerst wurden Sequenzvergleiche durchgeführt und für die vier Denguevirus-Serotypen wurde jeweils eine Konsensus-Sequenz ermittelt. Dazu wurden Aminosäuresequenzen der ED3-Region aus der NCBI-Datenbank übernommen. Für DENV-1 waren 160, für DENV-2 181, für DENV-3 100 und für DENV-4 63 ED3-Sequenzen verfügbar. Zur Ermittlung der Sequenzen für die kolumbianischen ED3-Antigene wurden die kolumbianischen Sequenzen analysiert und für jeden Denguevirus-Serotyp wurde eine Sequenz ausgewählt, welche die meisten Aminosäureunterschiede gegenüber der Konsensus-Sequenz aufwies.

Von jeder dieser vier ED3-Sequenzen wurden mit der Methode der *assembly*-PCR und synthetischen Oligonukleotiden die entsprechenden ED3-DNA-Fragmente synthetisiert. Diese ED3-DNA-Fragmente wurden in zwei verschiedene Expressionsvektoren, pMAL-p5x und pMAL-c5x, *in-frame* hinter das Gen für das Maltose-bindende-Protein (MBP) kloniert. Ein Vergleich der Expression von DENV-3 in pMAL-p5x und pMAL-c5x ergab die besten Ergebnisse für die Expression in dem Vektor mit der cytoplasmatischen Signalsequenz (pMAL-c5x). Daher wurden alle ED3-Antigene im Vektor pMAL-c5x exprimiert und aus den entsprechenden Bakterienlysaten affinitätschromatografisch aufgereinigt. Die Ausbeute für das DENV-3 MBP-ED3-Fusionsprotein (ED3<sup>3</sup>) war mit 2,75 mg/g Bakterien am höchsten, gefolgt von den MBP-ED3-Fusionsproteinen für DENV-1 (ED3<sup>1</sup>; 0,76 mg/g), DENV-2 (ED3<sup>2</sup>; 0,6 mg/g) und DENV-4 (ED3<sup>4</sup>; 0,43 mg/g).

Die gereinigten kolumbianischen ED3-Antigene wurden im Antigen-ELISA mit acht kolumbianischen Seren getestet. Alle Antigene zeigten spezifische Reaktionen im ELISA und

