

Herstellung und Untersuchung von Hepatitis E Virus-ähnlichen Partikeln zur serologischen Differenzierung der Genotypen 1 - 4

von Carina Dallmayr, geb. Stowasser

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Herstellung und Untersuchung von
Hepatitis E Virus-ähnlichen Partikeln
zur serologischen Differenzierung der
Genotypen 1 - 4**

von Carina Dallmayr, geb. Stowasser
aus Dachau

München 2016

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Virologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Angefertigt am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und
Lebensmittelsicherheit

Mentor: Priv.-Doz. Dr. Armin Baiker

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Korreferenten: Priv.-Doz. Dr. Karin Weber
Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 06. Februar 2016

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Das Hepatitis E Virus.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Geschichte des Hepatitis E Virus.....	3
2.	Taxonomie des Hepatitis E Virus	5
3.	Aufbau und Virusgenom des Hepatitis E Virus	6
4.	Virale Transkription und Morphogenese des Hepatitis E Virus.....	7
5.	Übertragungswege des Hepatitis E Virus	9
5.1.	Nicht-Zoonotisch.....	10
5.2.	Zoonotisch.....	10
5.2.1.	Das Hausschwein	11
5.2.2.	Das Wildschwein.....	13
5.2.3.	Andere Tierarten	14
6.	Klinik	15
7.	Pathogenese.....	17
8.	Diagnostik	18
8.1.	Direkter Nachweis.....	19
8.2.	Indirekter Nachweis	20
9.	Behandlung	21
10.	Prophylaxe	21
11.	Impfstoff.....	21
12.	Epidemiologie	22
13.	Kapsid-Assemblierung.....	24
III.	MATERIAL UND METHODEN	26
1.	Glas- und Kunststoffwaren	26
2.	Geräte	26
3.	Puffer, Lösungen, Medien	27

4.	Chemikalien	28
5.	Reagenzienansätze und Kits.....	29
6.	Plasmide und Bacmide.....	29
7.	Baculoviren	30
8.	Zellen	30
9.	Restriktionsenzyme und Primer	30
10.	Antikörper.....	30
11.	Gateway-Klonierung.....	31
11.1.	BP-Reaktion	31
11.2.	LR-Reaktion	32
12.	Baculovirales Proteinexpressionssystem	33
13.	Molekularbiologische Methoden.....	35
13.1.	Herstellung der Expressionsvektoren mit der Gateway-Technologie.....	35
13.2.	Transformation	36
13.2.1.	Transformation des Expressionsklons in <i>E. coli</i> Top10.....	37
13.2.2.	Transformation der Expressionsklone in <i>E. coli</i> DH10Bac	37
13.3.	Präparation von Plasmid-DNA	38
13.3.1.	Minipräparation (1,5 ml Kultur).....	38
13.3.2.	Maxipräparation (500 ml Kultur).....	39
13.3.3.	Herstellung von Glycerolstocks	39
13.3.4.	Quantitative Nukleinsäureanalyse.....	39
13.4.	Überprüfung der Integrität des inserierten Transgens.....	40
13.4.1.	Restriktionsverdau mit BsrGI	40
13.4.2.	PCR mit pUC/M13-Primern	40
13.4.3.	Qualitative Nukleinsäureanalyse.....	42
13.5.	Sequenzierung	42
14.	Zellkulturverfahren	43
14.1.	Kultivierung von Sf9- und Sf9ET-Insektenzellen.....	43
14.2.	Zellzahlbestimmung	43
14.3.	Vitalitätsbestimmung	43
15.	Virologische Methoden	44
15.1.	Herstellung rekombinanter Baculoviren durch Bacmid-Transfektion	44

15.2.	Ernte der rekombinanten Baculoviren.....	45
15.3.	Titration der Virusstocks mit Sf9ET-Insektenzellen.....	46
15.4.	Amplifikation rekombinanter Baculoviren	47
15.5.	Ernte des P1-Virusstocks	48
15.6.	Baculovirale Proteinexpression in Sf9-Insektenzellen.....	48
15.7.	Ernte der rekombinanten ORF2-Proteine.....	48
16.	Proteinchemische Methoden	49
16.1.	Proteaseinhibition mit PMSF	49
16.2.	SDS-PAGE.....	49
16.3.	Coomassie-Färbung.....	50
16.4.	Western Blot.....	50
16.5.	Elektronenmikroskopie	51
16.5.1.	Aufreinigung durch PEG-Fällung	51
16.5.2.	Nachweis im Elektronenmikroskop	51
IV.	ERGEBNISSE	52
1.	Herstellung der Expressionsvektoren pDEST8–ORF2	52
1.1.	Restriktionsanalyse der pDEST8–ORF2–Plasmide	52
1.2.	Sequenzierung der pDEST8–ORF2–Plasmide	53
2.	Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA.....	54
2.1.	Transformation der Expressionsvektoren in <i>E. coli</i> DH10Bac	54
2.2.	Qualitätskontrolle der rekombinanten Bacmid-DNA	54
2.3.	Sequenzierung der ORF2-Inserts	55
2.4.	Amplifikation der rekombinanten Bacmid-DNA (Maxipräp)	55
3.	Herstellung der rekombinanten Baculoviren	56
3.1.	Transfektion der Sf9-Insektenzellen mit rekombinanter Bacmid-DNA	56
3.2.	Titration der P0- und P1-Virusstocks.....	56
4.	Baculovirale Proteinexpression und Proteinnachweis.....	58
4.1.	Infektion der Sf9-Insektenzellen mit den rekombinanten Baculoviren zur Proteinexpression	58
4.2.	Coomassie-Färbung.....	58
4.3.	Nachweis der ORF2-Proteine im Western Blot	59
4.3.1.	Immundetektion mit Humanserum	59
4.3.2.	Immundetektion mit monoklonalem Maus-Antikörper	61

4.4.	Nachweis der HEV-VLPs im Elektronenmikroskop	63
V.	DISKUSSION	64
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	69
VII.	SUMMARY	71
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	72
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	92
X.	TABELLENVERZEICHNIS	94
XI.	DANKSAGUNG	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

²	zum Quadrat
3'-Ende	C3-Atom des Zuckers, an welchem freie OH-Gruppe gebunden ist
5'-Ende	C5-Atom des Zuckers, an welchem Phosphatrest gebunden ist
/	pro, oder, beziehungsweise
%	Prozent
∞	unendlich
°C	Grad Celsius
λ	Lambda
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
A549	Zelllinie eines humanen Lungenzellkarzinoms
AcMNPV	Baculovirus <i>Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus</i>
Ak	Antikörper
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase
AS, aa	Aminosäure (engl. amino acid)
att	Bindungsstelle (engl. attachment site)
Bac	bakterielles artifizielles Chromosom
Bluo-Gal	5-Bromo-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid
BSA	Bovines Serum Albumin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise

cm	Zentimeter
CPE	zytopathischer Effekt (engl. cytopathic effect)
d	Tag(e)
DH10Bac	<i>Escherichia coli</i> Bakterien, die der Produktion rekombinanter Baculovirus-Moleküle dienen
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced</i>)
ELISA	enzymgekoppelter, immunvermittelter Test (engl. enzymelinked immunosorbent assay)
engl.	Englisch
FBS	fötales bovines Serum
FHF	fulminante Hepatitis (engl. fulminant hepatic failure)
g	Gramm
G-418	Geneticin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. green fluorescent protein)
G-Protein	Glykoprotein
GT	Genotyp(en)
h	Stunde(n)
HEV	Hepatitis E Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase)
H ₂ O	Wasser (destilliert)
IFN	Interferon(e)

IfSG	Infektionsschutzgesetz
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IHF	Integration Host Factor
Int	Integrase
<i>in vitro</i>	Latein: im Glas, also Prozesse, die im Reagenzglas oder ganz allgemein außerhalb lebender Organismen ablaufen
<i>in vivo</i>	Latein: im Lebenden, also Abläufe, die im lebenden Organismus stattfinden
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kana	Kanamycin
kb	Kilobase
l	Liter
<i>LacZα</i> -Gen	bei Erhalt des Gens erfolgt in Anwesenheit von Bluo-Gal und Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid die Blaufärbung von Bakterienkolonien (<i>LacZ₊</i>)
LB	<i>Luria Bertani</i> , Bakterienkulturmedium
M	Mol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute(n)
Mini- <i>att</i> Tn7	Bindungsstelle für das Transposon Tn7
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter

MOI	Anzahl der Viruspartikel pro Zelle (engl. multiplicity of infection)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NaOH	Natronlauge
N-terminal	aminoterminal
ORF	offener Leserahmen (engl. open reading frame)
P1	Virusstock nach der Transfektion (erste Passage)
P2	Virusstock nach der Amplifikation (zweite Passage)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (engl. phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
pDEST8	Donorplasmid
PEG	Polyethylenglycol
PenStrep	Penicillin Streptomycin
pENTR	Vektor zur Umklonierung
pfu	Plaque bildende Einheiten (engl. plaque forming units)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxidionen-Konzentration (<i>potentia Hydrogenii</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung (engl. Relative centrifugal force)
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase (engl. RNA-dependent RNA polymerase)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
Rnase	Ribonuklease, Enzym, welches die Hydrolyse von Ribonukleinsäuren in kleinere Fragmente katalysiert

rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S.	Seite
s.u.	siehe unten
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
Sf9	Insektenzellen: <i>Spodoptera frugiperda</i>
Sf9ET	Insektenzellen: <i>Spodoptera frugiperda</i> Easy Titer
shRNA	RNA-Molekül, das zur künstlichen Stilllegung von Genen genutzt werden kann (engl. small hairpin RNA)
S.O.C.	Salzgehalt-optimiertes Medium mit Zusatz von Glukose (engl. salt-optimized broth + Carbon)
T-Zellen	T-Lymphozyten
Taq	thermophile gramnegative Bakterienart <i>Thermus aquaticus</i>
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (engl. Tris Buffered Saline)
TCID50/ml	Konzentrationsstufe des Virusstocks, welche mit je 1 ml 50% der Zellkulturen infiziert (engl. tissue culture infectious dose)
TE	Tris-EDTA
TMB	Tetramethylbenzidin
Tn7	bakterielles Transposon
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris-HCl	Trishydroxymethylaminomethan-Hydrochlorid
U	Umdrehungen
Units	Einheiten

UV	ultraviolett
V	Volt
Verd.	Verdünnung
vgl.	vergleiche
VLP(s)	virus-like particle(s)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)
x	-mal, -fach
xg	relative Zentrifugalbeschleunigung
Xis	Exzisionase

I. EINLEITUNG

1. Das Hepatitis E Virus

Die Hepatitis E ist eine weltweit vorkommende, infektiöse Lebererkrankung des Menschen, welche durch das Hepatitis E Virus verursacht wird.

Das Hepatitis E Virus spielt sowohl in Entwicklungsländern, als auch in industrialisierten Ländern eine bedeutende Rolle, da es der häufigste Erreger sogenannter non-A-non-B-Hepatitiden ist. Wesentlich ist, dass es zwei geographisch verschiedene Verbreitungsarten des Virus gibt. In Entwicklungsländern wird das Hepatitis E Virus vor allem fäkal-oral durch verschmutztes Trinkwasser übertragen, was große Epidemien zur Folge hat. In den Industrienationen tritt Hepatitis E nur sporadisch auf und wurde lange Zeit als Reisekrankheit eingestuft. In den letzten Jahren konnten allerdings vermehrt autochthone Erkrankungsfälle dokumentiert werden. Die Krankheit ist in Deutschland seit 2001 meldepflichtig nach IfSG §6. Meldepflicht besteht bei Krankheitsverdacht, der Erkrankung sowie dem Tod an akuter Hepatitis. Zudem besteht Meldepflicht beim Nachweis einer akuten HEV-Infektion durch das Labor nach IfSG §7. Da es sich bei Hepatitis E um eine meist selbstlimitierende Erkrankung mit unspezifischen Symptomen handelt, wird von einer sehr hohen Dunkelziffer nicht gemeldeter bzw. nicht diagnostizierter Fälle ausgegangen.

Des Weiteren wurde das Virus in verschiedenen Tierarten nachgewiesen, wobei dem Schwein die bedeutendste Rolle zukommt. Epidemiologische und phylogenetische Forschungsergebnisse zeigen, dass das Hepatitis E Virus eine Zoonose ist und über den Verzehr roher oder unzureichend gegarter Fleischprodukte und Innereien infizierter Schweine übertragen werden kann. Es besteht weiterhin Forschungsbedarf zum Vorkommen des Hepatitis E Virus in Nutztierbeständen sowie in Fleisch- und Wurstwaren. Auch die tatsächliche Gefährdung des Menschen, genaue Daten zur Durchseuchung der Gesamtbevölkerung und spezieller Risikogruppen ist bzw. sind durch das Fehlen geeigneter Testsysteme bisher nur in Grundzügen bekannt.

Momentan sind in der Humanmedizin drei gängige Testsysteme zum Nachweis von HEV-IgG-Antikörpern kommerziell verfügbar, welche auf rekombinantern,

bakteriell exprimierten HEV-Antigenen basieren. Dabei handelt es sich um den „HEV IgG ELISA“ von Axiom Diagnostics (Worms), um den „recomLine HEV IgG/IgM“ Immunoblot von Mikrogen (Neuried) und um den „HEV ELISA“ von MP Diagnostics (Genf, Schweiz). Da die Angaben zur HEV-Seroprävalenz von Menschen, welche in den Industrienationen leben, stark schwanken (0,3% - 53%), wurde der Grund dafür in den verschiedenen Testsystemen vermutet. In einer kürzlich veröffentlichten Vergleichsstudie mit 200 Probandenserien konnte gezeigt werden, dass zwischen diesen drei Testsystemen große Differenzen bezüglich der Sensitivität zu verzeichnen waren. Die Seroprävalenz variierte von 29,5% (Axiom Diagnostics) über 18% (Mikrogen) bis hin zu 4,5% (MP Diagnostics) (WENZEL et al., 2013).

Diese Doktorarbeit soll dazu beitragen, verbesserte Testsysteme zum Nachweis von anti-HEV-IgG-Antikörpern zu entwickeln. Hierfür ist die Herstellung sogenannter Virus-ähnlicher Partikel („virus-like particles“, VLPs) des Hepatitis E Virus, kurz HEV-VLPs, ein vielversprechender Ansatz. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Untersuchung der zoonotisch übertragbaren HEV Genotypen 3 und 4.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Geschichte des Hepatitis E Virus

Hepatitis-Erkrankungen mit fäkal-oralem Übertragungsweg, wie z.B. durch verschmutztes Trinkwasser, wurden früher dem Hepatitis-A-Virus zugeordnet. Erst 1980 konnte in einer Studie gezeigt werden, dass es sehr wahrscheinlich noch einen weiteren bisher unbekannten Hepatitis-Erreger gibt. In dieser Studie wurden konservierte Patientenserien aus dem Jahre 1955 und 1956 ausgewertet. Die Seren stammten von Patienten aus Delhi in Indien, wo zu dieser Zeit eine Hepatitis-Epidemie infolge einer Überschwemmung ausgebrochen war (WONG et al., 1980). Auch in den 1980er Jahren traten in Asien, dem mittleren Osten und Nordafrika fäkal-oral übertragbare Hepatitis-Epidemien von unbekannter Genese auf. Es konnte zudem ausgeschlossen werden, dass es sich um das bereits seit einigen Jahren bekannte Hepatitis-A-Virus handelt. Erst im Jahre 1983 gelang es dem russischen Virologen Mikhail Balayan, sich selbst mit dem neuen Hepatitis-Erreger durch orale Aufnahme einer Stuhlprobe zu infizieren und das Virus aus seiner eigenen Stuhlprobe im Immunelektronenmikroskop nachzuweisen (BALAYAN et al., 1983). Zunächst sprach man von der enterically transmitted non-A non-B Hepatitis (ET-NANBH). In einer Studie von 1988 wurde der Stuhl dreier Patienten mit akuter ET-NANBH untersucht und virusähnliche Partikel mit einem Durchmesser von 32 nm nachgewiesen. Zwei der drei Proben wurden daraufhin genauer untersucht und zeigten spezifische Bindungsreaktionen mit Antikörpern aus den Proben früherer ET-NANBH-Patienten aus Asien, der Sowjetunion, Nordamerika und Nordafrika. Außerdem wurden Affen experimentell mit jener Probe infiziert und zeigten eine Serokonversion. Somit wurde gezeigt, dass ein Virus oder eine Virusklasse der Erreger der ET-NANBH ist (BRADLEY et al., 1988). Zwei Jahre später gelang die Klonierung und Sequenzierung von Teilen des viralen Genoms (REYES et al., 1990). In einer retrospektiven Studie zur Seroepidemiologie konnte nachgewiesen werden, dass von 17 wasserübertragenen Hepatitis-Epidemien in Indien 16 durch das ET-NANBH-Virus verursacht wurden (ARANKALLE et al., 1994).

Im Jahre 1991 gelang das Klonieren und Sequenzieren des Virus und das identifizierte Virus wurde als Hepatitis-E-Virus benannt (PURCELL & EMERSON, 2008).

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass auch die experimentelle Infektion des Hausschweins (*Sus scrofa domestica*) mit humanem, aus Asien stammendem HEV möglich ist (BALAYAN et al., 1990). Ein Jahr später wurden Hausschweine mit humanen HEV-Proben von Patienten aus der ehemaligen UdSSR experimentell auf oralem und/oder auf intravenösem Wege infiziert. Es wurde gezeigt, dass es auch zur Übertragung von Schwein zu Schwein kam und sich die Krankheitssymptome durch den Einsatz von Immunsuppressiva verstärkten (USMANOV et al., 1991).

Während einer Hepatitis E-Epidemie im Jahre 1989 wurden 23 Nager verschiedener Spezies (4 Turkestan-Ratten, 15 Hausmäuse, 4 Waldmäuse) im Umkreis von einem km gefangen und auf Hepatitis E untersucht. Bei fünf der Nager konnte das Hepatitis E-Virus nachgewiesen werden. Unter experimentellen Bedingungen wurden daraufhin sieben weiße Mäuse mit einem humanen HE-Virus infiziert und bei allen Tieren konnte eine spezifische Serokonversion sowie die Virusausscheidung mit den Faeces nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Erkenntnisse ging man davon aus, dass Nager wesentlich an der Verbreitung des HE-Virus beteiligt sein könnten (KARETNYI IU et al., 1993).

1997 wurde in Schweinen ein neues HEV entdeckt, das sogenannte Schweine-HEV. Die Beprobung einer amerikanischen Schweineherde ergab, dass die Mehrzahl der Tiere ab einem Alter von drei Monaten seropositiv war. Es konnte gezeigt werden, dass das porzine HEV mit humanen HEV-Antikörpern kreuzreagierte. Beim Vergleich der beiden Genomsequenzen wurde die enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen humanen und porzinen HEV-Stämmen deutlich. Dieser Erkenntnis folgte erstmals der Gedanke, welches zoonotische Potential das Hepatitis E Virus aufweist (MENG et al., 1997). Noch heute beschäftigen sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit dieser nach wie vor aktuellen Fragestellung.

2. Taxonomie des Hepatitis E Virus

Das Hepatitis E Virus wurde früher zu den Caliciviridae gezählt, da seine Oberflächenstruktur im Elektronenmikroskop den Caliciviren ähnlich ist. Nach weiteren Untersuchungen der Genomstruktur und des Replikationszyklus zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede zu den Caliciviren. Im Jahre 2000 wurde das HEV aus der Klasse der Caliciviridae entfernt und gehörte vorübergehend keiner Virusklasse an (GREEN et al., 2000). Aktuell ist es der monogenerischen Familie der Hepeviridae und dem Genus Hepevirus zugeordnet (PURCELL & EMERSON, 2008). Das Hepatitis E Virus wird taxonomisch in vier Genotypen unterteilt, welche als Genotypen 1, 2, 3 und 4 bezeichnet werden. In den letzten Jahren wurden zudem neue Erreger-Stämme in Ratten, Frettchen, Füchsen und Fledermäusen nachgewiesen, welche sich genetisch stärker von den bisher klassifizierten Genotypen unterscheiden (PONTERIO et al., 2014). Sie sind aktuell noch nicht taxonomisch kategorisiert. Die vier Genotypen sind wiederum unterteilt in Subtypen, wovon Genotyp 3 die größte Diversität aufweist (s. Tab. 1). Nach heutigem Wissensstand existiert nur ein Serotyp des Hepatitis E Virus.

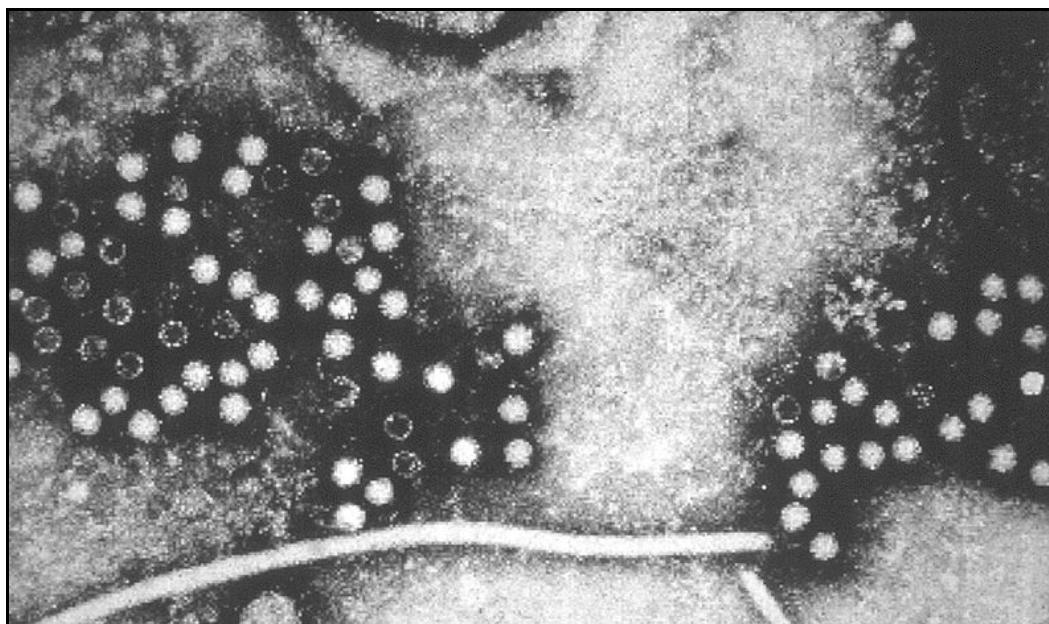


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hepatitis E Viren (SCHULTHEIS et al., 2013)

3. Aufbau und Virusgenom des Hepatitis E Virus

Das HEV ist ein unbehülltes Einzelstrang-RNA-Virus von positiver Polarität. Die gesamte Genomlänge beläuft sich auf circa 7,2 kb (CAO & MENG, 2012).