eignen sich somit für serologische Untersuchungen. Durch Vergleich der serologischen Daten mit den bereits existierenden Daten wurde gezeigt, dass eine verbesserte Differenzierung zwischen den Denguevirus-spezifischen Immunantworten möglich war. Durch die verbesserte Unterscheidung der Serotyp-spezifischen Antikörperantwort anhand der kolumbianischen ED3-Antigene konnte die Hypothese, dass die Immunantwort gegen den infizierenden Denguevirus-Serotyp schwach, aber gegen andere Serotypen dominant ist, weiter mit Daten untermauert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Auerswald H. 2016. *Analyse der neutralisierenden, humoralen Immunantwort nach natürlichen Infektionen mit Dengueviren.*
- Beatty ME. , Stone A. , Fitzsimons DW. , Hanna JN. , Lam SK. , Vong S. , Guzman MG. , Mendez-Galvan JF. , Halstead SB. , Letson GW. , Kuritsky J. , Mahoney R. , Margolis HS. 2010. Best practices in dengue surveillance: a report from the Asia-Pacific and Americas Dengue Prevention Boards. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e890.
- Byk LA. , Gamarnik A V. 2016. Properties and Functions of the Dengue Virus Capsid Protein. *Annu. Rev. Genet.* 3:263–281.
- Capeding MR. , Tran NH. , Hadinegoro SRS. , Ismail HIHM. , Chotpitayasunondh T. , Chua MN. , Luong CQ. , Rusmil K. , Wirawan DN. , Nallusamy R. , Pitisuttithum P. , Thisyakorn U. , Yoon I-K. , van der Vliet D. , Langevin E. , Laot T. , Hutagalung Y. , Frago C. , Boaz M. , Wartel TA. , Tornieporth NG. , Saville M. , Bouckennooghe A. 2014. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet* 384:1358–1365.
- Cardoso SA. , Paixão VF. , Oliveira MD. , Honda ER. , Oliveira LL. , da Silva CC. , De Paula SO. 2013. Dengue-1 envelope protein domain III produced in *Pichia pastoris*: Potential use for serological diagnosis. *Protein Expr. Purif.* 92:9–13.
- Chaudhury S. , Gromowski GD. , Ripoll DR. , Khavrutskii I V. , Desai V. , Wallqvist A. 2017. Dengue virus antibody database: Systematically linking serotype-specificity with epitope mapping in dengue virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:1–17.
- Coloma J. , Harris E. 2015. Broad and strong: the ultimate antibody to dengue virus. *Nat. Immunol.* 16:135–137.
- Crill WD. , Roehrig JT. 2001. Monoclonal Antibodies That Bind to Domain III of Dengue Virus E Glycoprotein Are the Most Efficient Blockers of Virus Adsorption to Vero Cells. *J. Virol.* 75:7769–7773.
- Dans AL. , Dans LF. , Lansang MAD. , Silvestre MAA. , Guyatt GH. 2018. Controversy and debate on dengue vaccine series—paper 1: review of a licensed dengue vaccine: inappropriate subgroup analyses and selective reporting may cause harm in mass vaccination programs. *J. Clin. Epidemiol.* 95:137–139.
- de Alwis R. , Smith SA. , Olivarez NP. , Messer WB. , Huynh JP. , Wahala WMPB. , White LJ. , Diamond MS. , Baric RS. , Crowe JE. , de Silva AM. 2012. Identification of human neutralizing antibodies that bind to complex epitopes on dengue virions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:7439–7444.
- De Jong JJ. , De Ronde A. , Keulen W. , Tersmette M. , Goudsmit J. 1992. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J. Virol.* 66:6777–80.
- Dejnirattisai W. , Jumnainsong A. , Onsirirakul N. , Fitton P. , Vasanawathana S. , Limpitikul W. , Puttikhunt C. , Edwards C. , Duangchinda T. , Supasa S. , Chawansuntati K. , Malasit P. , Mongkolsapaya J. , Screaton G. 2010. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science* 328:745–748.
- Dejnirattisai W. , Jumnainsong A. , Onsirirakul N. , Fitton P. , Vasanawathana S. , Limpitikul W. , Puttikhunt C. , Edwards C. , Duangchinda T. , Supasa S. , Chawansuntati K. , Malasit P. , Mongkolsapaya J. , Screaton G.

2010. Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. *Science* (80-. ). 328:745–748.
- Doyle JD. , Chung JR. , Kim SS. , Gaglani M. , Raiyani C. , Zimmerman RK. , Nowalk MP. , Jackson ML. , Jackson LA. , Monto AS. , Martin ET. , Belongia EA. , McLean HQ. , Foust A. , Sessions W. , Berman L. , Garten RJ. , Barnes JR. , Wentworth DE. , Fry AM. , Patel MM. , Flannery B. 2019. Interim Estimates of 2018–19 Seasonal Influenza Vaccine Effectiveness — United States, February 2019. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 68:135–139.
- Fahimi H. , Sadeghizadeh M. , Hassan ZM. , Auerswald H. , Schreiber M. 2018. Immunogenicity of a novel tetravalent dengue envelope protein domain III-based antigen in mice. *EXCLI J.* 17:1054–1068.
- Fibriansah G. , Tan JL. , Smith SA. , de Alwis AR. , Ng T-S. , Kostyuchenko VA. , Ibarra KD. , Wang J. , Harris E. , de Silva A. , Crowe JE. , Lok S-M. 2014. A potent anti-dengue human antibody preferentially recognizes the conformation of E protein monomers assembled on the virus surface. *EMBO Mol. Med.* 6:n/a-n/a.
- Flipse J. , Dioso-Toro MA. , Hoornweg TE. , van de Pol DPI. , Urcuqui-Inchima S. , Smit JM. 2016. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. *Sci. Rep.* 6:29201.
- Gromowski GD. , Roehrig JT. , Diamond MS. , Lee JC. , Pitcher TJ. , Barrett ADT. 2010. Mutations of an antibody binding energy hot spot on domain III of the dengue 2 envelope glycoprotein exploited for neutralization escape. *Virology* 407:237–246.
- Halstead SB. , Aguiar M. 2016. Dengue vaccines: Are they safe for travelers? *Travel Med. Infect. Dis.* 14:378–383.
- Klei TR. 1986. Laboratory diagnosis. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 2:381–393.
- Libraty DH. , Zhang L. , Obcena A. , Brion JD. , Capeding RZ. 2015a. Anti-dengue virus envelope protein domain III IgG ELISA among infants with primary dengue virus infections. *Acta Trop.* 142:103–107.
- Libraty DH. , Zhang L. , Obcena A. , Brion JD. , Capeding RZ. 2015b. Anti-dengue virus envelope protein domain III IgG ELISA among infants with primary dengue virus infections. *Acta Trop.* 142:103–107.
- Patterson J. , Sammon M. , Garg M. 2016. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West. J. Emerg. Med.* 17:671–679.
- Porterfield JS. , Brandt WE. , Shope RE. , Westaway EG. , Karabatsos N. , Calisher CH. , Dalrymple JM. 2008. Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *J. Gen. Virol.* 70:37–43.
- Premkumar L. , Collins M. , Graham S. , Liou G-JA. , Lopez CA. , Jadi R. , Balmaseda A. , Brackbill JA. , Dietze R. , Camacho E. , De Silva AD. , Giuberti C. , dos Reis HL. , Singh T. , Heimsath H. , Weiskopf D. , Sette A. , Osorio JE. , Permar SR. , Miley MJ. , Lazear HM. , Harris E. , de Silva AM. 2017. Development of Envelope Protein Antigens To Serologically Differentiate Zika Virus Infection from Dengue Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* 56:.
- Ramanathan B. , Poh CL. , Kirk K. , McBride WJH. , Aaskov J. , Grollo L. 2016. Synthetic B-Cell epitopes eliciting cross-neutralizing antibodies: Strategies for future dengue vaccine. *PLoS One* .
- Schreiber M. , Müller H. , Wachsmuth C. , Laue T. , Hufert FT. , Van Laer MD. , Schmitz H. 1997. Escape of HIV-1 is associated with lack of V3 domain-specific antibodies in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 107:15–20.
- Schreiber M. , Petersen H. , Wachsmuth C. , Müller H. , Hufert FT. , Schmitz H. 1994. Antibodies of symptomatic

human immunodeficiency virus type 1-infected individuals are directed to the V3 domain of noninfectious and not of infectious virions present in autologous serum. *J. Virol.* 68:3908–3916.

Shamala DS. 2015. Laboratory diagnosis of dengue: A review. *Int. Med. J. Malaysia* 14:17–28.

Tuiskunen Bäck A. , Lundkvist Å. 2013. Dengue viruses – an overview. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 3:19839.

Wahala WMPB. , Huang C. , Butrapet S. , White LJ. , de Silva AM. 2012. Recombinant dengue type 2 viruses with altered e protein domain III epitopes are efficiently neutralized by human immune sera. *J. Virol.* 86:4019–4023.

Wahala WMPB. , Silva AM De. 2011. The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses* 3:2374–2395.

2018. Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 – Recommendations. *Vaccine* .