Am 3'Ende befindet sich ein Poly(A)-Schwanz. Am 5'Ende ist eine Cap-Struktur vorhanden. Kurze, nicht-kodierende Sequenzen sind sowohl am 5'Ende als auch am 3'Ende vorhanden. Das Virusgenom beinhaltet drei offene Leserahmen (ORFs, engl. *open reading frames*), die teilweise überlappen (AYE et al., 1992; AYE et al., 1993).

ORF1 befindet sich am 5'Ende des HEV-Genoms. Das Polyprotein, für welches ORF1 kodiert, besteht aus ca. 1690 Aminosäuren und wird posttranslational in mehrere, für die Virusreplikation erforderliche Nichtstrukturproteine gespalten. Bei diesen Nichtstrukturproteinen handelt es sich um eine Guanylyl-Methyltransferase, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, eine dem Papain ähnliche Cysteinprotease und eine RNA-Helikase. ORF2 liegt am 3'Ende des HEV-Genoms und codiert für das Strukturprotein, welches aus 660 Aminosäuren besteht (HE et al., 1997; SURJIT et al., 2004). ORF3 überlappt ausschließlich mit ORF2 und nicht, wie lange angenommen, mit ORF1 (HUANG et al., 2007). ORF3 codiert für ein kleines, multifunktionelles Phosphoprotein, welches aus 114 Aminosäuren besteht. Das ORF3-Protein ist noch nicht vollkommen entschlüsselt. Die Interaktion des ORF3-Proteins mit dem ORF2-Protein lässt vermuten, dass ORF3 an der korrekten strukturellen Anordnung als Regulator beteiligt ist, da das ORF3-Protein nur an nicht-glykosyliertes ORF2-Protein bindet. (TYAGI et al., 2002). Die C-terminale Region des ORF3-Proteins scheint zudem an der Morphogenese und Pathogenese des HE-Virus beteiligt zu sein (TYAGI et al., 2005). In neueren Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass das ORF3-Protein vermutlich essentiell für den Austritt der Viren aus infizierten Zellen ist (YAMADA et al., 2009; CAO & MENG, 2012).

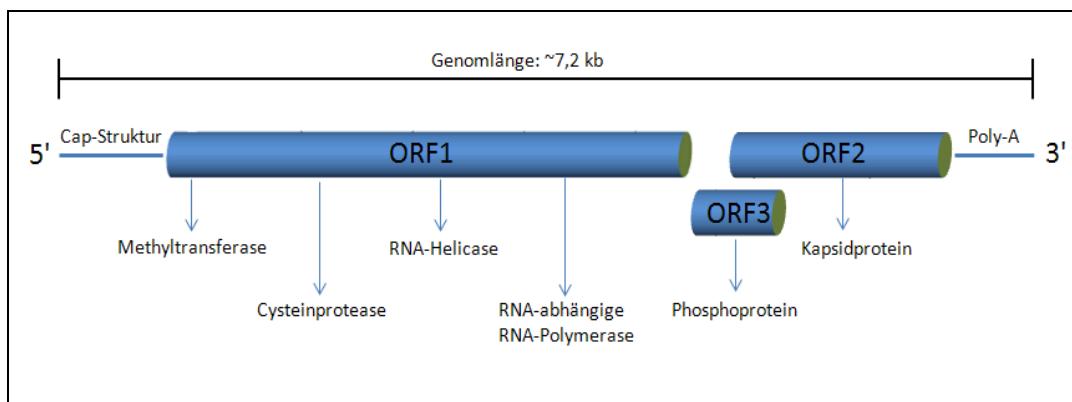


Abbildung 2: Anordnung und Funktion der drei ORFs im HEV-Genom. ORF1 kodiert für Nichtstrukturproteine, die zur Virusreplikation erforderlich sind; ORF2 kodiert für das Strukturprotein und überlappt mit ORF3, welches vermutlich an Morphogenese und Pathogenese beteiligt ist. ORF = offener Leserahmen (open reading frame); kb = Kilo-Basenpaar(e)

Bisher sind weltweit vier humanpathogene Genotypen und vierundzwanzig Subtypen bekannt (LU et al., 2006).

Genotypen	Subtypen	
	Anzahl	Nomenklatur
Genotyp 1	5	1a, 1b, 1c, 1d, 1e
Genotyp 2	2	2a, 2b
Genotyp 3	10	3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j
Genotyp 4	7	4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g

Tabelle 1: Die vier humanpathogenen Genotypen und deren Subtypen (LU et al., 2006)

4. Virale Transkription und Morphogenese des Hepatitis E Virus

Der Lebenszyklus des Hepatitis E Virus ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Die Forschung wird vor allem dadurch erschwert, da bisher noch keine geeigneten Methoden zur Kultivierung des Hepatitis E Virus *in vitro* gefunden wurden. Sowohl die Anhaftung als auch der Eintritt des Virus in die Zelle ist nur ansatzweise erforscht. Es wurde noch kein spezieller Rezeptor für HEV identifiziert, jedoch könnten auf der Oberfläche der Wirtszelle gelegene Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) als Bindungsrezeptor fungieren (KALIA et al., 2009). Am Einschleusen des Virus in die Wirtszelle sind vermutlich ein Hitzeschockprotein (HSP90) und Tubulin beteiligt (ZHENG et al., 2010). Sobald die virale RNA in das Zytosol freigesetzt wird, erfolgt die Translation des Nichtstrukturproteins ORF1. Dieses Polyprotein kodiert dabei für die

Methyltransferase, Cysteinprotease, RNA-Helicase und RNA-abhängige RNA-Polymerase. Die genomische, positiv-strängige RNA wird repliziert, wodurch negativ-strängige RNA hergestellt wird. Dies konnte sowohl in Replikon-transfizierten Zellen gezeigt werden (PANDA et al., 2000), als auch in den Leberzellen experimentell infizierter Schweine (MENG et al., 1998) und Rhesusaffen (NANDA et al., 1994). Diese negativ-strängige RNA dient als Matrize für die Synthese weiterer positiv-strängiger genomischer und subgenomischer RNA. Letztgenannte ist für die Translation des Kapsidproteins ORF2 und des multifunktionellen Proteins ORF3 notwendig (GRAFF et al., 2006; HUANG et al., 2007; ICHIYAMA et al., 2009). Anschließend wird die positiv-strängige, genomische RNA in das ORF2-Kapsidprotein geschleust, wodurch neue Virionen assembliert werden. Das ORF3-Protein unterstützt vermutlich die Virusreplikation, indem es für optimale Bedingungen in der Wirtszelle sorgt. Die entstehenden Virionen werden an die Zellmembran transportiert, wobei das ORF3-Protein das Ausschleusen der Virionen aus der infizierten Wirtszelle ermöglicht (AHMAD et al., 2011).

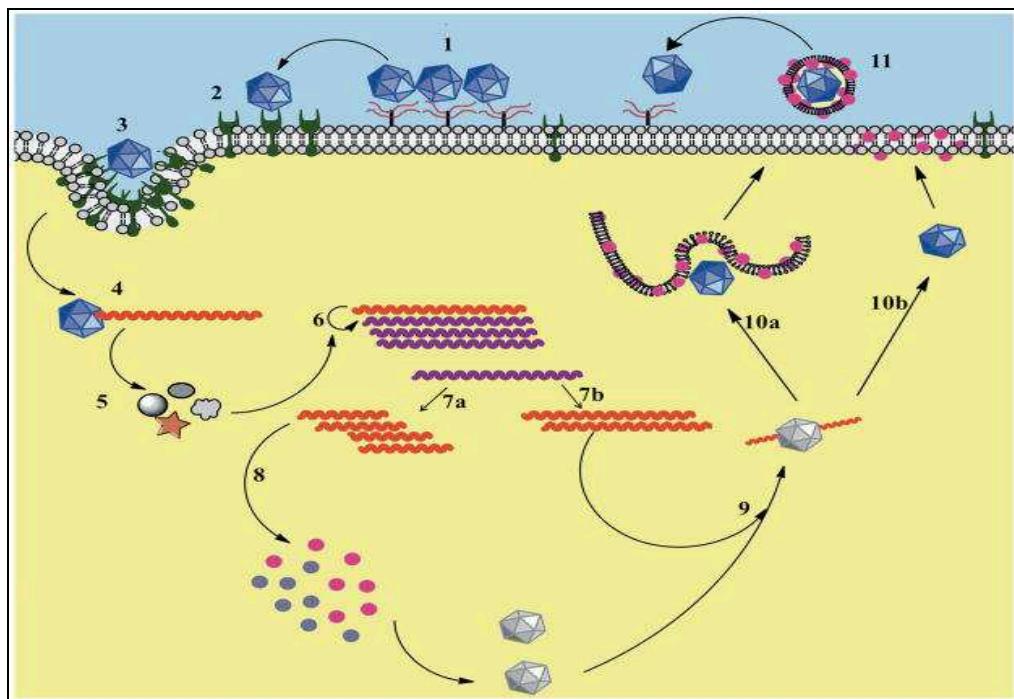


Abbildung 3: Replikationszyklus des Hepatitis E Virus (AHMAD et al., 2011) Anheftung (1), Binden an Rezeptor (2), Einschleusung (3), Entlassen der RNA ins Zytoplasma (4), Translation (5), Replikation von +Strang-RNA in -Strang-RNA (6), Synthese subgenomischer +Strang-RNA (7a), Synthese kompletter +Strang-RNA (7b), Translation der ORF2- und ORF3-Proteine aus subgenomischer +Strang-RNA (8), genomische +Strang-RNA wird in ORF2-Kapsidprotein verpackt (9), ORF3-Protein unterstützt die Ausschleusung des Virions (10a/10b), vermutete Verbindung der Virionen mit ORF3-Protein und Lipiden (11)

Man nimmt an, dass die Replikation des Hepatitis E Virus vor allem in der Leber in den Hepatozyten stattfindet. In experimentell infizierten Schweinen konnte positiv-strängige virale RNA in nahezu jedem Gewebe nachgewiesen werden, während die replizierte negativ-strängige RNA vorrangig im Dünndarm, in Lymphknoten, im Dickdarm und in der Leber nachzuweisen war (WILLIAMS et al., 2001). In den mononukleären Zellen des peripheren Blutes von HEV-Patienten wurde zwar HEV-RNA gefunden, allerdings konnte kein Nachweis für eine virale Replikation in diesen Blutzellen erbracht werden (IPPAGUNTA et al., 2011).

5. Übertragungswege des Hepatitis E Virus

Das Hepatitis-E-Virus kann auf verschiedensten Wegen übertragen werden. Eine Übersicht zu den bisher bekannten Transmissions-Routen bietet Abbildung 4.

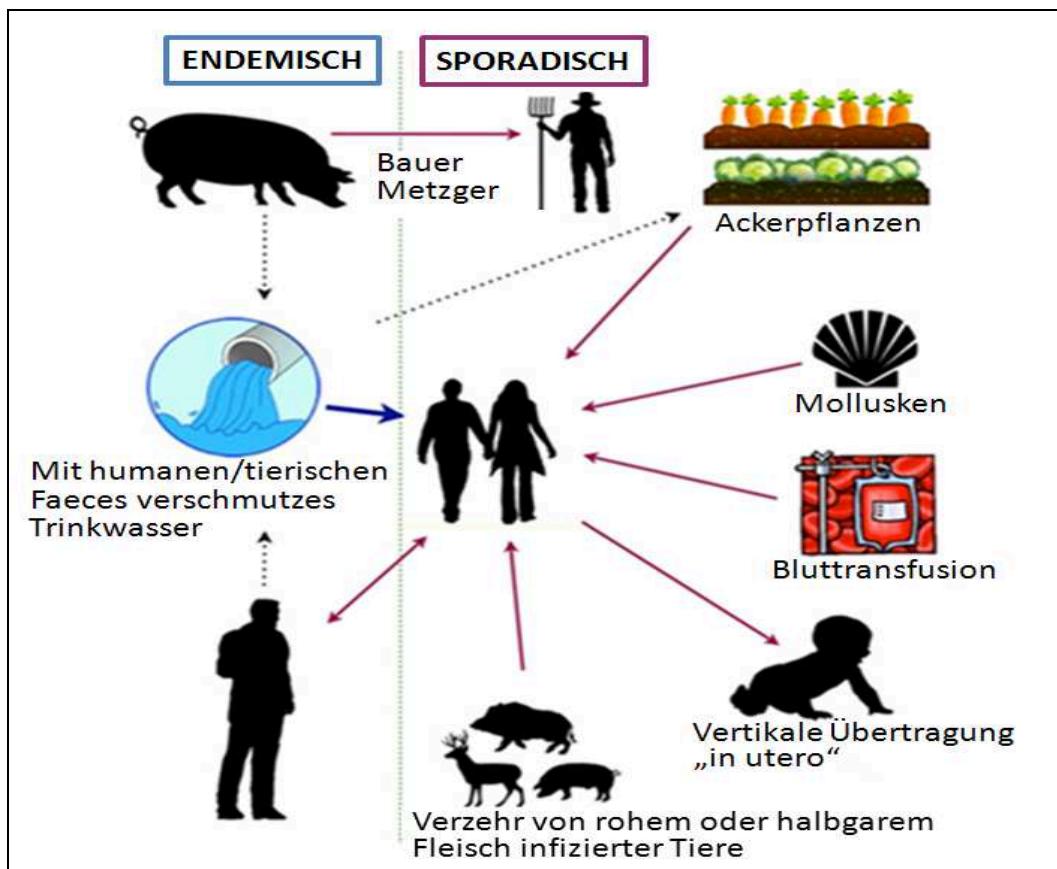


Abbildung 4: Übertragungswege von HEV, modifiziert nach (PEREZ-GRACIA et al., 2014) Endemische Ausbrüche werden durch infektiöses Trinkwasser verursacht. Über die Faeces infizierter Schweine und Menschen kann das Virus ins Trinkwasser gelangen und große Epidemien verursachen. In Gegenden, in denen die Trinkwasserqualität gesichert ist, tritt Hepatitis E nur sporadisch auf; jedoch sind die Übertragungswege vielfältig.

5.1. Nicht-Zoonotisch

Das humane Hepatitis E Virus wird in endemischen Regionen meist fäkal-oral durch kontaminiertes Trinkwasser übertragen (BALAYAN et al., 1983). Ebenso möglich, jedoch weit weniger häufig ist die transplazentare Übertragung von der Mutter auf das Ungeborene und die Übertragung des Virus durch infektiöse Bluttransfusionen (KHUROO et al., 1995; MATSUBAYASHI et al., 2008). Die Genotypen 1 und 2 sind Anthroponosen, das heißt der einzige natürliche Wirt ist der Mensch.

5.2. Zoonotisch

In Europa geht man davon aus, dass das Hepatitis E Virus hauptsächlich als Zoonose auftritt. Der Verzehr von rohen oder unzureichend gegarten Fleisch- und Wurstprodukten von HEV-infizierten Tieren gilt als größte Infektionsquelle für Menschen aus den Industrienationen (MENG, 2011). Aber auch der intensive Kontakt zu infizierten Schweinen, wie es bei Landwirten und Tierärzten der Fall ist, erhöht das Risiko, sich mit dem Hepatitis E Virus zu infizieren (MENG et al., 2002). Die Genotypen 3 und 4 stellen zoonotisch übertragbare Varianten des HEV dar, wobei das Schwein die empfänglichste Tierart zu sein scheint. Doch auch andere Tiere wie beispielsweise Rotwild und Meeresfrüchte sind als Reservoir bekannt (TEO, 2010).

1997 wurde in den USA erstmals ein neues Virus bei Schweinen entdeckt, das einen hohen Verwandtschaftsgrad zum humanpathogenen HEV aufweist und als porzines HEV (engl. *swine HEV*) bezeichnet wird (MENG et al., 1997). Vier Jahre später konnte in Hühnern aus nordamerikanischen Betrieben das aviäre HEV (engl. *avian HEV*) nachgewiesen werden, womit die bisher unbekannte Ursache für das Hepatitis-Splenomegalie-Syndrom bei Hühnern gefunden war (HAQSHENAS et al., 2001). 2010 wurden 30 Stuhlproben von Ratten (*Rattus norvegicus*) aus Hamburg untersucht. Es konnte ein dem HEV verwandtes Virus nachgewiesen werden, welches als Ratten-HEV (engl. *rat HEV*) bezeichnet wird (JOHNE et al., 2010b).

5.2.1. Das Hausschwein

In einer Vielzahl von Studien ist es bereits gelungen, anti-HEV Antikörper und HEV-RNA in Hausschweinen nachzuweisen. Das Virus kommt in Schweinebeständen endemisch vor.

Die Seroprävalenz der anti-HEV Antikörpern in Hausschweinen ist altersabhängig. Die Bildung der anti-HEV Antikörper beginnt im Alter von zwölf Wochen (IgM) bzw. im Alter von fünfzehn Wochen (IgG). Während die IgM-Antikörper nur vier bis sieben Wochen im Serum nachweisbar sind, können die IgG-Antikörper auch noch zum Zeitpunkt der Schlachtung, welcher einem Alter von ca. sechs Monaten entspricht, nachgewiesen werden (DE DEUS et al., 2008a). Bei zwei- bis viermonatigen Tieren kann man bereits hohe Seroprävalenzen nachweisen (JINSHAN et al., 2010). Grundsätzlich ist die Seroprävalenz für anti-HEV Antikörper in adulten Schweinen deutlich höher als in jüngeren Tieren desselben Betriebs (CHANG et al., 2009).

HEV-RNA im Serum konnte in allen untersuchten Altersklassen nachgewiesen werden. Aus Faeces gelang der Nachweis ab einem Alter von neun Wochen. Die höchsten Werte konnten in der zwölften und fünfzehnten Lebenswoche nachgewiesen werden. Dieser Peak in der fünfzehnten Lebenswoche deckt sich sowohl mit dem Peak der Antikörper als auch mit dem Peak des Nachweises von HEV-RNA aus anderem Gewebe, wie Galle, Leber und Mesenteriallymphknoten (DE DEUS et al., 2008a; DI BARTOLO et al., 2008; MCCREARY et al., 2008).

Weltweit konnten bisher beinahe alle Subtypen der beiden Genotypen 3 und 4 in den verschiedenen Schweinebeständen nachgewiesen werden.

Land	Seroprävalenz	HEV-RNA	Genotyp	Referenz
EUROPA				
Belgien	—	7 %	G3 (f) G4 (b)	(HAKZE-VAN DER HONING et al., 2011)
Deutschland	49,8 %	—	—	(BAECHLEIN et al., 2010)
	68,6 %	—	—	(WACHEK et al., 2012)
	42,7 %	—	—	(DREMSEK et al., 2013)
	—	13,5 %	G3	(BAECHLEIN et al., 2013)
England	—	21,5 %	G3	(MCCREARY et al., 2008)
Frankreich	40,5 %	31,2 %	G3 (e,f)	(KABA et al., 2009)
	31 %	4 %	G3 (c,e,f)	(ROSE et al., 2011)
Griechenland	80 %	—	—	(ASIMOULA et al., 2009)

Italien	—	42 %	G3	(DI BARTOLO et al., 2008)
	—	29,9 %	G3 (c,e,f)	(MARTELLI et al., 2010)
	87 %	64,6 %	G3 (c,f)	(DI BARTOLO et al., 2011)
Niederlande	—	15 %	G3 (a,c,f)	(HAKZE-VAN DER HONING et al., 2011)
Schweden	—	29,6 %	G3	(WIDEN et al., 2011)
Schweiz	60%	—	—	(WACHECK et al., 2012b)
Spanien	25 %	—	—	(PINA et al., 2000)
	—	23,29 %	G3	(FERNANDEZ-BARREDO et al., 2006)
	—	37,7 %	G3	(DE DEUS et al., 2007)
	71,4 %	—	—	(PERALTA et al., 2009)
	20,4 %	18,8 %	G3	(JIMENEZ DE OYA et al., 2011)
Tschechische Republik	—	36,7 %	G3	(VASICKOVA et al., 2009)
Ungarn	—	27,3 %	G3	(REUTER et al., 2009)
	—	21 %	G3	(FORGACH et al., 2010)
AFRIKA				
DR Kongo	—	2,5 %	G3 (c)	(KABA et al., 2010b)
AMERIKA				
Argentinien	22,7 %	88,9 %	G3	(MUNNE et al., 2006)
Bolivien	—	31,8 %	G3	(DELL'AMICO et al., 2011)
Brasilien	24,28 %	—	—	(VITRAL et al., 2005)
	—	9,6 %	G3 (b)	(DOS SANTOS et al., 2011)
Kanada	59,4 %	—	—	(YOO et al., 2001)
	—	34 %	G3 (a,b,j)	(WARD et al., 2008)
USA	—	35 %	G3	(HUANG et al., 2002)
ASIEN				
China	78,8 %	1,9 %	G4	(WANG et al., 2002)
	—	9,6 %	G4	(ZHENG et al., 2006)
	68,3 %	5,8 %	G4	(LI et al., 2008)
	67 %	4,57 %	G3/G4	(ZHANG et al., 2008)
	—	22,3 %	G3/G4	(LI et al., 2009)
	82,2 %	0,76 %	G4	(GENG et al., 2010)
	81,17 %	47,94 %	G4 (d)	(GENG et al., 2011)
Indien	94,74 %	10,53 %	G4	(ARANKALLE et al., 2003)
	—	1,96 %	G4	(VIVEK & KANG, 2011)
Japan	58 %	10,07 %	G3/G4	(TAKAHASHI et al., 2003)
	—	14,47 %	G3	(TANAKA et al., 2004)
	55,72 %	3,86 %	G3/G4	(TAKAHASHI et al., 2005)
	74,6 %	1,8 %	G3	(SAKANO et al., 2009)
Korea	—	17 %	G3	(YU et al., 2008)
	39,5 %	1,9 %	G3	(LEE et al., 2009)
Mongolei	91,8 %	36,6 %	G3	(LORENZO et al., 2007)
Taiwan	37,1 %	1,79 %	G3	(HSIEH et al., 1999)

	—	1,3 %	G3	(WU et al., 2000)
Thailand	64,7 %	7,75 %	G3	(SIRIPANYAPHINYO et al., 2009)

Tabelle 2: Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenz von anti-HEV-IgG, der Prävalenz von HEV-RNA sowie des Genotyps in verschiedenen Ländern beim Hausschwein.

In Deutschland lebten im November 2013 ca. 28,1 Millionen Schweine in 27100 Betrieben (STBA, 2015); davon wurden in Bayern ca. 3,40 Millionen Schweine in 5500 Betrieben gehalten (BAYLFSTAD, 2015). Diese Zahlen verdeutlichen, dass es sich bei der Schweinezucht und – mast um eine Intensivtierhaltung handelt, welche durch den engen Kontakt der Tiere untereinander eine schnelle Durchseuchung des Bestandes begünstigt. Dieser Umstand könnte einer der Hauptgründe sein, dass von allen untersuchten Tierarten das Hausschwein die höchste Seroprävalenz von anti-HEV-IgG aufweist (KASORNDORKBUA et al., 2004).