**7 Anhang**  
**7.1 Denguesequenzen (GenBank-Nummern und Herkunftsländer)**  
**7.1.1 DENV-1 Sequenzen**

FJ639687	Kambodscha	JQ045665P	Vietnam	KT438573	Brasilien
FJ639690	Kambodscha	JQ045666P	Vietnam	KT438574	Brasilien
FJ639691	Kambodscha	JQ045667P	Vietnam	KT438575	Brasilien
FJ639692	Kambodscha	JQ045668P	Vietnam	KT438576	Brasilien
FJ639693	Kambodscha	JQ581617	Kolumbien	KT438577	Brasilien
JN036371	Bangladesch	JQ581618	Kolumbien	KT438578	Brasilien
JQ045626	Vietnam	JQ581625	Kolumbien	KT438579	Brasilien
JQ045628	Vietnam	JQ581626	Kolumbien	KT438580	Brasilien
JQ045629	Vietnam	JQ581628	Kolumbien	KT438581	Brasilien
JQ045630	Vietnam	JQ581648	Kolumbien	KT438582	Brasilien
JQ045631	Vietnam	JQ581649	Kolumbien	KT438583	Brasilien
JQ045632	Vietnam	JQ581650	Kolumbien	KT438584	Brasilien
JQ045633	Vietnam	JQ581651	Kolumbien	KT438585	Brasilien
JQ045634	Vietnam	JQ581652	Kolumbien	KT438586	Brasilien
JQ045635	Vietnam	KP188539	Brasilien	KT438587	Brasilien
JQ045636	Vietnam	KP188540	Brasilien	KT438588	Brasilien
JQ045637	Vietnam	KP188541	Brasilien	KT438589	Brasilien
JQ045638	Vietnam	KP188543	Brasilien	KT445955	SriLanka
JQ045639	Vietnam	KP188544	Brasilien	KT445956	SriLanka
JQ045640	Vietnam	KP188546	Brasilien	KT445957	SriLanka
JQ045641	Vietnam	KP188547	Brasilien	KT445958	SriLanka
JQ045642	Vietnam	KP723473	China	KT445959	SriLanka
JQ045643	Vietnam	KP723474	China	KT445960	SriLanka
JQ045644	Vietnam	KP723475	China	KT445961	SriLanka
JQ045645	Vietnam	KP723476	China	KT445962	SriLanka
JQ045646	Vietnam	KP723477	China	KT445963	SriLanka
JQ045647	Vietnam	KT187559	China	KT452791	Myanmar
JQ045648P	Vietnam	KT187560	China	KU094071	China
JQ045649	Vietnam	KT187561	China	KU509249	Jamaica
JQ045650	Vietnam	KT187562	China	KU509250	Thailand
JQ045651	Vietnam	KT187563	China	KU509251	Venezuela
JQ045652	Vietnam	KT187564	China	KU509252	Venezuela
JQ045653P	Vietnam	KT382186	Venezuela	KU509253	Indonesien
JQ045654P	Vietnam	KT382187	Bolivien	KU509254	Venezuela
JQ045655P	Vietnam	KT438563	Brasilien	KU509255	Indien
JQ045656P	Vietnam	KT438564	Brasilien	KU509256	Thailand
JQ045657	Vietnam	KT438565	Brasilien	KU509257	Thailand
JQ045658	Vietnam	KT438566	Brasilien	KU509258	Eritrea
JQ045659	Vietnam	KT438567	Brasilien	KU509259	Thailand
JQ045660	Vietnam	KT438568	Brasilien	KU509260	Kambodscha
JQ045661	Vietnam	KT438569	Brasilien	KU509261	Indonesien
JQ045662	Vietnam	KT438570	Brasilien	KU509262	Thailand
JQ045663P	Vietnam	KT438571	Brasilien	KU509263	Thailand
JQ045664P	Vietnam	KT438572	Brasilien	KU509264	Haiti

KU509265	?	KU509310	SriLanka	KU672339	China
KU509266	Thailand	KU509311	Brasilien	KU672340	China
KU509289	Thailand	KU509312	Nicaragua	KU672341	China
KU509290	Thailand	KU509313	Singapur	KU672342	China
KU509291	Thailand	KU509314	Thailand	KY709127	Philippinen
KU509292	Vietnam	KU509315	Philippinen	KY709128	Philippinen
KU509293	China	KU509316	Thailand	KY709129	Philippinen
KU509294	Thailand	KU672336	China	LC062957	Japan
KU509295	PuertoRico	KU672337	China	MF797878	Philippinen
KU509309	Indonesien	KU672338	China		