5.2.2. Das Wildschwein

Einige Zeit nach Entdeckung des Hepatitis E Virus im Hausschwein konnte im Jahre 2004 HEV-RNA erstmals auch in Wildschweinen in Japan nachgewiesen werden (SONODA et al., 2004). Die untenstehende Tabelle zeigt neben Japan die europäischen Länder, in denen Wildschweine ebenfalls positiv auf HEV getestet wurden.

Land	Seroprävalenz	HEV-RNA	Genotyp	Referenz
Deutschland	—	5,3 %	G3	(KACI et al., 2008)
	29,9 %	68,2 %	G3 (e,f,h,i)	(ADLHOCH et al., 2009)
Frankreich	—	2,5 %	G3 (f)	(KABA et al., 2010a)
Italien	—	25 %	G3	(MARTELLI et al., 2008)
Japan	9 %	3 %	G3	(SONODA et al., 2004)
	—	2,3 %	G3	(NISHIZAWA et al., 2005)
	4,5 %	1,1 %	G3	(SAKANO et al., 2009)
	8,1 %	3,3 %	G3/G4	(SATO et al., 2011)
Schweden	—	8,18 %	G3	(WIDEN et al., 2011)
Spanien	42,7 %	19,6 %	G3	(DE DEUS et al., 2008b)
Ungarn	—	12,2 %	G3	(REUTER et al., 2009)

Tabelle 3: Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenz von anti-HEV-IgG, der Prävalenz von HEV-RNA sowie des Genotyps in verschiedenen Ländern beim Wildschwein.

Im Gegensatz zum Hausschwein konnte beim Wildschwein nicht nur in jungen, sondern auch in älteren Tieren eine hohe Detektionsrate für HEV-RNA ermittelt werden (DE DEUS et al., 2008b).

5.2.3. Andere Tierarten

Auch bei anderen Tierarten konnte HEV nachgewiesen werden. Tabelle 4 zeigt eine beispielhafte Auflistung verschiedener Tierarten, welche serologisch positiv auf HEV getestet wurden.

Tierart	Land	Seroprävalenz	Referenz
Ente	China	12,8 %	(ZHANG et al., 2008)
		2,53 %	(GENG et al., 2011)
Huhn	Brasilien	20 %	(VITRAL et al., 2005)
	China	1,9 %	(ZHANG et al., 2008)
		3,03 %	(GENG et al., 2011)
Hund	Brasilien	6,97 %	(VITRAL et al., 2005)
	China	17,8 %	(ZHANG et al., 2008)
Katze	Spanien	11,11 %	(PERALTA et al., 2009)
Nager	Brasilien	50 %	(VITRAL et al., 2005)
Pferd	China	16,3 %	(ZHANG et al., 2008)
		14,29 %	(GENG et al., 2011)
Rind	Brasilien	1,42 %	(VITRAL et al., 2005)
	China	6 %	(ZHANG et al., 2008)
		14,87 %	(GENG et al., 2011)
		25,29 %	(GENG et al., 2011)
Schaf	Spanien	1,92 %	(PERALTA et al., 2009)
	China	9,3 %	(GENG et al., 2011)
Taube	China	4,4 %	(ZHANG et al., 2008)
Ziege	China	24 %	(ZHANG et al., 2008)
	Spanien	0,6 %	(PERALTA et al., 2009)

Tabelle 4: Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenz von anti-HEV-IgG bei verschiedenen Tierarten.

Auch in Deutschland konnte in Wanderratten (*Rattus norvegicus*) HEV nachgewiesen werden (JOHNE et al., 2010a). Die genaue Bedeutung dieser Tierarten für die Verbreitung von HEV und das zoonotische Übertragungspotential dieser Tierarten ist noch wenig erforscht.

In einer repräsentativen Studie wurde die Seroprävalenz von deutschen Forstarbeitern mit der Seroprävalenz anderer deutscher Blutspender verglichen. Dabei wurden bei 18% der Forstarbeiter und nur bei 11% der Vergleichsgruppe Antikörper gegen HEV nachgewiesen. Ein Screening nach der HEV-Sequenz, welche kürzlich in Wanderratten in Deutschland entdeckt wurde, hat ergeben, dass hoch positive Serumproben nur in jenen der Forstarbeiter zu finden waren (DREMSEK et al., 2012).

6. Klinik

Die Inkubationsdauer beim Menschen beträgt durchschnittlich 40 Tage, kann aber zwischen 3 und 8 Wochen variieren (LEMON, 1995). Das Hepatitis E Virus kann sowohl akute sporadische als auch epidemisch auftretende virale Hepatitiden verursachen. Eine symptomatische HEV-Infektion tritt häufig bei jungen Erwachsenen in einem Alter zwischen 15 und 40 Jahren auf. Auch Kinder infizieren sich häufig mit dem Virus. Allerdings verläuft bei ihnen die Krankheit meist asymptomatisch (AGGARWAL et al., 1997). Zu den typischen Krankheitsanzeichen einer Hepatitis-E Infektion gehören Ikterus, Hepatomegalie, abdominale Schmerzen, Nausea, Vomitus, Anorexie und Fieber. Der Schweregrad der Symptome reicht von subklinisch bis fulminant (LEMON, 1995). Die HEV-Infektion kann eine akute Hepatitis verursachen, welche jedoch in den meisten Fällen einen milden und selbstlimitierenden Verlauf mit nachfolgender Genesung zeigt.

In Einzelfällen kann das Virus eine fulminante Hepatitis (engl. *fulminant hepatic failure*, FHF) induzieren. Durch die schwere Schädigung des Organs verlieren 80% bis 90% der Leberzellen ihre Funktion. Innerhalb von vier Wochen nach den ersten klinischen Symptomen kommt es infolge der schweren Leberschädigung zur hepatischen Enzephalopathie. In einer langjährigen Studie konnte gezeigt werden, dass es wahrscheinlicher ist, an FHF zu erkranken, wenn die Leber bereits durch eine chronische Lebererkrankung oder Alkoholmissbrauch vorgeschädigt ist (PERON et al., 2007). Diese Form der Hepatitis ist eine sehr schwere, akute Lebererkrankung mit geringen Heilungschancen.

Am häufigsten kommt es bei schwangeren Frauen zu schweren Verläufen der HEV-Infektion. Neben der sich oft entwickelnden FHF leiden die Patientinnen mitunter an Zerebralödem und an disseminierter intravasaler Koagulation (KHUROO & KAMILI, 2003). Auch im Vergleich mit den anderen Hepatitis-Viren zeigte sich, dass eine Infektion mit dem Hepatitis-E-Virus am häufigsten mit schweren Komplikationen während der Schwangerschaft einhergeht. So wurde Hepatitis E als die häufigste Ursache für FHF und die daraus resultierenden hohen Mortalitätsraten während der Schwangerschaft genannt (BENIWAL et al., 2003). Zudem erfolgt die vertikale Übertragung des Virus von der Mutter auf das Baby in 100% der Fälle (KUMAR et al., 2001). Zu den daraus resultierenden Komplikationen zählen Fehlgeburten, Frühgeburten sowie hohe

Sterblichkeitsraten der Neugeborenen (KHUROO et al., 2009). Neuesten Erkenntnissen zufolge gibt es geographische Unterschiede. Vor allem bei schwangeren Frauen aus bestimmten Regionen Indiens nimmt die HEV-Infektion einen schweren Verlauf und verursacht bei relativ vielen Patientinnen eine tödliche FHF. Im Gegensatz dazu zeigen HEV-infizierte schwangere Frauen aus Ägypten, Europa und den USA keinen Unterschied im Krankheitsverlauf im Vergleich mit Nicht-Schwangeren. Der Grund für diesen geographischen Unterschied ist noch unklar. Grundsätzlich vermutet man, dass die höhere Sterblichkeitsrate schwangerer Frauen durch die hormonellen und immunologischen Veränderungen während der Gravidität bedingt ist (NAVANEETHAN et al., 2008).

In den letzten Jahren wurde ein Zusammenhang zwischen chronischer HEV-Infektion mit schnell fortschreitender Leberfibrose und der Immunsuppression in verschiedenen Patientengruppen festgestellt. In einer ersten Studie von Kamar et al mit 14 Transplantationspatienten (Leber, Niere, Niere-Pankreas) mit akuter HEV-Infektion ging hervor, dass acht dieser Patienten eine chronische Hepatitis E entwickelten (KAMAR et al., 2008). Einer retrospektiven Studie zufolge, in welcher die Daten von 69 Transplantationspatienten (Leber, Niere, Niere-Pankreas, Herz, Lunge) mit akuter HEV-Infektion ausgewertet wurden, fand bei Patienten, die länger als drei Monate virämisch waren, keine spontane Ausheilung mehr statt. Hierbei handelte es sich bei 57 Patienten um HEV Genotyp 3; bei 12 Patienten gelang es nicht, den Genotyp zu ermitteln (KAMAR et al., 2013).

Ebenfalls untersucht wurde der klinische Verlauf sechs immunsupprimierter HEV positiven Personen, die an einer malignen hämatologischen Erkrankung litten. Jeder Patient hatte signifikant erhöhte Transaminasen, wobei nur einer einen Ikterus entwickelte; drei Patienten waren länger als sechs Monate virämisch. Bei allen Patienten handelte es sich um eine autochthone Infektion mit dem HEV Genotyp 3 (TAVITIAN et al., 2010). Protrahierte und chronische HEV-Erkrankungen waren bisher ausschließlich auf den HEV Genotyp 3 zurückzuführen. Im Jahr 2014 erkrankte ein chinesischer Junge mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) während der Chemotherapie erstmals am Hepatitis E Virus, welcher als Genotyp 4d identifiziert wurde. Zwanzig Monate nach der Erstinfektion entwickelte der Junge erneut eine HEV Virämie. Die RNA-Sequenzanalyse bestätigte die virale Persistenz des Virus im Patienten über diesen

langen Zeitraum. Das ist sowohl der erste Fall, in dem nachweislich durch HEV Genotyp 4 eine chronische HEV-Erkrankung hervorgerufen wurde, als auch der erste Fall einer chronischen HEV-Erkrankung in China (GENG et al., 2014).

Neueren Forschungen zufolge ist die Chronifizierung der Hepatitis E assoziiert mit einer verminderten HEV-spezifischen T-Zell-abhängigen Immunantwort (SUNEETHA et al., 2012)

In einer weiteren Studie wurden in Russland und Weißrussland lebende Patienten, die aufgrund einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus immunsupprimiert sind, auf anti-HEV Antikörper untersucht. In diesen Gebieten ist die Prävalenz der HIV-Infektionen und AIDS-Patienten moderat und die Prävalenz der anti-HEV Antikörper gering. In Russland waren 13 der 117 HIV-Patienten anti-HEV IgG seropositiv. Damit sind zwar signifikant mehr HIV-Patienten anti-HEV IgG seropositiv (11,1%) als die russische Normalbevölkerung (1,7%); nicht jedoch im Vergleich zur Risikokontrollgruppe, bestehend aus männlichen Gefangenen, in welcher 8% anti-HEV IgG seropositiv getestet wurden. Die Rate der anti-HEV IgG seropositiven HIV-Patienten steigt mit fortschreitender HIV-Erkrankung und erreicht 43,3% bei AIDS-Patienten. In Weißrussland konnten weder bei 20 HIV-Patienten noch in der Kontrollgruppe, bestehend aus 25 Drogenkonsumenten (intravenös), anti-HEV IgG Antikörper nachgewiesen werden. Demzufolge wird vermutet, dass der Zusammenhang zwischen der HEV-Infektion und der HIV-Infektion vor allem darin besteht, dass gemeinsame Übertragungswege und Risikofaktoren vorliegen (BALAYAN et al., 1997).

Da die klinischen Symptome einer Hepatitis-E-Infektion sehr unspezifisch und vielfältig sind ist anzunehmen, dass die Krankheit häufig nicht erkannt bzw. fehldiagnostiziert wird (SHERMAN, 2011).

7. Pathogenese

Wie bereits erwähnt induziert HEV in Menschen meist eine milde oder selbstlimitierende Hepatitis. Nur in einigen Fällen entwickelt sich daraus eine chronische Hepatitis oder gar eine FHF. Allerdings ist der Mechanismus der Leberzellenschädigung noch nicht vollständig erforscht. Unklar ist, ob die

Leberzellschädigung vom Virus in der Wirtszelle verursacht wird oder aber durch die Immunantwort der Wirtszelle selbst, wie es bei anderen Hepatitis-Viren bereits nachgewiesen wurde (REHERMANN & NASCIMBENI, 2005).

Patienten mit einer mild verlaufenden HEV-Infektion zeigen einen stärkeren Anstieg von CD4+-T-Lymphozyten, den sog. T-Helferzellen, welche IFN- γ und TNF- α freisetzen, als Patienten mit einer fulminanten Hepatitis. Dagegen steigen bei Patienten mit fulminanter Hepatitis E die B-Lymphozyten und somit die spezifischen Immunglobuline stärker an als bei Patienten mit mildem Verlauf. Deshalb wird vermutet, dass eine schwache zelluläre Immunantwort und eine starke humorale Immunantwort während einer HEV-Infektion auf einen schwereren Krankheitsverlauf schließen lassen (SRIVASTAVA et al., 2011).

8. Diagnostik

Um einen Überblick über die diagnostisch relevanten Parametern im Verlauf einer HEV-Infektion beim Menschen zu erhalten, ist in Abbildung 5 das Zeitfenster der Virusausscheidung mit dem Stuhl und das Zeitfenster des Auftretens klinischer Symptome dargestellt. Außerdem zeigt die Grafik den Anstieg des Leberenzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie den Titerverlauf der IgM/IgG anti-HEV-Antikörper im Serum.

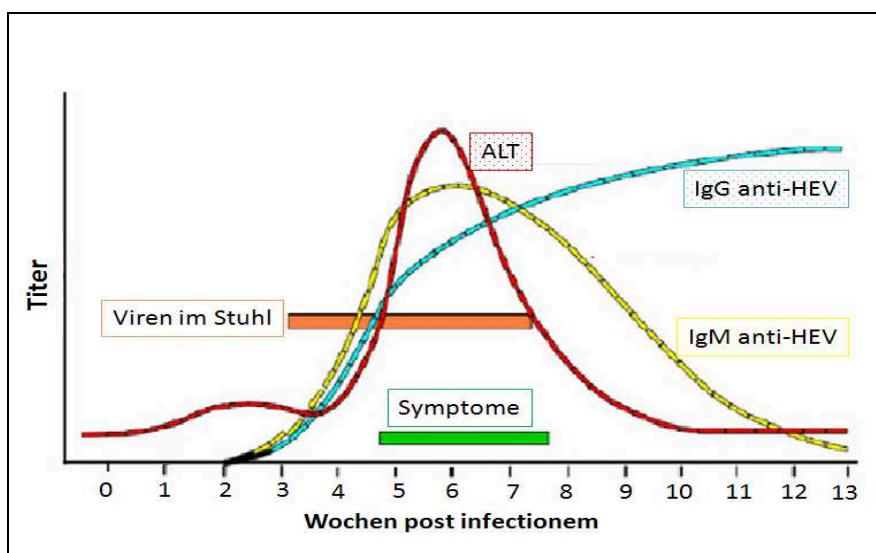


Abbildung 5: Verlauf diagnostisch relevanter Parameter einer HEV-Infektion in Wochen p.i., modifiziert nach (QUIZLET, 2014) ALT = Alaninaminotransferase (Leberenzym); IgG anti-HEV = Immunglobulin G anti-HEV-Antikörper; IgM anti-HEV = Immunglobulin M anti-HEV-Antikörper;

8.1. Direkter Nachweis

Der erste Nachweis des Hepatitis-E-Virus wurde mit dem Immunelektronenmikroskop erbracht (BALAYAN et al., 1983). Die Elektronenmikroskopie und die Immunelektronenmikroskopie waren lange Zeit die Standardmethoden zum HEV-Nachweis. Die Virusausscheidung mit dem Stuhl erfolgt jedoch nur zwischen der dritten und siebten Woche post infectionem. Da dieses Zeitfenster der präkterischen und frühen ikterischen Phase entspricht, ist der Nachweis mit dieser Methode nur möglich, wenn der Patient umgehend nach Auftreten der ersten Symptome einen Arzt aufsucht. Da bereits gegen Ende der akuten Krankheitsphase keine Viren mehr mit dem Stuhl ausgeschieden werden liegt die Schwierigkeit dieses Nachweisverfahrens darin, die Stuhlprobe des Patienten während der wenigen Tage der Virusausscheidung zu nehmen. Zudem ist eine gewisse Menge von ausgeschiedenen Viren nötig, um diese im Elektronenmikroskop nachweisen zu können. Diese variiert jedoch und stellt so eine weitere Ungenauigkeit dieses Verfahrens dar. Von Nachteil sind außerdem die hohen Kosten und die komplexe Bedienung des Gerätes (PANDA et al., 2007).

Eine gute Möglichkeit für den Nachweis infektiöser HEV wäre ein Zellkultursystem. Es gab einige Versuche zu dessen Umsetzung. Mit einer Zelllinie eines Leberzellkarzinoms (PLC/PRF/5) ist es bereits gelungen, ein effizientes Zellkultursystem zu entwickeln (TANAKA et al., 2007). Auch in einer Zelllinie, die aus einem Lungenzellkarzinom (A549) stammt, ist eine effiziente Anzucht von verschiedenen HEV-Stämmen gelungen (OKAMOTO, 2011). Ein routinetaugliches Zellkultursystem zur stabilen HEV-Anzucht mit konstanter Replikationsrate gibt es bislang allerdings nicht (PANDA et al., 2007).

Eine sichere Methode zum direkten Nachweis der Hepatitis-E-Viren besteht in der Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR). Hierbei wird die Virus-RNA in Serum-, Stuhl- und Abwasserproben nachgewiesen. Aufgrund der Existenz mehrerer genetischer Varianten des Hepatitis-E-Virus ist es wichtig, die passenden Primer für die zu untersuchende Probe zu verwenden, um die Sensitivität der RT-PCR zu gewährleisten (OKAMOTO, 2007). Kürzlich wurde eine multiplex RT-qPCR entwickelt, die es ermöglicht, zwischen Genotyp 3 und Genotyp 4 zu differenzieren (ZHANG et al., 2013).

8.2. Indirekter Nachweis

Als Methode der Wahl zum Nachweis einer HEV-Infektion gilt bisher der serologische Nachweis von Antikörpern gegen das Virus. Dabei kommt der ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) zum Einsatz, welcher gentechnisch exprimierte ORF2- und ORF3-Proteine nutzt, um die Antikörper gegen HEV zu detektieren (ANDERSON et al., 1999).

IgM-Antikörper zeigen die akute Phase der Virusinfektion an. Sie haben den höchsten Titer zwischen der fünften bis siebten Woche post infectionem und flauen in der frühen Rekonvaleszenzphase bereits wieder ab. Drei Monate nach Krankheitsbeginn sind meist keine IgM-Antikörper mehr nachweisbar. Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen HEV in Zusammenhang mit einer klinischen Hepatitis-Symptomatik erlaubt die Diagnose einer akuten Hepatitis-E-Infektion, wenn die anderen viralen Hepatitiden bereits ausgeschlossen wurden. Um die Diagnose abzusichern empfiehlt es sich nach ca. 10 Tagen eine weitere Probe zu entnehmen, um den Anstieg des Antikörpertiters belegen zu können (PURCELL, 1996; TICEHURST, 1999).

Zusätzlich ist die Anfertigung eines Blutbildes zur Überprüfung der Leberwerte sinnvoll, da gewöhnlich im Falle einer Lebererkrankung die Leberenzyme erhöht sind. Es ist allerdings wichtig zu beachten, dass erhöhte Leberenzyme auch durch andere Lebererkrankungen verursacht sein können und daher in der Diagnostik nicht beweisend sondern nur hinweisend genutzt werden können.

Die IgG-Antikörper steigen im Vergleich zu den IgM-Antikörpern langsamer an, persistieren über mehrere Jahre und führen zum Immunschutz gegen HEV. Der alleinige Nachweis der IgG-Antikörper im Serum hat keine diagnostische Aussagekraft bezüglich einer akuten HEV-Infektion. IgG-Antikörper zeigen lediglich an, dass sich das Immunsystem zu einem unbestimmten Zeitpunkt mit einer HEV-Infektion auseinandergesetzt hat.

In neueren Studien wurde auf die IgA-Antikörper aufmerksam gemacht. Der Titer der IgA-Antikörper fällt ebenso wie der der IgM-Antikörper relativ schnell nach der Infektion wieder ab. Es wird beschrieben, dass anti-HEV-IgA-Antikörper vermutlich ebenfalls den Nachweis einer akuten HEV-Infektion erbringen können (TIAN et al., 2006; HERREMANS et al., 2007).

9. Behandlung

Da bisher keine kausale Therapie möglich ist erfolgt die Behandlung symptomatisch. Allerdings könnte in Zukunft ein natürlicher Mechanismus, die sog. RNA-Interferenz, die zur Abschaltung von anormalen oder fremden Genen befähigt ist, genutzt werden. Dabei betrachtet man die viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase als den günstigsten Angriffspunkt für die RNA-Interferenz. Ein schützender Effekt dieses Mechanismus konnte in A549-Zellen und im Tierversuch gezeigt werden. Ferkel, die vor der experimentellen HEV-Infektion mit einem shRNA-RdRp-1 Expressionsplasmid manipuliert wurden, zeigten deutlich weniger HEV-Antigene in der Leber, der Milz und den Nieren. Auch die Aktivität der Leberenzyme war signifikant vermindert. Diese Ergebnisse lassen folgern, dass die RNA-Interferenz möglicherweise eine effektive Möglichkeit zur Verhinderung der Virus-Replikation in der Wirtszelle ist (HUANG et al., 2009).

10. Prophylaxe

Um in den Entwicklungsländern weitere Ausbrüche von HEV-Epidemien zu verhindern ist es von wesentlicher Bedeutung, die Sanitärhygiene zu verbessern. Dazu zählen vor allem der Zugang zu sauberem Trinkwasser sowie der Aufbau und Ausbau eines Kanalisationsnetzes. Eine wirksame Methode zur Reduzierung coliformer Keime im Wasser und somit zur Eindämmung von HEV ist das Chloren von verschmutztem Wasser (NAIK et al., 1992).

In den Industrienationen sollte der Verzehr von rohen oder unzureichend gekochten Fleischprodukten von Schwein, Wildschwein und Wild vermieden werden (EMERSON et al., 2005). Bei Temperaturen zwischen 45°C und 50°C werden 50% der Viren inaktiviert, bei einer Temperatur von 60°C werden nahezu alle Viren inaktiviert (EMERSON et al., 2005).