### 7.1.2 DENV-2 Sequenzen

KU509270	?	KT438603	Brasilien	FJ639698	Kambodscha
JN036372	Bangladesch	KT438604	Brasilien	FJ639699	Kambodscha
JN036373	Bangladesch	KT438605	Brasilien	FJ639700	Kambodscha
JN036374	Bangladesch	KT438606	Brasilien	FJ639701	Kambodscha
JN036375	Bangladesch	KT438607	Brasilien	FJ639702	Kambodscha
JN036376	Bangladesch	KT438608	Brasilien	FJ639703	Kambodscha
JN036377	Bangladesch	KT438609	Brasilien	FJ639704	Kambodscha
JN036378	Bangladesch	KT438610	Brasilien	FJ639705	Kambodscha
JN036379	Bangladesch	KT438611	Brasilien	FJ639706	Kambodscha
JN036380	Bangladesch	KT438612	Brasilien	FJ639707	Kambodscha
JQ686088	Brasilien	KT438613	Brasilien	FJ639708	Kambodscha
JX286516	Brasilien	KT438614	Brasilien	FJ639709	Kambodscha
JX286517	Brasilien	KT438615	Brasilien	FJ639710	Kambodscha
JX286518	Brasilien	KT438616	Brasilien	FJ639711	Kambodscha
JX286519	Brasilien	KT438617	Brasilien	FJ639717	Kambodscha
JX286520	Brasilien	KT438618	Brasilien	FJ639718	Kambodscha
JX286521	Brasilien	KP012546	China	KT452795	Kambodscha
JX286522	Brasilien	KP723478	China	KU878564	Kolumbien
JX286523	Brasilien	KP723479	China	KU878567	Kolumbien
JX286524	Brasilien	KT187553	China	KU878568	Kolumbien
JX286525	Brasilien	KT187554	China	KU878569	Kolumbien
JX286526	Brasilien	KT187555	China	KU878570	Kolumbien
KT382189	Brasilien	KT187556	China	KU878571	Kolumbien
KT438590	Brasilien	KT187557	China	KU878572	Kolumbien
KT438591	Brasilien	KT187558	China	KU878573	Kolumbien
KT438592	Brasilien	KU094070	China	KU878574	Kolumbien
KT438593	Brasilien	JX080289	Gabon	KU878575	Kolumbien
KT438594	Brasilien	KU509267	Guatemala	JX966379	Mexiko
KT438595	Brasilien	KT382188	Guyana	KJ850334	Pakistan
KT438596	Brasilien	KU509271	Indien	KJ850335	Pakistan
KT438597	Brasilien	KU509306	Indien	KJ850336	Pakistan
KT438598	Brasilien	AB180478	Indonesien	KJ850337	Pakistan
KT438599	Brasilien	KU509268	Indonesien	KP757106	Pakistan
KT438600	Brasilien	KU509305	Indonesien	KP757107	Pakistan
KT438601	Brasilien	KU509308	Indonesien	KP757108	Pakistan
KT438602	Brasilien	FJ639697	Kambodscha	KP757109	Pakistan

KP757110	Pakistan	KP757134	Pakistan	KP757168	Pakistan
KP757111	Pakistan	KP757135	Pakistan	KP757170	Pakistan
KP757112	Pakistan	KP757136	Pakistan	KP757171	Pakistan
KP757113	Pakistan	KP757137	Pakistan	KP757172	Pakistan
KP757114	Pakistan	KP757138	Pakistan	KP757173	Pakistan
KP757115	Pakistan	KP757139	Pakistan	KP757174	Pakistan
KP757116	Pakistan	KP757140	Pakistan	KU509269	Philippinen
KP757117	Pakistan	KP757141	Pakistan	KU509274	Philippinen
KP757118	Pakistan	KP757142	Pakistan	KU509275	Philippinen
KP757119	Pakistan	KP757143	Pakistan	KU509276	Philippinen
KP757120	Pakistan	KP757145	Pakistan	KU509277	Philippinen
KP757121	Pakistan	KP757146	Pakistan	KY709130	Philippinen
KP757122	Pakistan	KP757147	Pakistan	KY709131	Philippinen
KP757123	Pakistan	KP757148	Pakistan	KY709132	Philippinen
KP757124	Pakistan	KP757149	Pakistan	JX966380	Puerto Rico
KP757125	Pakistan	KP757150	Pakistan	KU509307	Tansania
KP757126	Pakistan	KP757151	Pakistan	KU509272	Thailand
KP757127	Pakistan	KP757152	Pakistan	KU509273	Thailand
KP757128	Pakistan	KP757153	Pakistan	JQ045670	Vietnam
KP757129	Pakistan	KP757154	Pakistan	JQ045684	Vietnam
KP757130	Pakistan	KP757155	Pakistan	JQ045686	Vietnam
KP757131	Pakistan	KP757156	Pakistan	KT452796	Vietnam
KP757132	Pakistan	KP757166	Pakistan	KT452797	Vietnam
KP757133	Pakistan	KP757167	Pakistan		