11. Impfstoff

Der erste Impfstoff namens „HEV 239“ ist in China seit April 2012 zugelassen. Die Impfung bietet Schutz vor den beiden HEV Genotypen 1 und 4. Bereits im

März 2007 konnte in einer randomisierten Doppelblindstudie die Effektivität und Sicherheit des Impfstoffes nachgewiesen werden (SHRESTHA et al., 2007). Die dritte klinische Phase der Impfstoffzulassung konnte 2010 erfolgreich beendet werden. Von 56.302 geimpften Personen ist nach 12 Monaten niemand erkrankt wohingegen von den 56.302 Personen aus der Kontrollgruppe 15 Personen an HEV erkrankten. Dadurch konnte die Wirksamkeit des Impfstoffes belegt werden (ZHU et al., 2010).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde der Impfstoff „HEV 239“, nachdem er in China bei Menschen bereits erfolgreich verwendet wurde, an Kaninchen getestet. Da HEV zoonotisch übertragbar ist stellte sich die Frage, ob dieser Impfstoff auch in Tierpopulationen zum Einsatz kommen kann, welche für den Menschen als Überträger denkbar sind. Sechs der zwölf SPF (specific-pathogen-free) Kaninchen wurden intramuskulär mit „HEV 239“ geimpft; den anderen sechs Kaninchen der Kontrollgruppe wurde ein Placebo (PBS) injiziert. Nach intravenöser Infektion mit porcinem HEV Genotyp 4 sieben Wochen nach der initialen Immunisierung entwickelten alle immunisierten Kaninchen hohe anti-HEV Titer und zeigten keine Anzeichen einer HEV-Infektion. In der Placebo-Gruppe konnte bei allen Tieren eine klinische HEV-Infektion mit Virämie und Virusausscheidung über den Kot nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Impfstoff „HEV 239“ auch für Kaninchen eine hohe Immunogenität besitzt (LIU et al., 2014).

Neben dem in *E. coli* exprimierten Impfstoff „HEV 239“ konnte auch der baculoviral exprimierte Impfstoff „rHEV“ in der Arzneimittelstudie erfolgreich auf seine Wirksamkeit getestet werden (KAMILI, 2011).

12. Epidemiologie

Die Verbreitung des Hepatitis E Virus erfolgt, wie bereits erwähnt, auf zwei sehr unterschiedlichen Wegen. In endemischen Regionen wird das Virus über verschmutztes Trinkwasser fäkal-oral übertragen und es werden sehr viele Menschen infiziert. Im Gegensatz dazu treten in nicht-endemischen Regionen nur sporadische Fälle von HEV-Infektionen auf, die sehr wahrscheinlich zoonotisch übertragen werden.

Während in den Industrienationen vor allem der zoonotisch übertragbare Genotyp 3 zu finden ist, führen in den Entwicklungsländern die Genotypen 1 und 2 zu endemischen Ausbrüchen durch kontaminiertes Trinkwasser. Genotyp 4 konnte bisher ausschließlich auf dem asiatischen Kontinent nachgewiesen werden. Abbildung 6 zeigt die geographische Verbreitung der vier Genotypen.

Da das Schwein als Hauptreservoir und Hauptinfektionsquelle für HEV in den industrialisierten Nationen gilt, zeigt Abbildung 6 außerdem das Vorkommen von HEV beim Hausschwein. Wie bereits seit einiger Zeit vermutet, deckt sich das geographische Vorkommen der zoonotisch übertragbaren Genotypen 3 und 4 im Schwein mit den humanen HEV-Erkrankungen in den Industrienationen. Auch im Schwein konnte Genotyp 4 ausschließlich in Asien nachgewiesen werden.

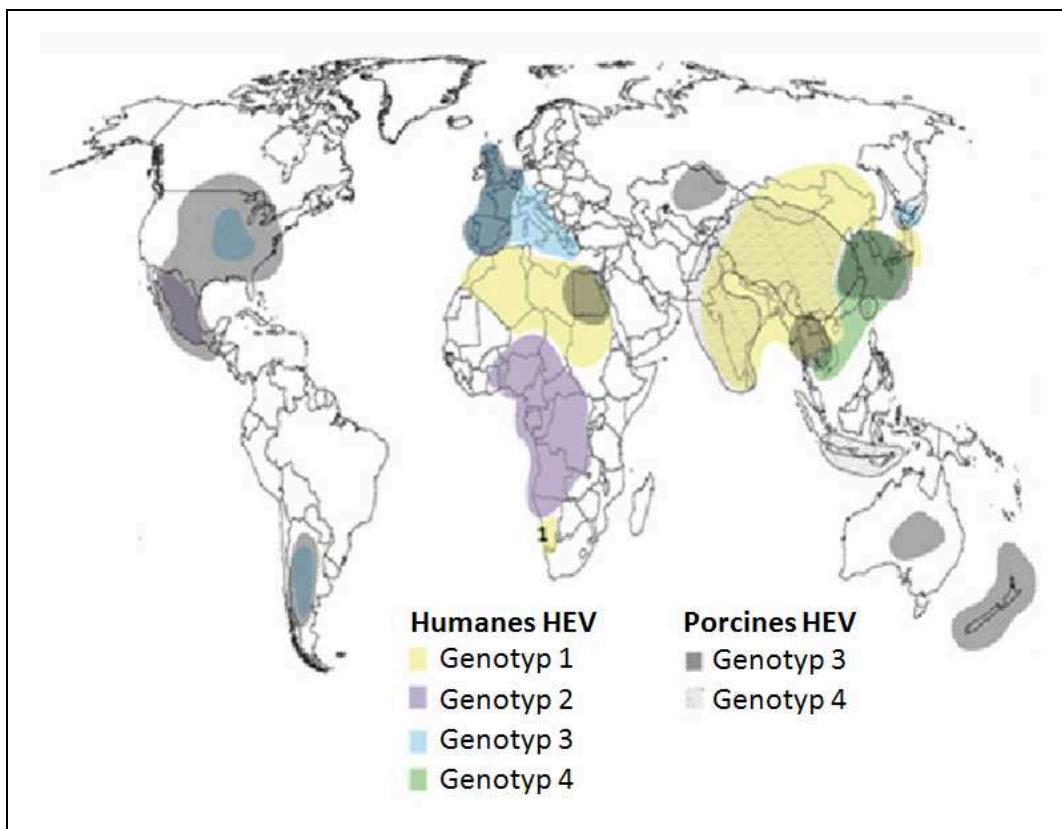


Abbildung 6: Geographische Verteilung der HEV-Genotypen bei Mensch und Schwein, modifiziert nach (PEREZ-GRACIA et al., 2014)

Innerhalb Deutschlands nimmt die Zahl der an das RKI gemeldeten HEV-Erkrankungen seit mehreren Jahren kontinuierlich zu. In den letzten Jahren konnte außerdem eine kontinuierliche Zunahme von diagnostizierten HEV-Patienten verzeichnet werden, welche die Krankheit in Deutschland erworben haben. Die konkreten Übertragungswege dieser autochthonen Fälle blieben unklar. In nachfolgender Abbildung sind die in Deutschland gemeldeten Hepatitis-E-Fälle

der Jahre 2001 bis 2013 als Säulendiagramm dargestellt, um den sprunghaften Anstieg zu verdeutlichen. Es darf vermutet werden, dass das Hepatitis E Virus in den nächsten Jahren weiter an Bedeutung gewinnen wird.

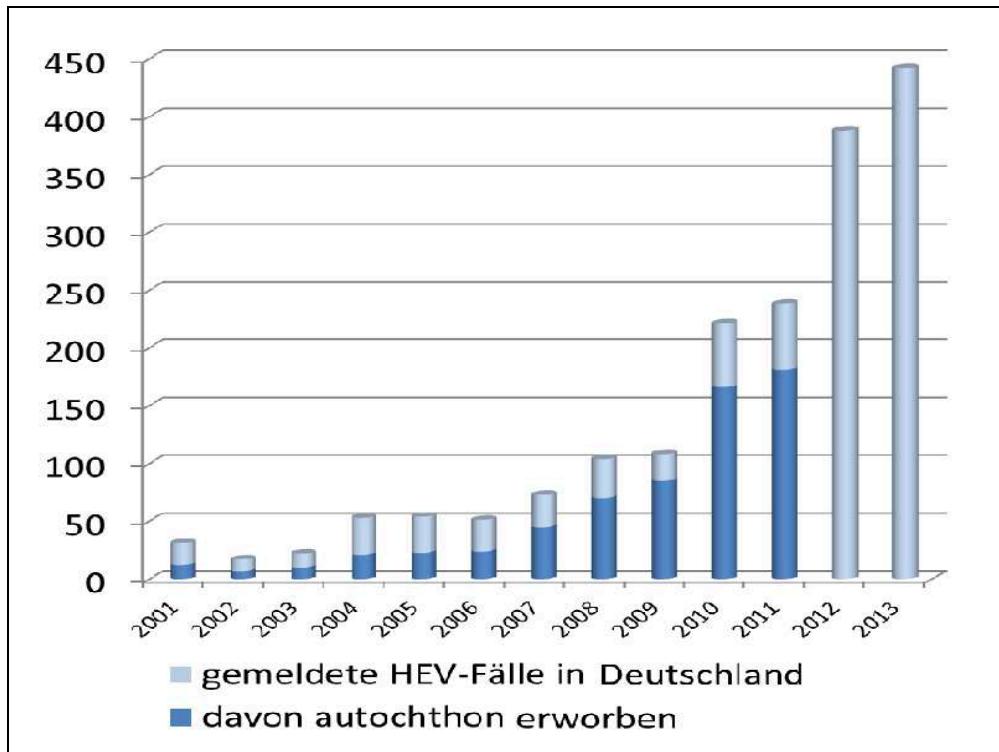


Abbildung 7: Sprunghafter Anstieg der gemeldete Hepatitis-E-Erkrankungen nach Meldejahr von 2001 bis 2013 in Deutschland (SCHULTHEiß et al., 2013; RKI, 2014) der autochthonen Erkrankungen unbekannt.

13. Kapsid-Assemblierung

Die HEV-ORF2-Gensequenz codiert für die Proteine des Virus-Kapsids. Protein-Untereinheiten, die sog. Kapsomere, bilden durch Selbstassemblierung eine ikosaedrische Form aus. Hierbei besteht ein Unterschied zwischen dem Kapsid des Hepatitis E Virus und dem Kapsid des gentechnisch erzeugten HEV-VLP.

Im HEV-Genom codiert ORF2 mit 660 Aminosäuren für das Kapsid (CAO & MENG, 2012). Die Herstellung von HEV-VLPs gelang bisher in vitro nur mit der trunkierten ORF2-Gensequenz, welche die Aminosäuren 112 bis 608 beinhaltet (LI et al., 2005b). Folglich ändert sich sowohl der Durchmesser der Kapside als auch deren Triangulationszahl. Während der Durchmesser des Hepatitis E Virus ca. 37 nm beträgt, besitzt das HEV-VLP ca. 27 nm im Durchmesser (LI et al., 2005b). Folgende Abbildung zeigt die Kristallstruktur von HEV und dem im Labor hergestellten HEV-VLP im Vergleich.

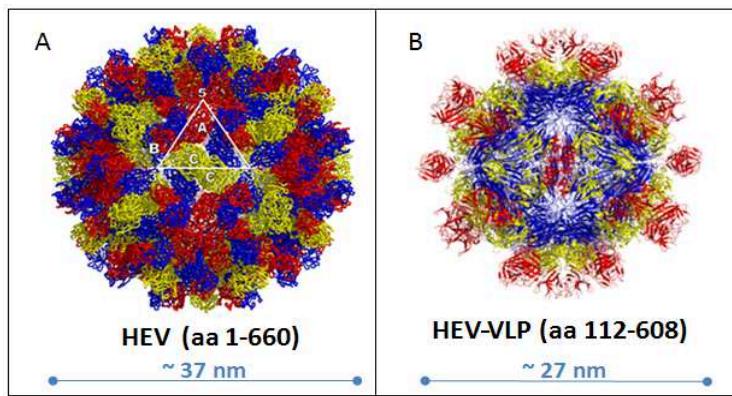


Abbildung 8: Kristallstruktur und Durchmesser in Nanometer (nm) von HEV (A) und HEV-VLP (B) im Vergleich (GUU et al., 2009). ORF2 des HEV besteht aus 660 Aminosäuren (aa), während die Herstellung von HEV-VLPs bisher nur mit der trunkierten ORF2-Sequenz gelang. Folglich assemblieren sie unterschiedlich. Das Kapsid des Hepatitis E Virus besitzt einen Durchmesser von ca. 37 nm, während das Kapsid des HEV-VLPs ca. 27 nm misst.

Die Zusammenlagerung dreier identischer Kapsidproteine zu einem gleichseitigen und somit rotationssymmetrischen Dreieck ist der erste Schritt zur ikosaedrischen Symmetrie. Das einfachste Ikosaeder besteht aus zwanzig solcher gleichseitigen Dreiecke. Somit sind $20 \times 3 = 60$ Proteinmoleküle nötig. Da 60 Proteinmoleküle die Mindestanzahl sind hat dieser Ikosaeder die Triangulationszahl 1. Komplexere Ikosaeder besitzen ein Vielfaches dieser Mindestanzahl; folglich wird einem Ikosaeder, der sich aus 180 Proteinmolekülen zusammensetzt, die Triangulationszahl 3 zugeschrieben.

Auch bezüglich der oben beschriebenen Triangulationszahl unterscheidet sich das Hepatitis E Virus vom HEV-VLP. Wie in Abbildung 9 zu sehen, besitzt das HEV-Kapsid die Triangulationszahl 3 während sich das Kapsid des HEV-VLP zu einem Ikosaeder mit der Triangulationszahl 1 zusammenlagert (GUU et al., 2009).

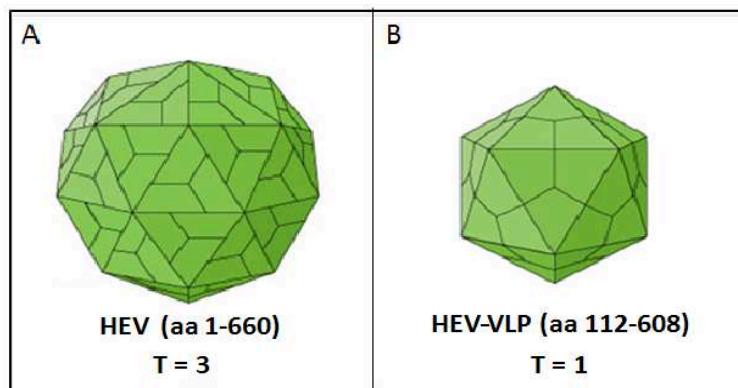


Abbildung 9: Kapsidmodell von HEV und HEV-VLP im Vergleich (SIB, 2008). Das Ikosaeder des HEV, welches mit der Triangulationszahl T=3 beschrieben wird, besteht aus 180 Kapsomeren (A). Das Ikosaeder des HEV-VLP, welches mit der Triangulationszahl T=1 beschrieben wird, besteht aus 60 Kapsomeren (B).

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Glas- und Kunststoffwaren

Cryoröhrchen (Stehrand; 1,2 ml)	VWR, Pennsylvania, USA
Einwegpipetten (5ml, 10ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einwegpipetten (25ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Erlenmeyer-Kolben (50, 250, 500 ml)	Schott, Zwiesel, Deutschland
Konische Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (8er SoftStrips)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zählkammer, Fuchs-Rosenthal	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturplatten (6 well, 24 well)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (96 well)	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

2. Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Bakterienbrutschrank INB 200	Memmert, Schwabach, Deutschland
Blotting-Gerät iBlot Gel Transfer Device	Invitrogen, Leek, Niederlande
Doppelheizblock	Anachem, Bedfordshire, U.K.
Floureszenzmikroskop mit Kamera	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Gelelektrophoresekammer Bolt Mini Gel Tank	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Kühl-Gefrier-Kombination	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühl-Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühl-Zentrifuge 5702 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kolbenhubpipette, Research plus, 0,5–10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette, Research plus, 10–100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette, Research plus, 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette , Research plus, 1 – 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multistep-Pipette, Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Brand, Wertheim, Deutschland
Schüttelinkubator Certomat IS	Braun Biotech, Melsungen, Deutschland
Spannungsquelle für Western Blot	BioRad, München, Deutschland
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg, München
Trockenschrank (Brutschrank)	Memmert, Schwabach, Deutschland
Vortex-Gerät	ScientificIndustries, Orlando, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zellzählgerät, mechanisch	Hecht, Sondheim, Deutschland

3. Puffer, Lösungen, Medien

Bolt LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Bolt Sample Reducing Agent (10x)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
BSA (100x)	New England BioLabs, Massachusetts, USA
Ex-Cell 420 Insect serum-free medium (Sf9)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
FBS	PAA, Pasching, Österreich
MES-Laupuffer (20x)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
NBT/BCIP Detektionsreagenz (AP)	Thermo Scientific, Wesel, Deutschland
NE-Puffer (10x)	New England BioLabs, Massachusetts, USA
PBS	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
PBS + Mg + Ca	MP Biomedicals, Kalifornien, USA
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Leek, Niederlande
TE-Puffer	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

Selbst hergestellte Puffer, Lösungen, Agar-Nährböden und Nährmedien		
Bezeichnung:	Zusammensetzung:	
Blockier-Lösung	5 % (w/v) Magermilchpulver In TBS-T-Puffer (s.u.)	
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau 50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig	
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Ethanol 20 % (v/v) Essigsäure	
LB-Agar	1 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 1 % Natriumchlorid 1,5 % Agar	
LB-Ampicillin-Agar	1 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 1 % Natriumchlorid 1,5 % Agar 100 µg/ml Ampicillin	
LB-Agar für DH10Bac	1 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 1 % Natriumchlorid 1,5 % Agar 50 µg/ml Kanamycin 7 µg/ml Gentamicin 10 µg/ml Tetracyclin 100 µg/ml X-Gal 40 µg/ml IPTG	
LB-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 1 % Natriumchlorid	
LB-Ampicillin-Medium	1 % Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 1 % Natriumchlorid 100 µg/ml Ampicillin	

LB-Gentamicin-Medium	1 % 0,5 % 1 % 50 µg/ml	Trypton Hefe-Extrakt Natriumchlorid Gentamicin
LB-Medium für DH10Bac	1 % 0,5 % 1 % 50 µg/ml 7 µg/ml 10 µg/ml	Trypton Hefe-Extrakt Natriumchlorid Kanamycin Gentamicin Tetracyclin
Ponceau-S-Färbelösung	0,15 % (w/v) 5,00 % (v/v) 94,85% (v/v)	Ponceau-S Eisessig dH2O
Sf9-Nährmedium	1 % 1 % 5 %	Fungizone PenStrep FBS In Ex-Cell 420 Insect serum-free medium
Sf9ET-Nährmedium	1 % 1 % 5 % 0,25 %	Fungizone PenStrep FBS G-418 In Ex-Cell 420 Insect serum-free medium
TBS-T-Puffer	50 mM 150 mM 0,2 % (v/v)	Tris-HCl NaCl Tween-80 Mit 10 M NaOH auf pH 8,0 einstellen

4. Chemikalien

Agar-Agar	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amphotericin B (Fungizone) (250 µg/ml)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bluo-Gal	Peqlab, Erlangen, Deutschland
DEPC-Wasser	Invitrogen, Leek, Niederlande
dNTPs	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Geneticin G-418 (60000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gentamicin (50mg/ml)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Hefe-Extrakt	Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycinsulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	VWR, Pennsylvania, USA
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
PEG 6000	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetracyclin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau (0,4%)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Trypton	Thermo Scientific, Wesel, Deutschland
Wasser, Optigrade	LGC Standards, Wesel, Deutschland

5. Reagenzienansätze und Kits

Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Agilent DNA 7500 Kit	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
Bac-to-Bac Baculovirus Expressions System	Invitrogen, Leek, Niederlande
FectoFly DNA Transfektions-Reagenz	Polyplus, New York, USA
Gateway LR Clonase Enzym Mix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Mini	Invitrogen, Leek, Niederlande
iBlot Western Detection Kit	Invitrogen, Leek, Niederlande
iBlot Western Detection Stacks, Mini	Invitrogen, Leek, Niederlande
NBT/BCIP Detektionsreagenz (AP)	Thermo Scientific, Wesel, Deutschland
NucleoBond Xtra BAC Plasmid Maxiprep Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Proteinmarker SeeBlue Plus2	Invitrogen, Leek, Niederlande
recomLine HEV IgG/IgM	Mikrogen Diagnostik, Neuried, Deutschland

6. Plasmide und Bacmid

HEV ORF2 Genotyp 1 in pENTR207	Gateway®-Eingangsvektor (Max-von-Pettenkofer-Institut)
HEV ORF2 Genotyp 2 in pMK-RQ	Eingangsklon (GeneArt)
HEV ORF2 Genotyp 3 in pMK-RQ	Eingangsklon (GeneArt)
HEV ORF2 Genotyp 4 in pMK-RQ	Eingangsklon (GeneArt)
pDEST8	Gateway®-Zielvektor (INVITROGEN)
HEV ORF2 Genotyp 1 in pDEST8	Expressionsvektor (selbst hergestellt)
HEV ORF2 Genotyp 2 in pDEST8	Expressionsvektor (selbst hergestellt)
HEV ORF2 Genotyp 3 in pDEST8	Expressionsvektor (selbst hergestellt)
HEV ORF2 Genotyp 4 in pDEST8	Expressionsvektor (selbst hergestellt)
bMON14272	Original Bacmid (in Invitrogen DH10 Bac s. 8)
HEV ORF2 Genotyp 1 in bMON14272	Rekombinantes Bacmid (selbst hergestellt)
HEV ORF2 Genotyp 2 in bMON14272	Rekombinantes Bacmid (selbst hergestellt)
HEV ORF2 Genotyp 3 in bMON14272	Rekombinantes Bacmid (selbst hergestellt)
HEV ORF2 Genotyp 4 in bMON14272	Rekombinantes Bacmid (selbst hergestellt)
ORF2 bezeichnet das trunkierte Kapsidprotein des Hepatitis E Virus Genotyp 1: Trunkierte ORF2-Gensequenz; Wildtyp; 112-608 (AS) Genotyp 2: Trunkierte ORF2-Gensequenz; codonoptimiert für Insektenzellen; 112-607 (AS) Genotyp 3: Trunkierte ORF2-Gensequenz; codonoptimiert für Insektenzellen; 112-608 (AS) Genotyp 4: Trunkierte ORF2-Gensequenz, codonoptimiert für Insektenzellen; 112-608 (AS)	

7. Baculoviren

AcMNPV + HEV ORF2 Genotyp 1	Rekombinantes Baculovirus (selbst hergestellt)
AcMNPV + HEV ORF2 Genotyp 2	Rekombinantes Baculovirus (selbst hergestellt)
AcMNPV + HEV ORF2 Genotyp 3	Rekombinantes Baculovirus (selbst hergestellt)
AcMNPV + HEV ORF2 Genotyp 4	Rekombinantes Baculovirus (selbst hergestellt)
ORF2 bezeichnet das trunkierte Kapsidprotein des Hepatitis E Virus Genotyp 1: Trunkierte ORF2-Gensequenz; Wildtyp; 112-608 (AS) Genotyp 2: Trunkierte ORF2-Gensequenz; codonoptimiert für Insektenzellen; 112-607 (AS) Genotyp 3: Trunkierte ORF2-Gensequenz; codonoptimiert für Insektenzellen; 112-608 (AS) Genotyp 4: Trunkierte ORF2-Gensequenz, codonoptimiert für Insektenzellen; 112-608 (AS)	

8. Zellen

Spodoptera frugiperda (Sf9) Zellen	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Spodoptera frugiperda Easy Titer (Sf9 ET) Zellen	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland
<i>E. coli</i> „One Shot Top 10“	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
<i>E. coli</i> „MAX Efficiency DH10 Bac“	Invitrogen, Leek, Niederlande

9. Restriktionsenzyme und Primer

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
BsrGI	Restriktionsenzym Erkennungssequenz: 5'...T'GTACA...3'	New England BioLabs, Massachusetts, USA
pUC/M13-Forward	Vorwärtsprimer 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'	Metabion, Planegg, Deutschland
pUC/M13-Reverse	Rückwärtsprimer 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGG-3'	Metabion, Planegg, Deutschland
pBakPAC-FP	Vorwärtsprimer 5'-TAAAATGATAACCCTCTCGC-3'	Metabion, Planegg, Deutschland
EBV-RP	Rückwärtsprimer 5'-GTGGTTGTCCAAACTCATC-3'	Metabion, Planegg, Deutschland

10. Antikörper

Bezeichnung	Merkmale	Bezugsquelle
Patientenprobe „Alia“	Humanserum Patientin mit akuter Hepatitis E Anti-HEV-IgM+/HEV-RNA+ Nicht genotypisiert	Max von Pettenkofer-Institut, München, Deutschland
Monoklonaler Maus-Antikörper	Maus-Antikörper Monoklonal Isotyp: Mouse IgG _{2a} Spezifität: Anti-HEV ORF2	Enogene, Aachen, Deutschland

Sekundärantikörper Anti-Human IgG/IgM-Konjugat	HRP-konjugiert (aus recomLine HEV IgG/IgM Test)	Mikrogen Diagnostiks, Neuried, Deutschland
Sekundärantikörper Anti-Maus AP	AP-konjugiert (aus iBlot Western Detection Chromogenic Kit, anti-mouse)	Invitrogen, Leek, Niederlande

11. Gateway-Klonierung

Die Gateway Technologie ist eine Klonierungsmethode, die auf den seitenspezifischen Rekombinationseigenschaften des Bakteriophagen Lambda beruht. Der Phage λ integriert mit Hilfe bestimmter Enzyme seine DNA in das Genom von *E. coli*. Durch diese Technik können DNA-Sequenzen schnell und effizient in verschiedene Vektorsysteme integriert werden.