### 7.1.3 DENV-3 Sequenzen

KJ922394	?(Afrika)	FJ639712	Kambodscha	FJ189451	Kolumbien
JN036381	Bangladesch	FJ639713	Kambodscha	FJ189452	Kolumbien
JN036382	Bangladesch	FJ639714	Kambodscha	FJ189453	Kolumbien
JN036383	Bangladesch	FJ639715	Kambodscha	FJ189454	Kolumbien
JN036384	Bangladesch	FJ639716	Kambodscha	FJ189455	Kolumbien
JN036385	Bangladesch	FJ639719	Kambodscha	FJ189456	Kolumbien
JN036386	Bangladesch	FJ639720	Kambodscha	FJ189457	Kolumbien
JN036387	Bangladesch	FJ639721	Kambodscha	FJ189458	Kolumbien
JN036388	Bangladesch	FJ639722	Kambodscha	FJ189459	Kolumbien
JN036389	Bangladesch	FJ639723	Kambodscha	FJ189460	Kolumbien
JN036390	Bangladesch	FJ639724	Kambodscha	FJ189461	Kolumbien
JN036391	Bangladesch	FJ639725	Kambodscha	FJ189462	Kolumbien
JN036392	Bangladesch	FJ639726	Kambodscha	FJ189463	Kolumbien
JN036393	Bangladesch	FJ639727	Kambodscha	FJ189464	Kolumbien
JN036394	Bangladesch	FJ639728	Kambodscha	FJ189465	Kolumbien
JN036395	Bangladesch	FJ639729	Kambodscha	FJ189466	Kolumbien
KU509278	Barbados	FJ639730	Kambodscha	FJ189467	Kolumbien
JN697379	Brasilien	FJ639731	Kambodscha	FJ189468	Kolumbien
FJ189469	Honduras	GQ868628	Kambodscha	LT898451	Malaysien
KU509281	Indien	GQ868629	Kambodscha	LT898452	Malaysien
KU509286	Indien	KT452799	Kambodscha	KT452792	Myanmar
KT452798	Indonesien	FJ189450	Kolumbien	HQ235027	Paraguay

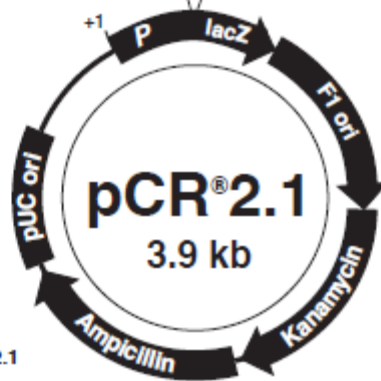
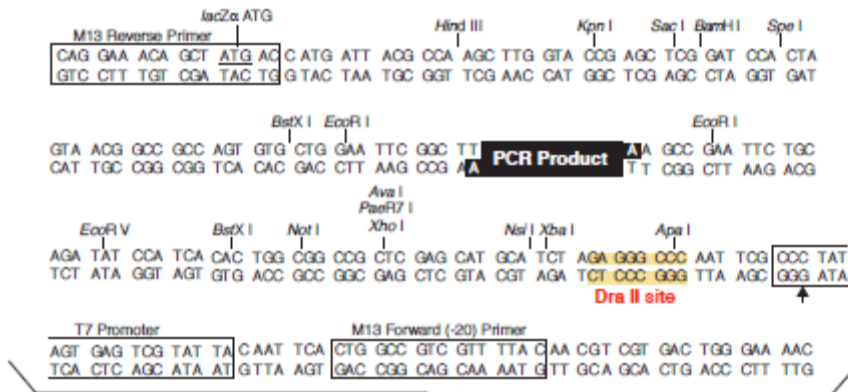


KU509279	Philippinen	KU509284	Thailand	JQ045690	Vietnam
KY709133	Philippinen	KU509285	Thailand	JQ045691	Vietnam
KY709134	Philippinen	KU509302	Thailand	JQ045692	Vietnam
KY709135	Philippinen	KU509303	Thailand	JQ045693	Vietnam
KT452800	PuertoRico	KU509304	Thailand	JQ045694	Vietnam
KU509282	Senegal	JQ045687	Vietnam	JQ045695	Vietnam
FJ189449	Sri Lanka	JQ045688	Vietnam	KU509302	Thailand
KU509283	Sri Lanka	JQ045689	Vietnam	KU509303	Thailand
KX518570	Sri Lanka	JQ045690	Vietnam	KU509304	Thailand
KX518571	Sri Lanka	JQ045691	Vietnam	JQ045687	Vietnam
KX518572	Sri Lanka	JQ045692	Vietnam	JQ045688	Vietnam
KX518573	Sri Lanka	JQ045693	Vietnam	JQ045689	Vietnam
KX518574	Sri Lanka	JQ045694	Vietnam	JQ045690	Vietnam
KX518575	Sri Lanka	JQ045695	Vietnam	JQ045691	Vietnam
KX518576	Sri Lanka	KU509302	Thailand	JQ045692	Vietnam
KX518577	Sri Lanka	KU509303	Thailand	JQ045693	Vietnam
KX518578	Sri Lanka	KU509304	Thailand	JQ045694	Vietnam
KX518579	Sri Lanka	JQ045687	Vietnam	JQ045695	Vietnam
KX518580	Sri Lanka	JQ045688	Vietnam	KU509302	Thailand
KU509280	Thailand	JQ045689	Vietnam	KU509303	Thailand