Für die λ -basierte Rekombinationsreaktion sind sowohl die DNA-Rekombinationssequenzen (att-sites) als auch bestimmte Proteine nötig. Verwendet wird hierfür der Gateway Clonase II Enzym-Mix, welcher Lambda- und *E. coli*-kodierte Rekombinationsproteine beinhaltet. Dieser Enzym-Mix katalysiert das Aneinanderlagern der entsprechenden Bindungsstellen, die Teilung und die kovalente Bindung der DNA. Die an der Reaktion beteiligten Proteine unterscheiden sich in Abhängigkeit davon, ob Lambda den lytischen oder den lysogenen Reaktionsweg ausführt. Für den lytischen Reaktionsweg ist zusätzlich das Enzym Excisionase (Xis) erforderlich (s. Tab. 5).

Reationspfad	Reaktion	Katalysiert durch
Lysogen	BP-Reaktion: attB x attP \rightarrow attL x attR	Gateway BP Clonase II (Int, IHF)
Lytisch	LR-Reaktion: attL x attR \rightarrow attB x attP	Gateway LR Clonase II (Int, Xis, IHF)

Tabelle 5: Lytischer und lysogener Reaktionsweg der Gateway-Klonierung. Die BP-Reaktion wird durch die Proteine Integrase (Int) und Integration Host Factors a/b (IHF) katalysiert. Bei der LR-Reaktion muss zusätzlich das Enzym Excisionase (Xis) vorhanden sein. Außerdem werden spezifische Rekombinations-Stellen (att-sites) sowohl in der zu übertragenden DNA als auch in der Ziel-DNA benötigt.

11.1. BP-Reaktion

Die Lambda-Rekombination erfolgt zwischen den seitenspezifischen Bindungsstellen (att-sites). Für die BP-Reaktion muss sich das zu transferierende Gen zwischen den Bindungsstellen B (attB) befinden. Der Donorvektor besitzt das ccdB-Gen, welches für einen Gyrasehemmer codiert und so der negativen Selektion dient. Dieses Gen ist von den Bindungsstellen P (attP) flankiert.

Bei der BP-Reaktion handelt es sich um den lysogenen Reaktionspfad, der durch die Gateway BP Clonase II katalysiert wird. Diese enthält das Enzym Integrase (Int) der Bakteriophage Lambda und die Proteine von *E. coli*, die sogenannten Integration Host Factor (IHF)-Proteine. Durch Rekombination des attB-Substrats, welches das zu exprimierende Gen enthält, mit dem attP-Substrat, das auch als Donor-Vektor bezeichnet wird, erhält man den Eingangsklon (engl.: „entry“). Durch die Rekombination ändern sich die Bindungsstellen. Die Bindungsstellen des Eingangsklons bezeichnet man als Bindungsstellen L (attL). Zwischen diesen Bindungsstellen L befindet sich nun die gewünschte rekombinante Gensequenz (s. Abb. 10). Als Bei-Produkt bleibt das ccdB-Gen, welches an beiden Seiten attR-Bindungsstellen trägt.

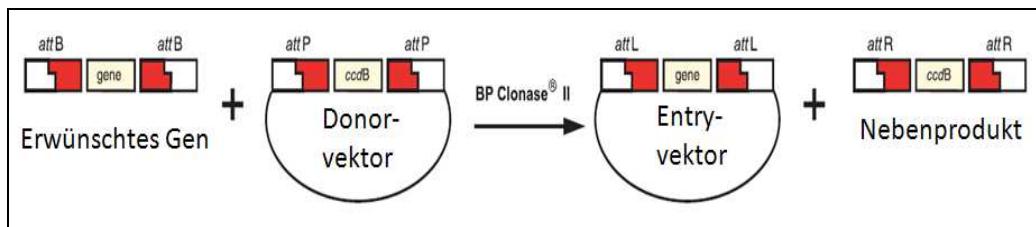


Abbildung 10: BP-Reaktion der Gateway-Klonierung, schematisch (INVITROGEN, 2012). Das erwünschte Gen (attB) wird mit dem Enzym-Mix BP Clonase II (Int, IHF) in einen Vektor (attP) integriert. Das daraus entstehende Plasmid ist der Entry-Vektor (attL).

11.2. LR-Reaktion

Bei der LR-Reaktion verläuft der Reaktionspfad lytisch und wird durch die Gateway LR Clonase II katalysiert. Diese enthält neben dem Enzym Integrase (Int) und den Integration Host Factor (IHF)-Proteinen zusätzlich das Enzym Excisionase (Xis) der Bakteriophage Lambda. Die LR-Reaktion ermöglicht die Rekombination des gewünschten Gens im Entry-Vektor, auch attL-Substrat genannt, mit dem ccdB-Gen im Ziel-Vektor, auch attR-Substrat genannt. Enthält der Zielvektor nach erfolgreicher Rekombination die gewünschte Gensequenz, nennt man ihn Expressionsvektor. Der Expressionsvektor besitzt die Bindungsstellen B (attB-sites), die die eingefügte Gensequenz flankieren. Als Bei-Produkt entsteht ein Plasmid, welches zwischen den Bindungsstellen P (attP) die ccdB-Gensequenz trägt. Das ccdB-Gen codiert für einen Gyrasehemmer und dient der Negativselektion (s. Abb. 11).

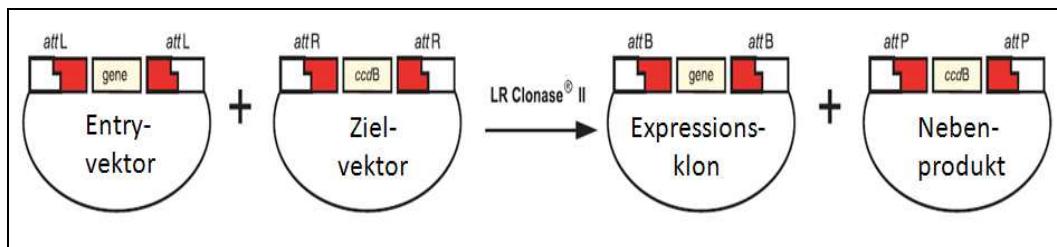


Abbildung 11: LR-Reaktion der Gateway-Klonierung, schematisch (INVITROGEN, 2012). Durch Rekombination wird das gewünschte Gen aus dem Entry-Vektor in den Zielvektor integriert. Das daraus entstehende Reaktionsprodukt ist der Expressionsklon. Katalysiert wird diese Reaktion von dem Enzym-Mix LR Clonase II (Int, IHF, Xis).

12. Baculovirales Proteinexpressionssystem

Das Bac-to-Bac Baculovirus Expressionssystem der Firma Invitrogen ermöglicht die in-vitro-Herstellung rekombinanter Baculoviren.

Die gewünschte Gensequenz wird via Gateway-Klonierung in den Zielvektor („DONR-Vektor“) integriert. Anschließend wird dieses Transgen in *E. coli* DH10Bac transformiert. *E. coli* DH10Bac enthält das Bacmid bMON14272 (136 kb), welches das Genom des Baculovirus trägt, sowie das Helferplasmid pMON7124 (13,2 kb). Das Helferplasmid codiert für eine Tetracyclin-Resistenz und für das Enzym Transposase, das benötigt wird, um das Tn7-Segment des rekombinanten Plasmids in das Bacmid einzufügen. Das Bacmid enthält neben dem Genom des Baculovirus AcMNPV die Gensequenz für eine Kanamycin-Resistenz, für einige wenige Kopien des Mini-F-Replikons und ein DNA-Segment mit LacZ α , das zusätzlich die Anlagerungsstelle miniattTn7 für das bakterielle Transposon Tn7 beinhaltet. Indem das Tn7-Segment durch Transposition in die miniattTn7-Anlagerungsstelle des Bacmids integriert wird, entsteht das rekombinante Bacmid. Ist die Transformation erfolgreich, wird dadurch die LacZ α -Sequenz unterbrochen und die Expression des LacZ α -Peptids verhindert. Die Kolonien, die ein rekombinantes Bacmid enthalten, sind auf speziellen Agarplatten für DH10Bac (s. III/3.) von weißer Farbe. Bei den blauen Kolonien ist die LacZ α -Kassette intakt und das Bacmid unverändert. Anschließend wird aus den weißen Kolonien die rekombinante Bacmid-DNA isoliert. Diese rekombinante Bacmid-DNA wird zur Transfektion der Insektenzellen verwendet. Die transfizierten Insektenzellen erzeugen rekombinante Baculoviren, welche in den Zellkulturerstand freigesetzt werden. Da das gewünschte Gen in der baculoviralen DNA integriert ist, exprimiert das rekombinante Virus neben den

eigenen Proteinen auch das rekombinante Protein. Abbildung 12 zeigt die Arbeitsschritte der baculoviralen Proteinexpression im Überblick.

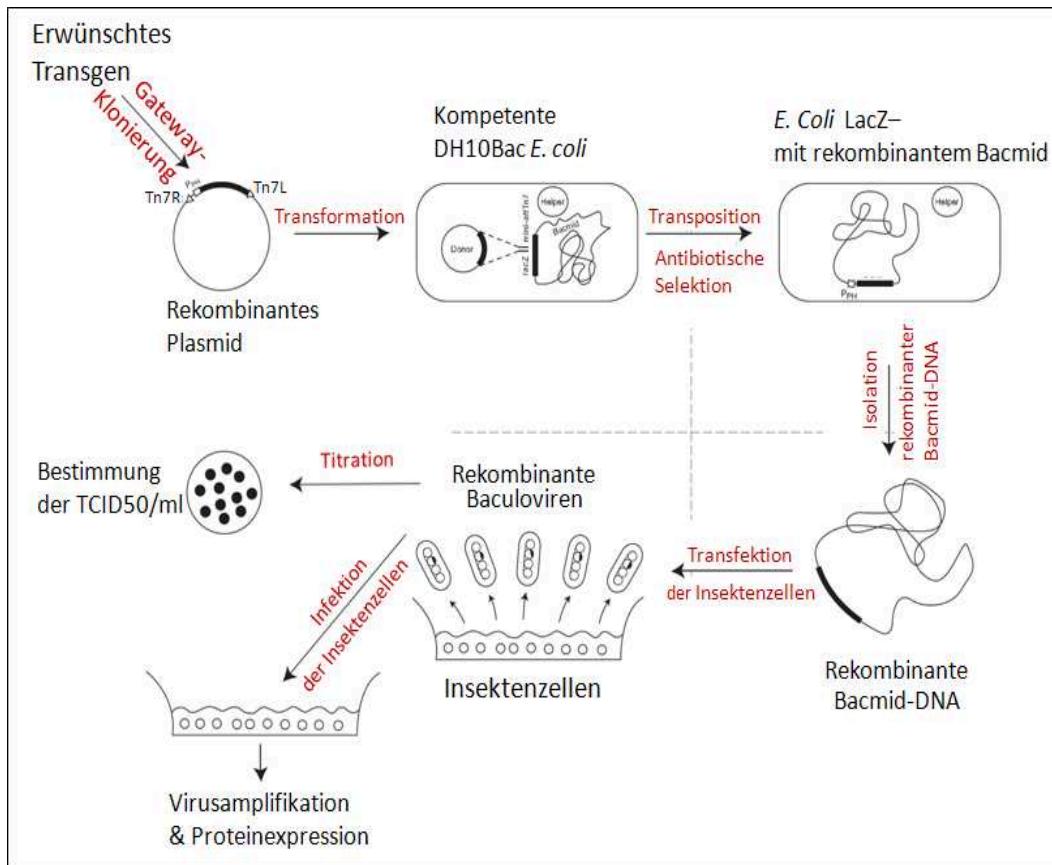


Abbildung 12: Übersicht zur baculoviralen Proteinexpression, modifiziert nach (INVITROGEN, 2013a). Das erwünschte Transgen wird in den Zielvektor integriert und anschließend in kompetente *E. coli* DH10Bac transformiert. Die Blau-Weiß-Selektion dient zur Erkennung der Kolonien mit rekombinanter Bacmid-DNA. Diese wird isoliert und zur Transfektion der Insektenzellen verwendet. Nach Titerbestimmung werden die rekombinanten Baculoviren amplifiziert und zur Proteinexpression eingesetzt.

In dieser Arbeit war das erwünschte Gen die trunkierte HEV-ORF2-Sequenz. Diese wurde in den pDEST8-Vektor kloniert. Der Expressionsvektor pDEST8-ORF2 wurde in kompetente *E. coli* DH10Bac transformiert, um durch Integration der entsprechenden Gensequenz Bakterien mit rekombinanter Bacmid-DNA zu erzeugen. Die rekombinante Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 wurde isoliert. Abbildung 13 stellt die Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA detailliert dar.

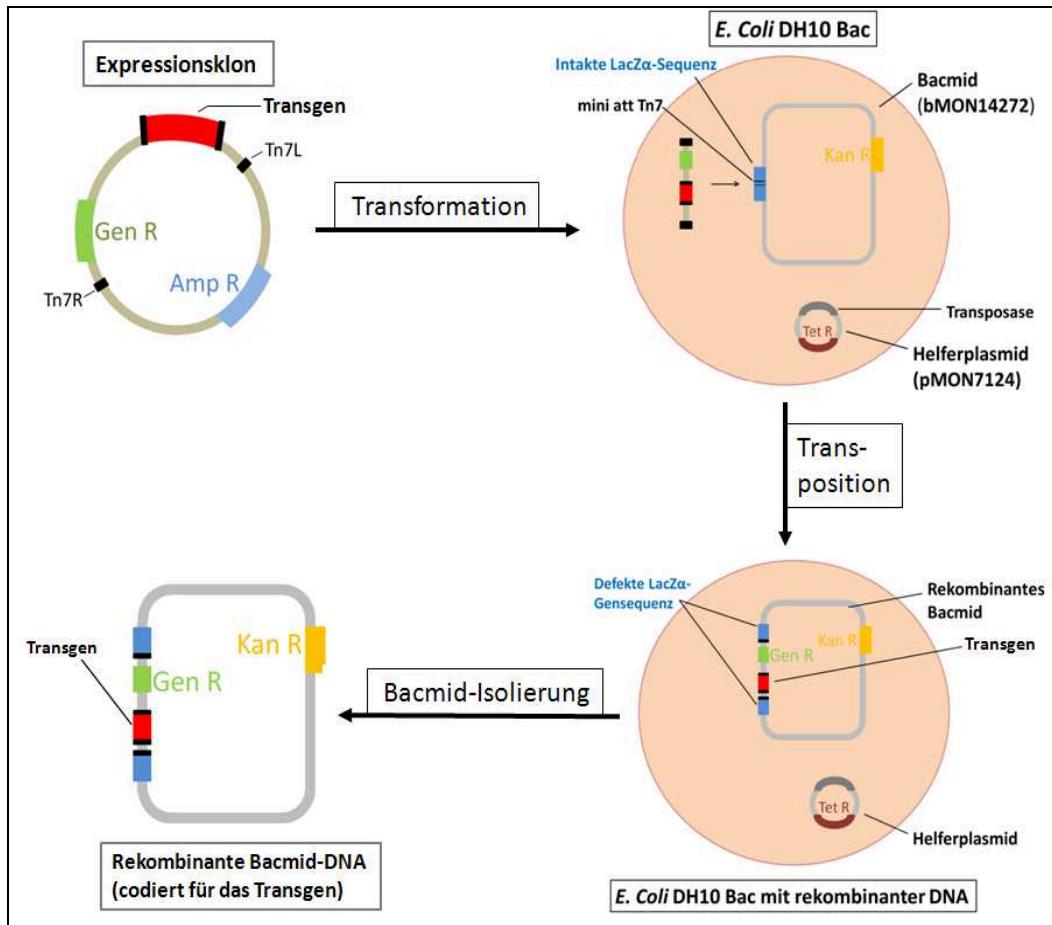


Abbildung 13: Übersicht zur Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA. Zur Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA wird das Transgen zwischen Tn7R und Tn7L in das Bacmid bMON14272 der *E. coli* DH10 Bac-Zelle transformiert. Anschließend wird die Gensequenz in die miniattTn7-Bindungsstelle der LacZα-Kassette integriert. Aus diesen Kolonien wird die rekombinante Bacmid-DNA isoliert. (Amp: Ampicillin, Gen: Gentamicin, Kan: Kanamycin, ORF: Open reading frame, R: Resistenzgen, Tet: Tetracyclin)

Zur Transfektion, Virusamplifikation und Proteinexpression wurden in dieser Arbeit Sf9-Insektenzellen verwendet. Die Verdünnungs-Titration zum Endpunkt wurde mit Sf9ET-Insektenzellen durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine spezielle Titrationszelllinie für Baculoviren, welche das vom baculoviralen Polyhedrin-Promotor kontrollierte eGFP-Gen besitzt.

13. Molekularbiologische Methoden

13.1. Herstellung der Expressionsvektoren mit der Gateway-Technologie

In der BP-Reaktion wurde die trunkierte HEV-ORF2-Gensequenz in den Vektor pDONR207 hinein rekombiniert. Die ORF2-Gensequenz des Genotyps 1

entspricht einer trunkierten HEV-ORF2-Wildtypsequenz (GenBank Eintragungsnummer: L08816aa, nt 334-1824 bzw. aa 112-608) und wurde nicht codonoptimiert. Die trunkierte ORF2-Gensequenz der Genotypen 2 (GenBank Eintragungsnummer: M74506.1, aa 112-607), 3 (AB189074.1, aa 112-608) und 4 (AB097812.1, aa 112-608) wurde für Insektenzellen codonoptimiert und von der Firma GeneArt synthetisiert.

Durch LR-Reaktion wurden die trunkierten HEV-ORF2-Genabschnitte in den Zielvektor pDEST8 rekombiniert (s. III/11.2.). Dieser besitzt eine Gentamicin-Resistenz, einen Polyhedrin-Promotor auf der Gateway-Rekombinationskassette und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Der Polyhedrin-Promotor steuert die Expression des rekombinanten Proteins aus Sf9-Insektenzellen, während das SV40-Polyadenylierungssignal für die Polyadenylierung der mRNA sowie für die Transkriptionstermination sorgt.

Die Reagenzien für den LR-Reaktionsansatz wurden in derselben Reihenfolge, wie in Tabelle 6 aufgelistet, in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 3 h bei 25°C inkubiert.

Destilliertes Wasser	1,0 µl	
Zielvektor pDEST8	1,5 µl	100 ng/µl
Eingangsklon mit HEV-ORF2-Gensequenz	1,5 µl	100 ng/µl
LR-Mix	1,0 µl	
Gesamtvolumen	5,0 µl	

Tabelle 6: Ligationsansatz für die Gateway-LR-Reaktion. Der LR-Mix enthält die Enzyme Int (Integrase), IHF (Integration Host Factor) und Xis (Excisionase), welche die LR-Reaktion katalysieren.

War die LR-Reaktion erfolgreich, trägt das rekombinante Plasmid pDEST8-ORF2 (GT 1-4), auch Expressionsvektor genannt, flankiert von Tn7 Transposase-Erkennungsstellen (Tn7R und Tn7L) die trunkierte ORF2-Sequenz des Hepatitis E Virus.

13.2. Transformation

Unter Transformation versteht man die nicht-virale Übertragung von freier DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen. In der Gentechnik ist dies eine bewährte Methode, um Plasmid-DNA zu vervielfältigen.

13.2.1. Transformation des Expressionsklons in *E. coli* Top10

Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* “One Shot TOP10” verwendet. Der Genotyp der TOP10 Zellen lautet:

F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80/*lacZΔM15* Δ/*lacX74* *recA1*

araD139 Δ(*ara.leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (*Str^R*) *endA1* *nupG*

Für die Transformationsreaktion wurden je Reaktionsansatz 75 µl chemisch kompetente *E.coli* Top10 auf Eis aufgetaut. Der LR-Ansatz (s. III/13.1), welcher auch den Expressionsklon pDEST8-ORF2 enthält, wurde zu den aufgetauten Zellen pipettiert, vorsichtig vermengt und 20 min. auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschockprozess bei 42°C wurde der Ansatz 3 min. auf Eis heruntergekühlt. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium wurde der Ansatz 45 min. bei 37°C inkubiert. Je 100 µl, 50 µl und 10 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Ampicillin-Agar (s. III/3.) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Um zu verifizieren, dass die LR-Reaktion und Transformation korrekt verlaufen sind, wurden Kolonien gepickt, die Plasmid-DNA isoliert und via Restriktionsverdau (s. III/13.4.1.) analysiert.

13.2.2. Transformation der Expressionsklone in *E. coli* DH10Bac

Die *E. coli* DH10Bac Zellen enthalten das Bacmid bMON14272, in welches die HEV-ORF2-Genabschnitte integriert werden sollen. Für die Transformation der Expressionsklone pDEST8-ORF2 (GT 1-4) in *E. coli* DH10Bac wurden 25 µl chemisch kompetente *E. coli* MAX Efficiency DH10Bac auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 5 µl (1 ng) des rekombinanten Plasmids pDEST8-ORF2 aus einer Minipräparation (s. III/13.3.1.) gegeben. Zur Kontrolle wurde derselbe Ansatz mit 5 µl (50pg) pUC19 durchgeführt. Der Transformationsansatz wurde 30 min. auf Eis inkubiert. Nach 45 sec. Hitzeschockprozess bei 42° wurde der Ansatz nochmals 2 min. auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 225 µl S.O.C.-Medium wurde der Ansatz im Schüttelinkubator mit 225 rpm bei 37°C für 4 h inkubiert. Das S.O.C.-Nährmedium sorgt für eine verbesserte Vitalität der *E. coli* Zellen und somit für eine höhere Transformationsrate. Es wurden drei Verdünnungsstufen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) mit S.O.C.-Medium hergestellt. 100 µl jeder Verdünnung wurden auf LB-Agar für *E. coli* DH10Bac (s. III/3.) ausgespaltet und 48 h bei 37°C bebrütet. Von der pUC19-Kontrolle wurden 100 µl einer 1:100 Verdünnung

auf LB-Ampicillin-Agar (s. III/3.) ausgespaltet und ebenfalls 48 h bei 37°C inkubiert.

Die Agarplatten für *E. coli* DH10Bac enthalten IPTG und X-Gal. IPTG ist ein künstlicher Induktor, der das Lac-Operon aktiviert. Infolge dessen exprimiert der LacZ α -Genabschnitt das Enzym β -Galactosidase, welches das chromogene Substrat X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol hydrolysiert. Das 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol wird durch Luftsauerstoff zum blauen 5,5-Dibrom-4,4-dichlor-indigo oxidiert. Folglich erscheinen die Kolonien mit unverändertem Bacmid und somit funktionsfähiger LacZ α -Gensequenz blau. Das bedeutet, dass die Transformation nicht erfolgreich war und der HEV ORF2-Genabschnitt nicht in das Bacmid integriert werden konnte (s. III/12. u. Abb. 13).

Bei erfolgreicher Insertion der mini-Tn7-Sequenz des rekombinanten Plasmids pDEST8-ORF2 in die mini-attTn7-Bindungsstelle des Bacmids bMON14272 wird die LacZ α -Gensequenz unterbrochen. Folglich wird die Expression des LacZ α -Peptids verhindert und die Kolonien, welche das rekombinante Bacmid besitzen, sind von weißer Farbe. Die weißen Kolonien wurden gepickt und mehrfach auf frisches LB-Agar für *E. coli* DH10Bac (s. III/3.) überimpft, um sicherzustellen, dass mit einem reinen Klon weitergearbeitet wird. Von jener Agarplatte, welche von rein weißen Kolonien übersät war, wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in LB-Medium für *E. coli* DH10Bac (s. III/3.) bei 37°C in einer Übernachtkultur angereichert. Die rekombinante Bacmid-DNA wurde isoliert (s. III/13.3.1.) und mit Hilfe der pUC/M13-PCR (s. III/13.4.2.) überprüft. Anschließend wurde zur Steigerung der Ausbeute ein größeres Kulturvolumen angesetzt, woraus die rekombinante Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4) mit der Methode der Maxipräparation (s. III/13.3.2.) isoliert werden konnte.

13.3. Präparation von Plasmid-DNA

Die Technik der Plasmidpräparation ermöglicht es, Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen zu isolieren.

13.3.1. Minipräparation (1,5 ml Kultur)

Zur Isolierung der rekombinanten Plasmid-DNA pDEST8-ORF2 (GT 1-4) aus *E. coli* Top 10 und zur Isolierung der rekombinanten Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4) aus *E. coli* DH10Bac wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (s. III/9.) verwendet.

Jede gepickte Bakterienkolonie wurde in Schüttelröhrchen mit je 3,5 ml des entsprechenden LB-Mediums (s. III/3.) inkokuliert und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet.

Zur Herstellung der Minipräparationen wurde von jeder Übernachtkultur 1,5 ml abpipettiert und die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde im NanoDrop bestimmt (s. III/13.3.4.).

13.3.2. Maxipräparation (500 ml Kultur)

Zur Isolation großer Mengen rekombinanter Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4) aus *E. coli* DH10Bac wurde das NucleoBond Xtra BAC Plasmid Maxiprep Kit (s. III/9.) verwendet.

Es wurde je eine Übernachtkultur der rekombinanten Bacmide bMON14272-ORF2 (GT1-4) hergestellt, indem 1 ml Anreicherungsbouillon zu 500 ml LB-Medium für DH10Bac (s. III/3.) gegeben und diese über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet wurde. Die Isolation der Bacmid-DNA erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Die DNA-Konzentration wurde im NanoDrop bestimmt (s. III/13.3.4.). Die Aufbewahrung der angefertigten Aliquots erfolgte bei 4°C. Dieser Temperaturbereich dient der kurzfristigen Lagerung jener Menge, die zur Weiterverarbeitung bereitgehalten werden soll. Die Haltbarkeit der Bacmid-DNA bei 4°C liegt bei maximal vier Wochen.

13.3.3. Herstellung von Glycerolstocks

Um Dauerkulturen der rekombinanten *E.coli* DH10Bac-Zellen (s. III/13.2.2.) anzulegen, wurden 0,75 ml der Maxi-Präp-Übernachtkultur (s. III/13.3.2.) in ein Cryoröhrchen pipettiert und 0,25 ml steriles 80%iges Glycerin zugegeben. Die Glycerolstocks wurden gevortext und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

13.3.4. Quantitative Nukleinsäureanalyse

Um die Konzentration der isolierten Plasmid- oder Bacmid-DNA (s. III/13.3.) zu bestimmen, wurde von jeder Probe 1 µl mit dem NanoDrop 1000 Photometer vermessen. Als Leerwert diente destilliertes Wasser.

13.4. Überprüfung der Integrität des inserierten Transgens

Um die Insertgröße eines Plasmids zu bestimmen, können verschiedene Nachweisverfahren zum Einsatz kommen. In dieser Arbeit wurde der Restriktionsverdau und die qualitative Endpunkt-PCR genutzt.

13.4.1. Restriktionsverdau mit BsrGI

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen artfremder bzw. viraler DNA und können deren Phosphodiester-Brücken spalten. Die Sequenz ist sehr häufig palindromisch (z.B. BsrGI: 5'_T'GTACA_3').

Ausgangsmaterial für den Restriktionsverdau war die rekombinante Plasmid-DNA pDEST8-ORF2 (GT 1-4), welche mittels Minipräparation (s. III/13.3.1.) isoliert wurde. Mit Hilfe des Restriktionsenzymes BsrGI konnte überprüft werden, ob die Transformation (s. III/13.2.1.) der ORF2-tragenden Plasmide in die chemisch kompetenten *E. coli* Top 10-Bakterien erfolgreich war.

Für den Restriktionsverdau wurde ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl hergestellt. Dieser enthielt 0,25 µl BsrGI-Enzym, 0,1 µl BSA, 1,0 µl NE-Puffer (10x), 5,65 µl destilliertes Wasser und 3,0 µl (bzw. 1 µg) Plasmid-DNA und wurde für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente der pDEST8-Leervektor.

13.4.2. PCR mit pUC/M13-Primern

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Vervielfältigung einer genau definierten DNA-Sequenz *in vitro*. Dazu werden zwei einzelsträngige, speziell synthetisierte Primer benötigt, die komplementär an die Matrize binden können. Die PCR-Reaktion verläuft in drei Schritten. Das Erhitzen des Ansatzes im Thermocycler führt zur thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, woraus sich zwei Einzelstränge bilden. Anschließend wird durch Abkühlen des Ansatzes die Anlagerung der Primer an die Matrize, das sog. Annealing, ermöglicht. Die thermostabile Taq-Polymerase katalysiert die Anlagerung der hinzugegebenen DNA-Nukleotide an die Primer komplementär zum DNA-Einzelstrang, der als Matrize fungiert. Dieser dritte Reaktionsschritt wird als Elongation bezeichnet. Anschließend beginnt der Zyklus von neuem, wobei auch die neu synthetisierten DNA-Sequenzen als Matrize dienen. Dadurch wird eine exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz erzielt.

Zum Nachweis der rekombinanten Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4) wurde eine PCR mit den Primern pUC/M13-Forward und pUC/M13-Reverse (s. III/9.) durchgeführt. Diese Primer binden zu beiden Seiten der mini-attTn7-Region, welche die trunkierte HEV-ORF2-Gensequenz enthält (s. Abb. 14).

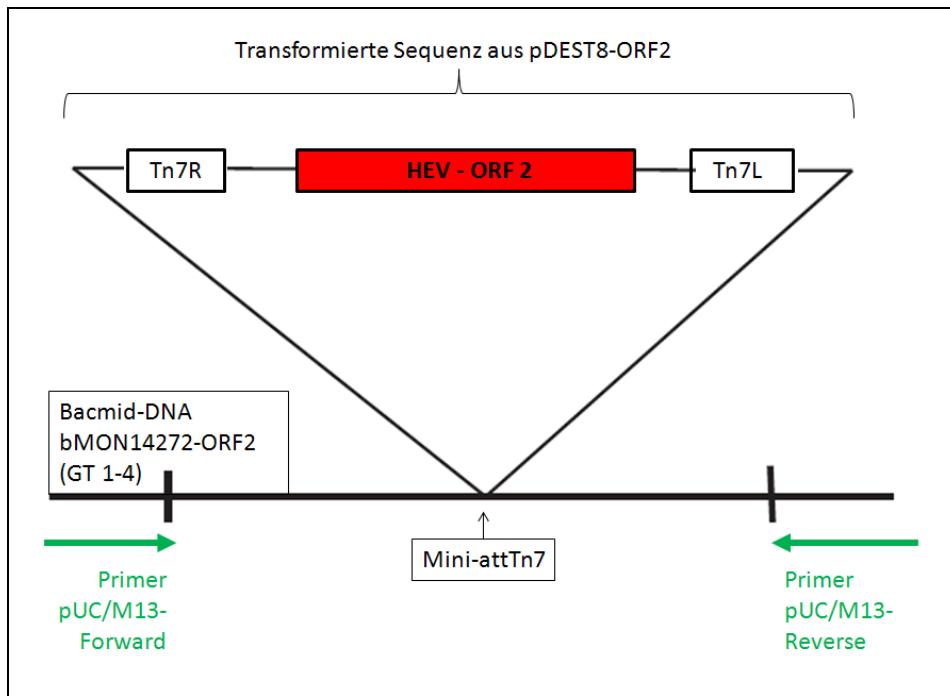


Abbildung 14: pUC/M13-PCR zum Nachweis der rekombinanten Bacmide bMON14272-ORF2 (GT 1-4), modifiziert nach (LIU et al., 2014). Mit den Primern pUC/M13-Forward und pUC/M13-Reverse wird die Tn7-Sequenz der rekombinanten Bacmin-DNA, welche die ORF2-Sequenz beinhaltet, amplifiziert und die Fragmente anschließend im Bioanalyzer ausgewertet.

Die Zusammensetzung des Mastermix besteht neben den beiden Primern pUC/M13-Forward und pUC/M13-Reverse aus dem 2-fach konzentrierten HotStarTaq MasterMix und destilliertem Wasser. Das genaue Mischungsverhältnis ist Tabelle 7 zu entnehmen. Die beiden Primer wie auch die Template-DNA wurden 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

	1x	20x
Destilliertes Wasser	6,5 µl	130 µl
2-fach PCR-Reaktionsmix = (HotStarTaqMasterMix)	12,5 µl	250 µl
Primer pUC/M13-Forward (1:10 Verd.)	0,5 µl	10 µl
Primer pUC/M13-Reverse (1:10 Verd.)	0,5 µl	10 µl
Gesamtvolumen Mastermix	20 µl	400 µl

Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix zur Template-Vorbereitung auf die pUC/M13-PCR.

5 µl Template-Verdünnung wurden zu 20 µl Mastermix-Lösung pipettiert. Diese Proben wurden anschließend gevortext und im Thermocycler mit dem in Tabelle 8 angegebenen Programm vervielfältigt.

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initialisierung	15 min.	95 °C	1x
Denaturierung	45 sec.	94 °C	30x
Primerhybridisierung	30 sec.	57 °C	
Amplifikation	2 min.	72 °C	
Abschlusszyklus	5 min.	72 °C	1x
Kühlung	∞	4°C	1x

Tabelle 8: Thermocycler-Programm der pUC/M13-PCR.

13.4.3. Qualitative Nukleinsäureanalyse

Das Laborgerät Agilent-2100-Bioanalyzer analysiert DNA-Fragmente basierend auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese. Diese Lab-on-a-Chip-Technologie kann eine herkömmliche analytische Agarose-Gelelektrophorese ersetzen. Durch Mikrofluidtechnologie wird eine gleichzeitige und automatisierte Auswertung von 12 DNA-Proben bezüglich ihrer Konzentration und Größe ermöglicht. Aus diesen Daten generiert der Bioanalyzer Elektropherogramme (Peaks) und gelartige Bilder (Banden). Um die Integrität der isolierten DNA zu überprüfen wurde das 7500-DNA-Kit verwendet, dessen Messbereich für dsDNA-Fragmente zwischen 100 bp und 7500 bp liegt.

13.5. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-Insertsequenzen wurde bei der Firma *GATC Biotech* durchgeführt.

Hierfür wurden die Proben gemäß der Vorgaben für “Light-Run”-Sequenzierung angesetzt.

Die beiden Primer pBacPAK-FP und EBV-RP (s. III/9.) flankieren die Rekombinationskassette des Plasmids pDEST8-ORF2 (GT 1-4). Dadurch konnten alle HEV-ORF2-Sequenzen verifiziert werden.

Mit Hilfe der *BioEdit* Software wurden die Daten ausgewertet und mit Referenzsequenzen abgeglichen.

14. Zellkulturverfahren

14.1. Kultivierung von Sf9- und Sf9ET-Insektenzellen

Beide Insektenzelllinien wurden in Suspension in Erlenmeyerkolben bei 27°C und 80 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Zusammensetzung der Nährmedien für die Sf9-Insektenzellen und für die Sf9ET-Insektenzellen ist im Gliederungspunkt III/3. aufgeführt.

Um die Insektenzellen in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten wurden sie jeden zweiten Tag auf eine Dichte von 1×10^6 Zellen/ml gesplittet, bzw. verdünnt.

14.2. Zellzahlbestimmung

Zur Überprüfung der Zellzahl pro ml wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellsuspension auf eine Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal aufgetragen. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der Zellen in 16 Kleinstquadranten mit einem mechanischen Zellzählgerät bestimmt.

Diese Gesamtzahl der Zellen in 16 Kleinstquadranten multipliziert mit dem Faktor 50.000 ergibt die Zellzahl pro ml.

14.3. Vitalitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Zellvitalität nach dem Auftauen wurde ein Teil Zellsuspension mit zwei Teilen Trypanblau gemischt und auf die Fuchs-Rosenthal-Zählkammer aufgetragen. Trypanblau färbt tote Zellen nach ca. einer Minute blau an. In lebende Zellen mit intakter Zellmembran kann Trypanblau nicht eindringen und sie bleiben somit farblos.

Zur Berechnung der prozentualen Vitalität der Zellen wurden in 16 Kleinstquadranten alle angefärbten defekten Zellen gezählt. In einem zweiten Zähldurchgang wurde die Gesamtzahl der Zellen, also Vitale und Defekte, ermittelt. Mit nachstehender Formel wurde die prozentuale Zellvitalität berechnet:

$$\text{Vitale Zellen (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Anzahl blauer Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \right) \right] \times 100$$

Zellsuspensionen, welche zur Transfektion verwendet werden, sollten eine Zellvitalität von mindestens 95% besitzen (INVITROGEN, 2013b).

15. Virologische Methoden

15.1. Herstellung rekombinanter Baculoviren durch Bacmid-Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen fremder DNA in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurden Sf9-Insektenzellen mit rekombinanter Baculovirus-(Bacmid-)DNA AcMNPV-ORF2 (GT 1-4) transfiziert. Diese rekombinante Baculovirus-DNA trägt jeweils eine Form der trunkierten HEV-ORF2-Gensequenz der vier Genotypen in sich, welche für das Kapsidprotein des Hepatitis E Virus kodiert. Nach erfolgreicher Transfektion produzieren die Sf9-Zellen rekombinante Baculoviren, welche sich sowohl in den Zellen als auch im Zellkulturüberstand befinden.

Zwei Stunden vor der Transfektion wurden in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte 1,6 ml Sf9-Zellsuspension mit einer Zelldichte von $1,25 \times 10^6$ Zellen/ml pipettiert und bei 27°C inkubiert, um eine Anhaftung der Sf9-Zellen am Plattenboden zu erzielen (POLYPLUS-TRANSFECTION, 2010).

Anschließend wurden zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit je 100 µl NaCl (150 mM) gefüllt. In eines dieser Reaktionsgefäße wurden 9 µg rekombinante Baculovirus-(Bacmid-)DNA zugegeben und durch vortexen gemischt. In das andere Reaktionsgefäß wurden 9 µl FectoFly-Transfektionsreagenz hinzugefügt und gemischt. Die FectoFly-Verdünnung wurde in die DNA-Verdünnung pipettiert, 10 sec. gevortext und für 30 min. bei RT inkubiert. Diese FectoFly-DNA-Mixtur wurde tropfenweise auf den Sf9-Zellrasen gegeben, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Nach einer Inkubationsdauer von 4 h bei 27°C wurde in jede Vertiefung 2 ml frisches Sf9-Medium pipettiert. Der Ansatz wurde weitere 72 h bei 27°C inkubiert (s. Abb. 15).

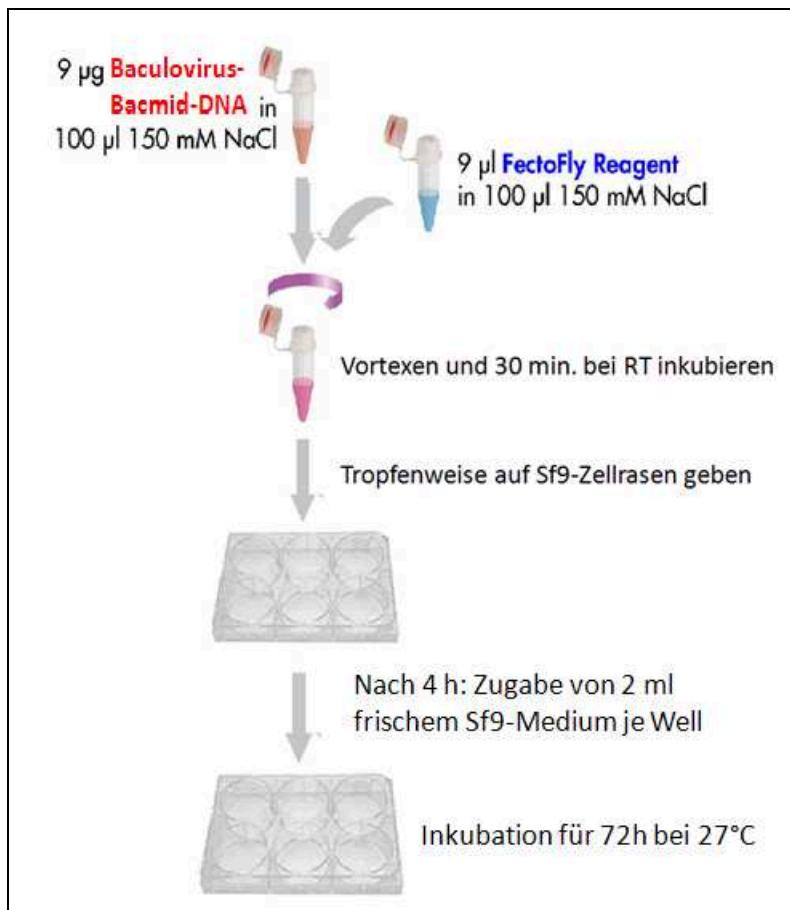


Abbildung 15: Transfektion von Sf9-Zellen in 6-Well-Platten mit dem FectoFly-Transfektionsreagenz (POLYPLUS-TRANSFECTION, 2010)

Es wurden zwei verschiedene Negativkontrollen durchgeführt. Die rekombinante Baculovirus-(Bacmid-)DNA wurde in der ersten Negativkontrolle durch 20 µl H₂O ersetzt; in der zweiten Negativkontrolle durch 9 µg nicht-rekombinante Baculovirus-(Bacmid-)DNA.

15.2. Ernte der rekombinanten Baculoviren

Nachdem der Transfektionsansatz (s. III/15.1.) 72 h inkubiert wurde konnten die rekombinanten Baculoviren geerntet werden. Dazu wurde der Überstand vorsichtig und ohne den Zellrasen zu verletzen mit einer Pipette abpipettiert, in ein steriles Tube gegeben und bei 500 x g für 5 min. zentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und lichtgeschützt bei +4°C aufbewahrt. Dieser klare Überstand ist der P0-Virus-Stock. Ein 1-ml-Aliquot wurde bei -20°C zur Langzeitaufbewahrung tiefgekühlt. Das Pellet wurde verworfen.

Auf den noch bestehenden Zellrasen wurden 200 µl PBS pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die nun in PBS schwimmenden Sf9-Zellen wurden

vorsichtig abpipettiert und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden ebenfalls bei 500 x g für 5 min. zentrifugiert. Der PBS-Überstand wurde vorsichtig und ohne das Pellet aufzuwirbeln abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde bei -20°C aufbewahrt.