#### 7.1.4 DENV-4 Sequenzen

KC009632	Kolumbien	KF955528	Kambodscha	KP292931	Vietnam
KC009633	Kolumbien	KP292911	Vietnam	KP294214	China
KC009634	Kolumbien	KP292912	Vietnam	KP723480	China
KC009635	Kolumbien	KP292913	Vietnam	KP723481	China
KC009636	Kolumbien	KP292914	Vietnam	KP723482	China
KC009637	Kolumbien	KP292915	Vietnam	KT452793	Myanmar
KC009638	Kolumbien	KP292916	Vietnam	KT452794	Brasilien
KC009639	Kolumbien	KP292917	Vietnam	KT452801	Indonesien
KC009640	Kolumbien	KP292918	Vietnam	KT452802	Kambodscha
KF955509	Venezuela	KP292919	Vietnam	KT452803	Nicaragua
KF955510	Kambodscha	KP292920	Vietnam	KU509287	Indien
KF955511	Kambodscha	KP292921	Vietnam	KU509288	Indonesien
KF955514	Kambodscha	KP292922	Vietnam	KU509296	Thailand
KF955516	Kambodscha	KP292923	Vietnam	KU509297	Philippinen
KF955517	Thailand	KP292924	Vietnam	KU509298	Italien
KF955518	Thailand	KP292925	Vietnam	KU509299	Thailand
KF955519	Thailand	KP292926	Vietnam	KU509300	Thailand
KF955520	Thailand	KP292927	Vietnam	KU509301	Brasilien
KF955521	Thailand	KP292928	Vietnam	KX147336	Thailand
KF955522	Thailand	KP292929	Vietnam	KY709136	Philippinen
KF955527	Kambodscha	KP292930	Vietnam	KY924607	Vietnam

## 7.2 Klonierungsvektor pCR2.1



Comments for pCR<sup>®</sup>2.1  
3929 nucleotides

lacZα gene: bases 1-545  
M13 Reverse priming site: bases 205-221  
T7 promoter: bases 362-381  
M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404  
f1 origin: bases 546-983  
Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111  
Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989  
pUC origin: bases 3134-3807

## 7.3 Klonierungsvektor pMAL-c5x

### pMAL-p5X Polylinker:

```

5' ma7E...CTC GGG ATC GAG GGA AGG ATT TCA CAT ATG TCC ATG GGC GGC CGC GAT ATC
      AvaI      XmnI      NdeI      NcoI      NotI      EcoRV
      Sall      BamHI      EcoRI      SbfI
GTC GAC GGA TCC GAA TTC CCT GCA GGT AAT TAA ATA A...
  
```

### pMAL-p5E Polylinker:

```

5' ma7E...CTC GGG GAT GAC GAT GAC AAG GTA CCG CAT ATG TCC ATG GGC GGC CGC
      AvaI      KpnI      NdeI      NcoI      NotI
      EcoRV      Sall      BamHI      EcoRI      SbfI
GAT ATC GTC GAC GGA TCC GAA TTC CCT GCA GGT AAT TAA ATA A...
  
```

### pMAL-p5G Polylinker:

```

5' ma7E...CTC GGG CCG GGT GCG GCA CAC TAC GTA CAT ATG TCC ATG GGC GGC CGC
      AvaI      SnaBI      NdeI      NcoI      NotI
      EcoRV      Sall      BamHI      EcoRI      SbfI
GAT ATC GTC GAC GGA TCC GAA TTC CCT GCA GGT AAT TAA ATA A...
  
```

Created with SnapGene®