15.3. Titration der Virusstocks mit Sf9ET-Insektenzellen

Die Endpunkt-Verdünnungstitration ermöglicht es, die in den Virusstocks befindlichen rekombinanten Baculoviren zu quantifizieren. Hierfür werden Sf9ET-Insektenzellen genutzt. Dabei handelt es sich um eine Titrationszelllinie für Baculoviren, in deren Genom die Sequenz des Fluoreszenzproteins eGFP integriert wurde. Das eGFP-Gen steht unter Kontrolle des baculoviralen Polyhedrinpromotors. Folglich wird das eGFP-Gen nur transkribiert, wenn die Sf9ET-Zelle mit einem Baculovirus infiziert wurde. Dadurch können erfolgreich infizierte Sf9ET-Insektenzellen durch ihre grüne Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden (HOPKINS & ESPOSITO, 2009).

In 56 Vertiefungen einer 96-Well-Platte wurden je 75 µl Sf9ET-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml pipettiert. Anschließend wurde eine dezimale Verdünnungsreihe des Virusstocks mit Sf9ET-Medium (s. III/3.) von 10^{-3} bis 10^{-9} angelegt. 25 µl jeder Verdünnungsstufe wurden in je acht Vertiefungen pipettiert, sodass jedes Well ein Gesamtvolumen von 100 µl beinhaltete. Die Platte wurde drei Tage bei 27°C inkubiert. Als Negativ-Kontrolle dienten unveränderte Sf9ET-Zellen (s. Abb. 16).

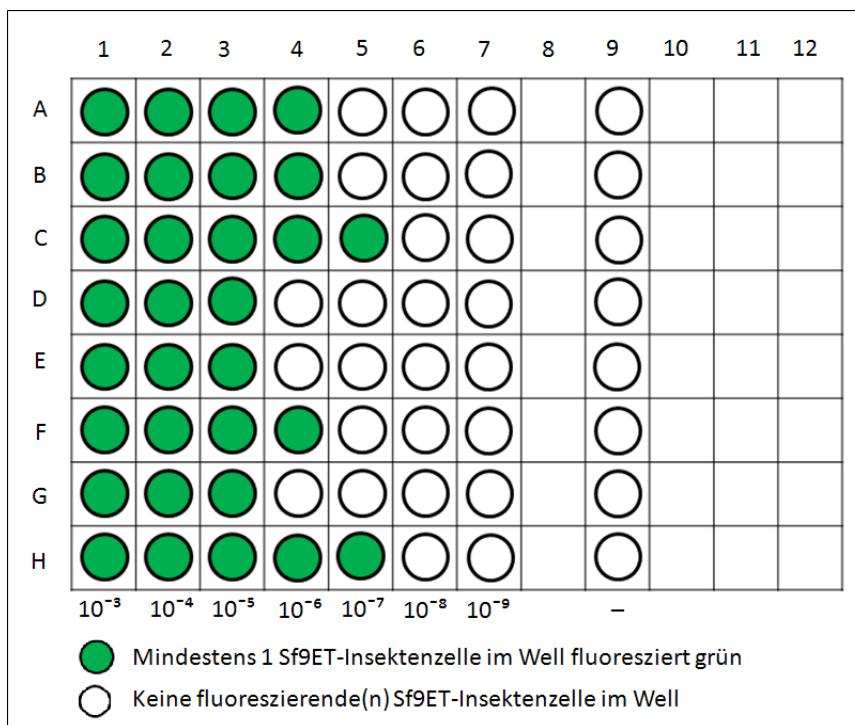


Abbildung 16: Titrationsplatte mit grün-fluoreszierenden Sf9ET-Zellen in ansteigenden Verdünnungsstufen, schematisch. Sf9ET-Zellen, die die rekombinante Baculovirus-DNA integriert haben, leuchten im Fluoreszenzmikroskop unter blauem Licht grün; Negativkontrolle (-): unveränderte Sf9ET-Zellen;

Die Auswertung erfolgte nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip: Beinhaltete das Well keine fluoreszierende Zelle, wurde es negativ bewertet. Zeigten sich im Well eine oder mehrere fluoreszierende Zelle(n), wurde es positiv bewertet. Mit dem Reed & Muench Calculator (LINDENBACH, 2004) wurde anschließend die TCID₅₀/ml berechnet. Der errechnete Wert gibt an, bei welcher Virusstock-Konzentration 50% der Zellkulturen infiziert werden, wenn ein Virusstock-Volumen von 1 ml zugegeben wird. Die Ermittlung der TCID₅₀/ml ist nötig, um sowohl die Amplifikation der rekombinanten Baculoviren (s. III/15.4.) als auch die Proteinexpression (s. III/15.6.) mit definierter MOI durchführen zu können.

15.4. Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Zur Amplifikation der rekombinanten Baculoviren AcMNPV-ORF2 (GT 1-4) wurden 20 ml Sf9-Zellsuspension mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit P0-Virusstock versetzt. Das hierfür benötigte Volumen des P0-Virusstocks wurde anhand der nachfolgenden Formel errechnet (INVITROGEN, 2013a):

$$\text{Erforderliches Virusstock - Volumen (ml)} = \frac{\text{MOI} \times \text{Zellzahl}}{\text{TCID}_{50} / \text{ml}}$$

Die MOI beschreibt die eingesetzte Virusanzahl pro Zelle bei der Infektion einer Zellkultur. Zur Amplifikation der rekombinanten Baculoviren wurde mit einer MOI von 0,1 gearbeitet, da eine niedrige MOI die Qualität der Baculoviren bewahrt. Der jeweilige TCID₅₀/ml-Wert wurde durch die Verdünnungstitration zum Endpunkt ermittelt (s. III/13.3.). Unter Zellzahl wird die Anzahl der Sf9-Insektenzellen im Amplifikationsansatz (s.o.) verstanden. Dieser Ansatz wurde 4 d bei 27°C im Schüttler inkubiert.

15.5. Ernte des P1-Virusstocks

Um den P1-Virusstock zu ernten wurde der Ansatz bei 500 x g für 5 min. zentrifugiert. Der klare Überstand ist der P1-Virusstock. Dieser wird vorsichtig abpipettiert und bei +4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Ein 1-ml-Aliquot davon wurde zur Langzeitaufbewahrung bei -80°C tiefgekühlt. Das Pellet wurde ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

15.6. Baculovirale Proteinexpression in Sf9-Insektenzellen

Unter Proteinexpressionsansatz ist die Infektion von Sf9-Insektenzellen mit einem hohen MOI rekombinanter Baculoviren (AcMNPV-ORF2) zu verstehen, mit dem Ziel, dass die rekombinanten Baculoviren das rekombinante HEV-ORF2-Kapsidprotein exprimieren. Dafür wurden 50 ml Sf9-Zellsuspension mit einer Dichte von 2x10⁶ Zellen/ml verwendet. Die Zellsuspension wurde bei 1800 rpm für 10 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml Sf9-Medium resuspendiert und die entsprechende Menge P1-Virusstock hinzugegeben, sodass der Proteinexpressionsansatz eine MOI von 10 besitzt (Formel s. III/15.4.). Dieser wurde 1 h bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 45 ml frischem Sf9-Medium wurde der fertige Proteinexpressionsansatz im Schüttelinkubator 4 d bei 27°C bebrütet. Die infizierten Sf9-Zellen produzieren sowohl rekombinante Baculoviren als auch die HEV-ORF2-Kapsidproteine.

15.7. Ernte der rekombinanten ORF2-Proteine

Der Proteinexpressionsansatz wurde bei 500 x g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet bei -20°C gelagert. Der Überstand wurde nochmals bei 500 x g für 5 min. zentrifugiert und das daraus entstandene Pellet verworfen. Der klare Überstand, im Folgenden Zellkulturüberstand genannt, wurde mit PMSF (0,1%) versehen (s. III/16.1.) und bei -20°C gelagert.

16. Proteinchemische Methoden

16.1. Proteaseinhibition mit PMSF

PMSF wird als Protease-Inhibitor verwendet, um die exprimierten Proteine vor Degradation zu schützen. Zur Herstellung der PMSF-Stammlösung wurden 0,174 g PMSF in 10 ml Isopropanol gelöst, um eine Konzentration von 100 mM zu erhalten; das entspricht 17,4 mg/ml. Aliquots von 500 µl wurden bei -20°C auf Vorrat tiefgekühlt.

Die Arbeitskonzentration entspricht der 1000-fachen Verdünnung der Stammlösung, das heißt 17,4 µg/ml. Folglich wurden pro 1 ml Überstand der Proteinexpressionskultur 1 µl Stammlösung zugegeben.

16.2. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese) ist eine gelelektrophoretische Methode, um Proteine nach ihrer Molekülmasse aufzutrennen.

Das Bolt Mini Gel Tank-System diente als Elektrophoresekammer. Als Laufpuffer wurde der Bolt MES Laufpuffer (20x) verwendet. Die Zellpellets aus der Proteinexpression (s. III/15.7.) wurden für den Gellauf vorbereitet, indem zu jedem Pellet 100 µl einer Mixtur gegeben wurde, welche aus 25% Bolt LDS Sample Buffer (4x), 10% Bolt Reducing Agent (10x) und 65% deionisiertem Wasser bestand. Nach Resuspension der Zellpellets wurden sie im Heizblock 10 min. bei 70°C denaturiert. Die Probe wurde 3 min. bei 9000 rcf zentrifugiert und das Gel mit dem Überstand beladen.

Die Zellkulturüberstände aus der Proteinexpression (s. III/15.7.) wurden für den Gellauf vorbereitet, indem zu 65 µl aufgetauter Probe 25 µl Bolt LDS Sample Buffer (4x) und 10 µl Bolt Reducing Agent (10x) gegeben wurde. Nach gründlichem Vermischen erfolgte die Denaturierung im Heizblock für 10 min. bei 70°C.

Die Proteinproben wurden über einen Zeitraum von 35 min. elektrophoretisch aufgetrennt. Die elektrische Spannung betrug 165 V. Die verwendeten Bolt 4-12% Bis-Tris Plus Mini-Gele (10-well und 15-well) ermöglichen die Auftrennung von Proteinen zwischen 0,3 kDa und 260 kDa. Als Proteinmarker diente der SeeBlue Plus2, welcher 10 Banden im Bereich von 0 bis 200 kDa definiert.

16.3. Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wird mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau durchgeführt. Durch Anlagerung an die basischen Seitenketten der Aminosäuren können Proteine im Polyacrylamid-Gel unspezifisch angefärbt werden.

Das Gel mit den elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen wurde 30 min. bei RT in der Coomassie-Lösung (s. III/3.) angefärbt. Anschließend wurde das gefärbte Gel mit dH₂O abgespült und getrocknet.

16.4. Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, um die Proteinbanden im Polyacrylamid-Gel (s. III/16.2.) auf eine Trägermembran zu transferieren und diese anschließend immunologisch detektieren zu können. Zuerst bindet ein Primärantikörper an das Antigen auf der Nitrocellulosemembran. Im nächsten Reaktionsschritt bindet an den Primärantikörper ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper. Dadurch kommt es nach Zugabe des entsprechenden Detektionsreagens zu einer Enzym-Substrat-Reaktion und somit zur spezifischen Färbung der detektierten Proteinbanden.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde nach Herstellerangaben mit dem Programm “P0” des Blotting-Geräts iBlot Gel Transfer Device durchgeführt. Die Membran wurde kurz mit dH₂O abgespült und der Proteintransfer mit der reversiblen Ponceau-S-Färbelösung (s. III/3.) überprüft. Die Membran wurde in Blockier-Lösung (s. III/3.) 30 min. bei RT inkubiert. Über Nacht wurde die Membran bei 4°C mit dem Primärantikörper (1:1000 Verdünnung) (s. III/10.) in Blockier-Lösung inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3x je 10 min. mit TBS-T-Puffer (s. III/3.) gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (1:5000 Verdünnung; AP- oder HRP-gekoppelt) (s. III/10.) in Blockier-Lösung 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde 3x mit TBS-T-Puffer gewaschen und die Proteinbanden mit dem entsprechenden Substrat detektiert.

Es wurden zwei verschiedene indirekte Immundetektionen mit identischen Membranen durchgeführt. Auf Membran 1 wurde als humaner Primärantikörper die Patientenprobe „Alia“ (s. III/10.) aufgetragen; auf Membran 2 wurde als Primärantikörper ein monoklonaler Maus-Antikörper (s. III/10.) aufgetragen. Zur spezifischen Anfärbung der rekombinanten HEV-ORF2-Proteinbanden wurden die Membrane mit den entsprechenden Sekundärantikörpern versehen und mit 5

ml Detektionsreagenz für 8 min. bei RT inkubiert. Als Detektionsreagenz für den Sekundärantikörper Anti-Human IgG/IgM-Konjugat (HRP) wurde die TMB-Lösung (HRP) aus dem recomLine HEV IgG/IgM-Kit von Mikrogen verwendet. Als Detektionsreagenz für den Sekundärantikörper Anti-Maus (AP) wurde das NBT/BCIP Detektionsreagenz (AP) verwendet. Die Farbreaktion wurde durch Waschen der Membran mit destilliertem Wasser abgestoppt.

16.5. Elektronenmikroskopie

16.5.1. Aufreinigung durch PEG-Fällung

Zur Aufbereitung der vier Proben (HEV-VLP GT1-4) für den Nachweis der HEV-VLPs im Elektronenmikroskop wurde der Zellkulturüberstand der Proteinexpressionskultur (s. III/15.7.) zunächst zentrifugiert. Die in der Suspension enthaltenen Baculoviren werden im ersten Schritt durch die Beschleunigung auf 10.000 x g für 30 min bei 4°C von den HEV-VLPs getrennt und sedimentieren.

Der Überstand, welcher nun überwiegend HEV-VLPs enthielt, wurde abpipettiert und die darin enthaltenen virus like particles mit Polyethylenglykol (PEG) gefällt. PEG ist ein hydrophiles, ungeladenes Polymer, welches in wässriger Lösung mit den Proteinen um das Hydratationswasser konkurriert. Dies führt zu einer schonenden Fällung der Proteine (INGHAM, 1990). Dazu wurden die Proben mit 8% Polyethylenglycol 6.000 und 0,4 M NaCl versehen und über Nacht auf Eis gefällt.

Anschließend wurde die Probe nochmals mit einer Geschwindigkeit von 10.000 x g für 30 min. bei 4°C zentrifugiert, sodass die gefällten HEV-VLPs sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen. Für jeden HEV-Genotyp entstand so ein Pellet mit HEV-VLPs, welches mit je 2,5 ml PBS resuspendiert und im Elektronenmikroskop untersucht wurde. Das restliche Probenmaterial wurde bei -20°C aufbewahrt.

16.5.2. Nachweis im Elektronenmikroskop

Die elektronenmikroskopische Untersuchungen der aufgereinigten und mit PEG gefällten Proben (s. III/16.5.1.) wurden von Frau Dr. Neubauer-Juric und Frau Horvath am LGL-eigenen Gerät übernommen.

IV. ERGEBNISSE

1. Herstellung der Expressionsvektoren pDEST8–ORF2

Mit Hilfe der Gateway-Technologie (s. III/11. u. III/13.1.) wurde die trunkierte ORF2-Sequenz aller vier humanen HEV-Genotypen in den Expressionsvektor pDEST8 einkloniert. Zur Vermehrung und Selektion wurden die LR-Reaktionen in chemisch kompetente *E. coli* Top10 transformiert (s. III/13.2.1.) und kloniert. Die rekombinante Plasmid-DNA wurde anschließend isoliert (s. III/13.3.1.) und zur Kontrolle der Integrität einer Restriktionsanalyse unterzogen (s. III/13.4.1. u. IV/1.1.).

1.1. Restriktionsanalyse der pDEST8–ORF2–Plasmide

Der Restriktionsverdau der pDEST8-ORF2-Plasmide der HEV-Genotypen 1, 2, 3 und 4 wurde mit dem Restriktionsenzym BsrGI durchgeführt (s. III/13.4.1.). Die Integrität der pDEST8-ORF2-Plasmide konnte anschließend für alle vier Genotypen durch Fragmentanalyse im Bioanalyzer (s. III/13.4.3.) bestätigt werden.

Wird der unveränderte pDEST8-Vektor mit dem Enzym BsrGI verdaut, ergeben sich aus den spezifischen Schnittstellen des Vektors vier DNA-Fragmente mit einer Länge von 404 bp, 637 bp, 1424 bp und 4063 bp; dieser diente als Negativkontrolle. Durch Rekombination der HEV-ORF2-Gensequenzen der Genotypen 1, 3 und 4 in den pDEST8-Vektor ändern sich die Schnittstellen; die zu erwartenden Größen der DNA-Fragmente betragen 606 bp, 637 bp, 927 bp und 4257 bp. Der pDEST8-Vektor mit integrierter HEV-ORF2-Gensequenz des Genotyps 2 besitzt eine zusätzliche Schnittstelle; daher besitzen die resultierenden DNA-Fragmente eine Größe von 240 bp, 365 bp, 637 bp, 927 bp und 4257 bp (s. Abb. 17). Die Banden des Genotyps 1 lassen einen unvollständigen Verdau vermuten, da die Bande bei ca. 1500 bp verläuft statt bei 927 bp und 606 bp.

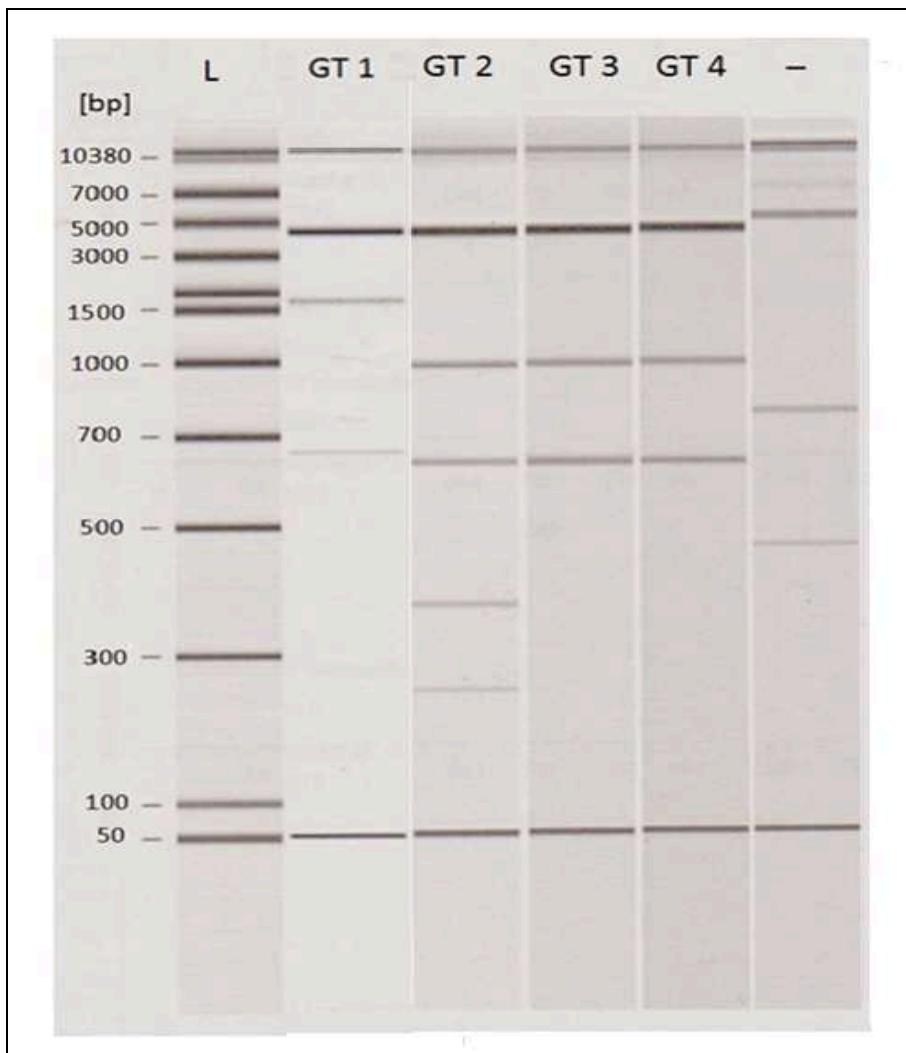


Abbildung 17: BsrGI-Restriktionsverdau der pDEST8-ORF2-Plasmide (GT 1-4). L = DNA-Längenstandard; GT 1/2/3/4 = Fragmente des verdauten pDEST8-ORF2-Plasmid des Genotyps 1/2/3/4; Negativkontrolle (-) = Fragmente des verdauten pDEST8-Leervektors; die Auswertung erfolgte mit dem Bioanalyzer

1.2. Sequenzierung der pDEST8-ORF2-Plasmide

Um die trunkierte ORF2-Gensequenz in den pDEST8-ORF2-Vektoren auf ihre Richtigkeit zu überprüfen wurden die Konstrukte zur Firma *GATC Biotech* gesandt (s. III/13.5.) und mit den Standardprimern pBakPAC-FP und EBV-RP (s. III/9.) mit der Sanger-Methode sequenziert. Die Integrität der generierten pDEST8-ORF2-Plasmide konnte bestätigt werden.

2. Herstellung der rekombinanten Bacmid-DNA

2.1. Transformation der Expressionsvektoren in *E. coli* DH10Bac

Die sequenzierten Expressionsvektoren pDEST8-ORF2 (GT 1-4) wurden in *E. coli* DH10Bac transformiert und auf entsprechenden Agar-Platten (s. III/3.) ausplattiert. Mittels Blau-Weiß-Selektion konnten erfolgreich transponierte, weiße Kolonien sofort von unveränderten, blauen Kolonien unterschieden werden. Ist die Transformation und Rekombination der DH10Bac Zellen erfolgreich, erfolgt der Einbau der rekombinanten DNA in das LacZ α -Gen auf dem Bacmid bMON14272, wodurch die Expression des LacZ α -Peptids verhindert wird und damit folglich die enzymatische Reaktion von X-Gal zu einem blauen Farbstoff. Die blauen Kolonien enthalten somit unveränderte Bacmid-DNA bMON14272 mit funktionsfähigem LacZ α -Gen. Die weißen Kolonien enthalten die rekombinante Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4). Letztere wurden in weitergehenden Schritten näher untersucht.

2.2. Qualitätskontrolle der rekombinanten Bacmid-DNA

Die isolierte rekombinante Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4) aus den weißen Kolonien wurde mit der pUC/M13-PCR (s. III/13.4.2.) analysiert. Als Primer dienten pUC/M13-Forward und pUC/M13-Reverse (s. III/9.). Die Bindungsstellen der pUC/M13-Primer flankieren die mini-attTn7-Region im Bacmid (s. Abb. 14). Die zu erwartende Größe der DNA-Fragmente ORF2-positiver Klone beträgt ca. 4,2 kb. Die PCR-Analyse ergab, dass die Herstellung rekombinanter Bacmid-DNA für alle vier Genotypen erfolgreich war (s. Abb. 18).

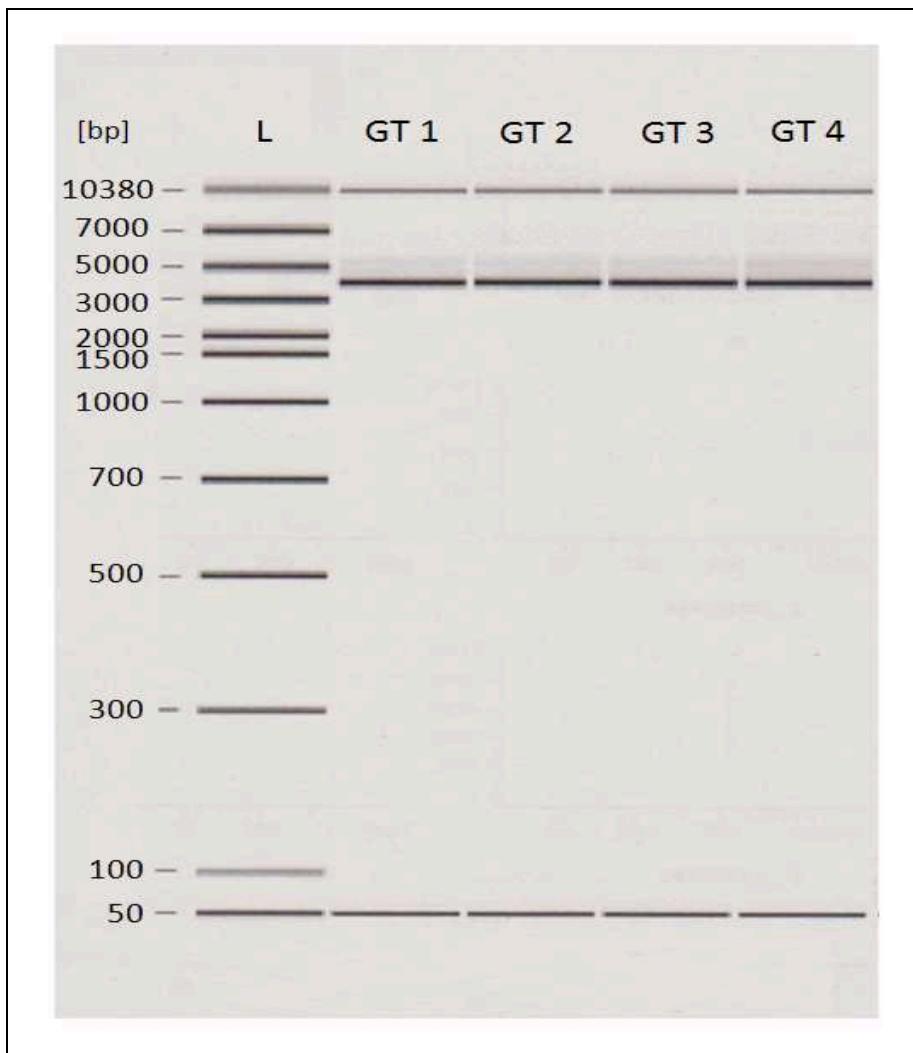


Abbildung 18: pUC/M13-PCR-Fragmente der rekombinanten Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4). L = DNA-Längenstandard; GT 1/2/3/4 = Amplifikat der rekombinanten Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 des Genotyps 1/2/3/4. Als PCR-Primer dienten pUC/M13-Forward und pUC/M13-Reverse. die Auswertung erfolgte mit dem Bioanalyzer

2.3. Sequenzierung der ORF2-Inserts

Die in der pUC/M13-PCR (s. IV/2.2.) amplifizierten DNA-Fragmente wurden zur Sequenzierung zur Firma *GATC Biotech* gesandt (s. III/13.5.). Die Integrität der generierten Bacmide konnte bestätigt werden.

2.4. Amplifikation der rekombinanten Bacmid-DNA (Maxipräp)

Um ausreichende Bacmid-Mengen zur Transfektion von Insektenzellen herzustellen, wurde jeweils eine 500 ml-Übernachtkultur der *E. coli* mit den rekombinanten Bacmiden bMON14272-ORF2 (GT1-4) und bMON14272 angesetzt, um diese mittels Maxipräparation (s. III/13.3.2.) zu isolieren. Die nicht-transponierte Bacmid-DNA dient in späteren Arbeitsschritten als Negativkontrolle. Dazu wurde ein Kit (s. III/5.) verwendet, das für die Isolierung

von Bacmiden optimiert wurde. Die Konzentration der isolierten DNA wurde anschließend im NanoDrop (s. III/13.3.4.) photometrisch bestimmt (s. Tab. 9).

Maxipräparation	Konzentration der Plasmid-DNA in ng/µl
bMON14272-ORF2-GT1	436,2
bMON14272-ORF2-GT2	324,7
bMON14272-ORF2-GT3	248,0
bMON14272-ORF2-GT4	493,0
bMON14272 (Negativkontrolle)	552,8

Tabelle 9: Konzentration der rekombinanten Bacmid-DNA in ng/µl (GT 1-4) nach Maxipräparation. Die DNA wurde mit dem NucleoBond Xtra BAC Plasmid Maxiprep Kit isoliert und im NanoDrop ausgewertet.

3. Herstellung der rekombinanten Baculoviren

3.1. Transfektion der Sf9-Insektenzellen mit rekombinanter Bacmid-DNA

Zur Transfektion der Sf9-Insektenzellen mit den rekombinanten Bacmiden bMON14272-ORF2 der vier HEV-Genotypen wurde das Transfektionsreagenz FectoFly und 9 µg Bacmid-DNA verwendet (s. III/15.1.). Nach erfolgreicher Transfektion ist die rekombinante Baculovirus-DNA, welche die HEV-ORF2-Gensequenz trägt, in die Sf9-Insektenzellen transferiert worden. Die transfizierten Sf9-Insektenzellen produzierten nun die rekombinanten Baculoviren AcMNPV-ORF2 (GT 1-4), welche auch in den Zellkulturüberstand freigesetzt wurden. Dieser Zellkulturüberstand wurde als Virusstock P0 (Passage P0) bezeichnet und zur Amplifikation der rekombinanten Baculoviren (Passage P1) verwendet (s. III/15.4.). Als Negativkontrolle für spätere Arbeitsschritte wurde außerdem die unveränderte Bacmid-DNA bMON14272 in Sf9-Insektenzellen transfiziert, um „unverändertes“ AcMNPV zu rekonstituieren.

3.2. Titration der P0- und P1-Virusstocks

Um den TCID₅₀/ml-Wert der P0- und P1-Virusstocks bestimmen zu können, wurde mit den Sf9ET (Easy Titer)-Insektenzellen eine Verdünnungstitration zum Endpunkt durchgeführt (s. III/15.3.). Die DNA dieser Insektenzellen enthält das eGFP-Gen (enhanced green fluorescent protein) unter der Kontrolle des baculoviralen Polyhedrin-Promotors. Werden die Zellen mit Baculoviren infiziert, verursachen baculovirale Transkriptionsfaktoren die Transkription des eGFP und

somit eine grüne Fluoreszenz bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht (s. Abb. 19).

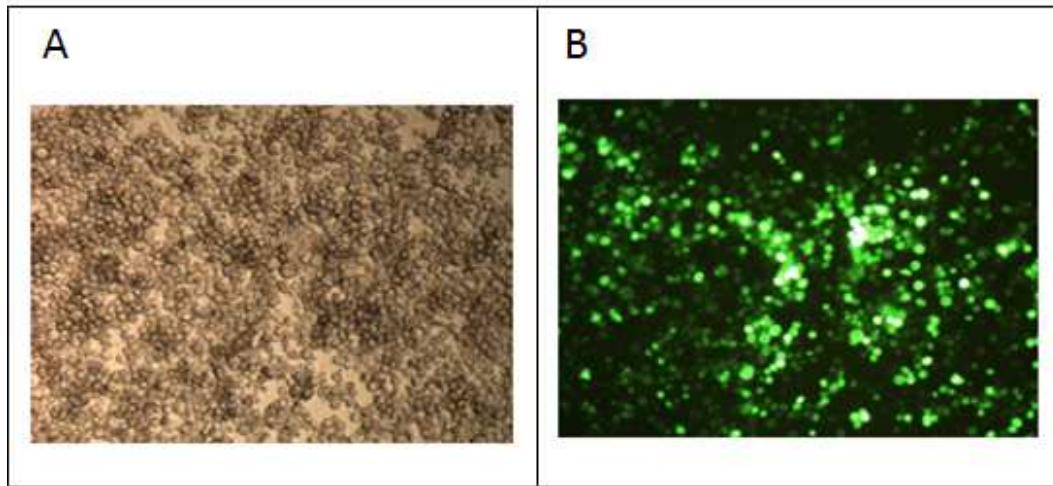


Abbildung 19: Transfizierte Sf9ET-Insektenzellen im Lichtmikroskop (A) und im Fluoreszenzmikroskop nach Anregung mit blauem Licht (B) 72 h nach Inkubation.

Neben den Virusstocks P0 und P1, welche die rekombinanten Baculoviren (AcMNPV-ORF2 (GT1-4)) enthalten, wurden auch die Virusstocks P0 und P1, welche die unveränderten Baculoviren (AcMNPV) enthalten, zum Endpunkt titriert. Die Virusstocks mit den unveränderten Baculoviren dienten in späteren Arbeitsschritten der Negativkontrolle. Für diese Negativkontrolle wurde ein Ansatz auf niedrigster Verdünnungsstufe (10^{-3}) hergestellt, bei welchem anstelle eines Virusstocks ein entsprechendes Volumen an Sf9ET-Nährmedium zugegeben wurde. Wie zu erwarten waren alle Wells dieses Kontrollansatzes negativ.

Die Virustiter (TCID₅₀/ml) wurden nach Reed & Muench berechnet (LINDENBACH, 2004). Die Titrationsergebnisse sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

TCID ₅₀ /ml	P0-Virusstock	P1-Virusstock
AcMNPV-ORF2-GT1	$3,89 \times 10^6$	$3,94 \times 10^7$
AcMNPV-ORF2-GT2	$3,34 \times 10^8$	$5,18 \times 10^7$
AcMNPV-ORF2-GT3	$1,78 \times 10^8$	$6,31 \times 10^9$
AcMNPV-ORF2-GT4	$2,11 \times 10^7$	$2,37 \times 10^{10}$
AcMNPV (unverändert)	$1,00 \times 10^7$	$1,58 \times 10^9$

Tabelle 10: Titrationsergebnisse, angegeben in TCID₅₀/ml, der P0- und P1-Virusstocks. TCID₅₀/ml = Verdünnungsstufe des Virusstocks, welche 50% der damit inkulierten Zellkulturen infiziert; AcMNPV-ORF2 = ORF2-rekombinante Baculoviren; GT 1-4 = Genotyp 1-4; AcMNPV = original Baculovirus; P0 = Passage 0; P1 = Passage 1

4. Baculovirale Proteinexpression und Proteinnachweis

4.1. Infektion der Sf9-Insektenzellen mit den rekombinanten

Baculoviren zur Proteinexpression

Zur Herstellung rekombinanter HEV-ORF2-Proteine (GT 1-4) wurden Sf9-Insektenzellen mit den rekombinanten Baculoviren (AcMNPV-ORF2-GT1-4) infiziert (s. III/13.6.). Die Proteinexpression erfolgte gemäß der Herstellerangabe mit einer MOI von 10 (INVITROGEN, 2013a). Die Berechnung (Formel s. III/15.4.) des benötigten Virusstock-Volumens erfolgte anhand der ermittelten Virustiter (s. IV/3.2.).

4.2. Coomassie-Färbung

Die mittels SDS-PAGE (s. III/16.2) elektrophoretisch aufgetrennten Proteine der Zellkulturüberstände und Zellpellets aus der Proteinexpression (s. III/15.7.) wurden mit Coomassie-Brillant-Blau unspezifisch im Gel angefärbt (s. III/16.3.).

Mit der Coomassie-Färbung konnte keine Bande bei ca. 53 kDa nachgewiesen werden, welche sich vom Kontrollansatz unterscheidet (s. Abb. 20). Grund dafür ist das Vorhandensein vieler Serumproteine, welche dem Insektenzellmedium zugegeben werden.

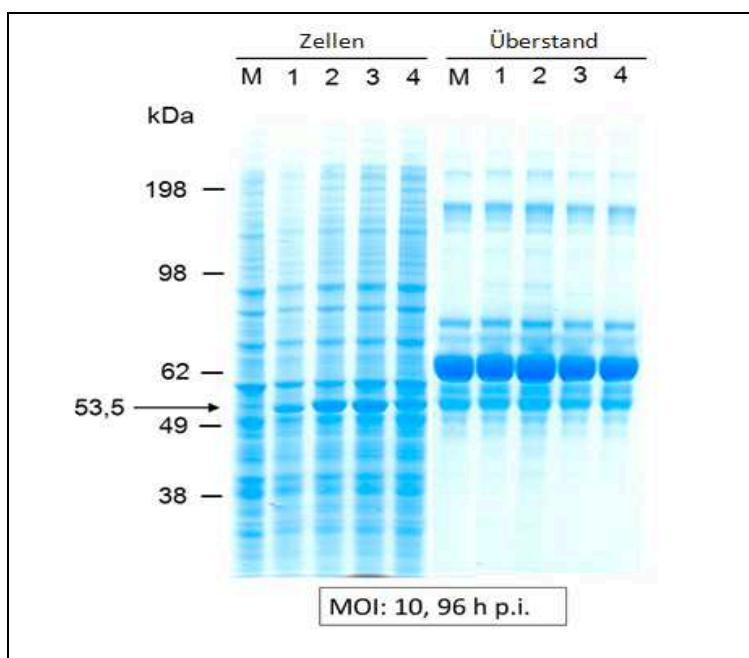


Abbildung 20: Coomassie-Färbung. Proteinmarker = SeeBlue Plus2; Zellen = resuspendierte Pellets aus Proteinexpression; Überstand = Zellkulturüberstand aus Proteinexpression; M = Mock-Kontrolle, d. h. unverändertes Baculovirus (AcMNPV); 1 - 4 = rekombinante Baculoviren mit integrierter HEV-ORF2-Sequenz der Genotypen 1, 2, 3 und 4 (AcMNPV-ORF2-GT1-4)

4.3. Nachweis der ORF2-Proteine im Western Blot

4.3.1. Immundetektion mit Humanserum

Zum spezifischen Nachweis der rekombinanten ORF2-Proteine wurden Zellkulturüberstände und resuspendierte Zellpellets aus der Proteinexpression (s. III/15.7.) via Western Blot (s. III/16.4) analysiert. Als Primärantikörper diente das Humanserum „Alia“ (IgM+/IgG+), das von einer Frau mit Reiseanamnese (Pakistan) stammt. Als Sekundärantikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter Anti-IgG/IgM-Antikörper der Firma Mikrogen (s. III/10.).

Mittels Westernblot konnten die rekombinanten ORF2-Proteine erfolgreich nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht der trunkierten ORF2-Kapsid-Proteine liegt bei ca. 53,5 kDa. In Abbildung 21 ist zu erkennen, dass im resuspendierten Zellpellet aller 4 Genotypen eine Bande im Bereich von ca. 53,5 kDa sichtbar ist. Im Zellkulturüberstand ließ sich die spezifische Bande für die Genotypen 2, 3 und 4 nachweisen. Für Genotyp 1 konnte kein ORF2-Protein im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle diente das resuspendierte Zellpellet und der Zellkulturüberstand unveränderter Baculoviren (AcMNPV). Diese sind mit M (Mock-Kontrolle) gekennzeichnet und belegt die Spezifität der angefärbten Proteinbande. Banden, welche sowohl in der Mock-Kontrolle als auch in den Proben mit rekombinantem ORF2-Protein erscheinen, gehen auf unspezifische Reaktionen der eingesetzten Antikörper zurück.

Um zu testen, ob die humanen HEV-Antikörper spezifisch an die rekombinanten ORF2-Proteine der HEV-Genotypen 1, 2, 3 und 4 binden, wurde der Versuch parallel mit einem Humanserum inkubiert, welches keine HEV-Antikörper enthält. Es traten keine spezifischen Banden auf (s. Abb. 22).

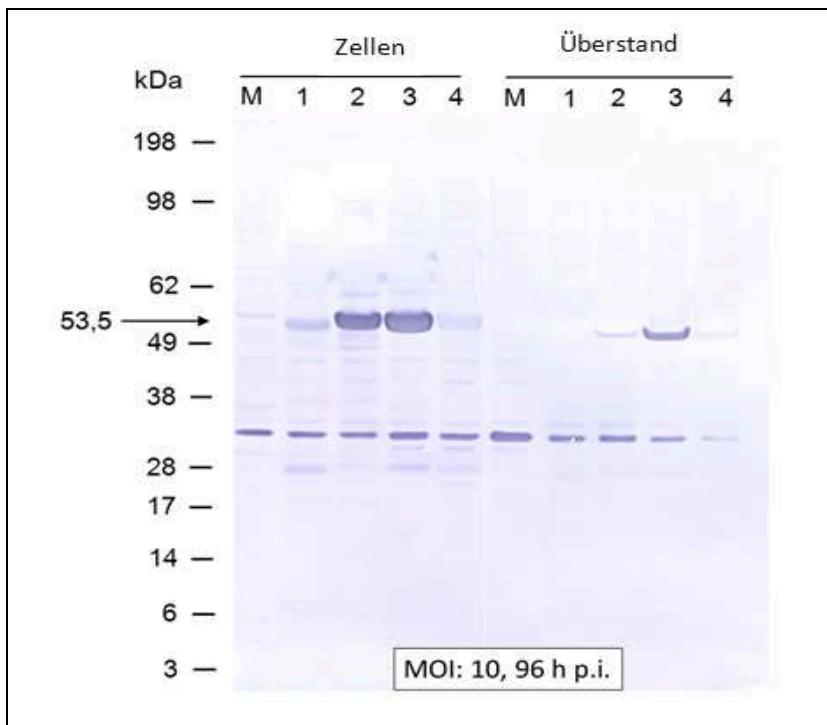


Abbildung 21: Immundetektion der rekombinanten ORF2-Proteine mit IgG enthaltendem Humanserum. Proteinmarker = SeeBlue Plus2; Zellen = Zellpellets aus Proteinexpression; Überstand = Zellkulturüberstand aus Proteinexpression; M = Mock-Kontrolle, d. h. Ausgangs-Baculovirus (AcMNPV); 1 - 4 = rekombinante Baculoviren mit integrierter HEV-ORF2-Sequenz der Genotypen 1, 2, 3 und 4 (AcMNPV-ORF2-GT1-4)

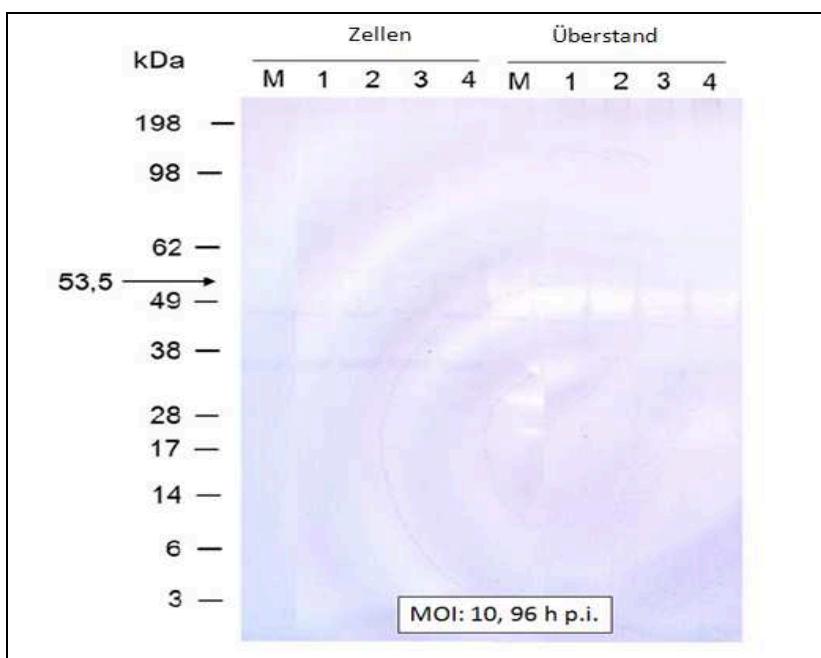


Abbildung 22: Immundetektion der rekombinanten ORF2-Proteine mit Humanserum ohne HEV-Antikörper als Negativkontrolle. Weder die Proben der Zellpellets noch die der Zellkulturüberstände weisen eine spezifische Bande bei ca. 53,5 kDa auf. Proteinmarker = SeeBlue Plus2; Zellen = Zellpellets aus Proteinexpression; Überstand = Zellkulturüberstand aus Proteinexpression; M = Mock-Kontrolle, d. h. original Baculovirus (AcMNPV); 1 - 4 = rekombinante Baculoviren mit integrierter HEV-ORF2-Sequenz der Genotypen 1, 2, 3 und 4 (AcMNPV-ORF2-GT1-4)

4.3.2. Immundetektion mit monoklonalem Maus-Antikörper

Da von dem humanen HEV-positiven Serum („Alia“) nur sehr wenig Material vorhanden war, sollte versucht werden, in weitergehenden Experimenten einen geeigneten monoklonalen Maus-Antikörper zu finden, durch den sich die HEV-ORF2 Proteine nachweisen lassen. Eine Recherche der Literatur wies den verwendeten monoklonalen Maus-Antikörper (s. III/10.) mit der Spezifität Anti-HEV-ORF2 der Firma Enogene als möglichen Kandidaten aus. Dieser Antikörper wurde bestellt und als Primärantikörper eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente ein AP-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper der Firma Invitrogen (s. III/10.).

Die rekombinanten HEV-ORF2-Proteine konnten im Zellpellet der Genotypen 1, 2 und 3 durch spezifische Banden im Bereich von ca. 53,5 kDa nachgewiesen werden. Im Zellkulturüberstand des Genotyps 3 konnte ebenfalls eine entsprechende Bande bei ca. 53,5 kDa nachgewiesen werden. Das entspricht dem Molekulargewicht der trunkierten ORF2-Kapsid-Proteine (s. Abb. 23). Im Zellpellet der ORF2-Proteinexpression des Genotyps 4 und in den Zellkulturüberständen der Genotypen 1, 2 und 4 konnten keine ORF2-spezifischen Banden nachgewiesen werden.

Als Negativkontrolle dienten das Zellpellet und der Zellkulturüberstand unveränderter Baculoviren (AcMNPV). Diese sind in Abbildung 23 mit „M“ (Mock-Kontrolle) gekennzeichnet und belegen die Spezifität des Nachweisverfahrens. Banden, welche sowohl in der Mock-Kontrolle als auch in den Proben mit rekombinantem ORF2-Protein erscheinen, sind als unspezifisch zu bewerten.

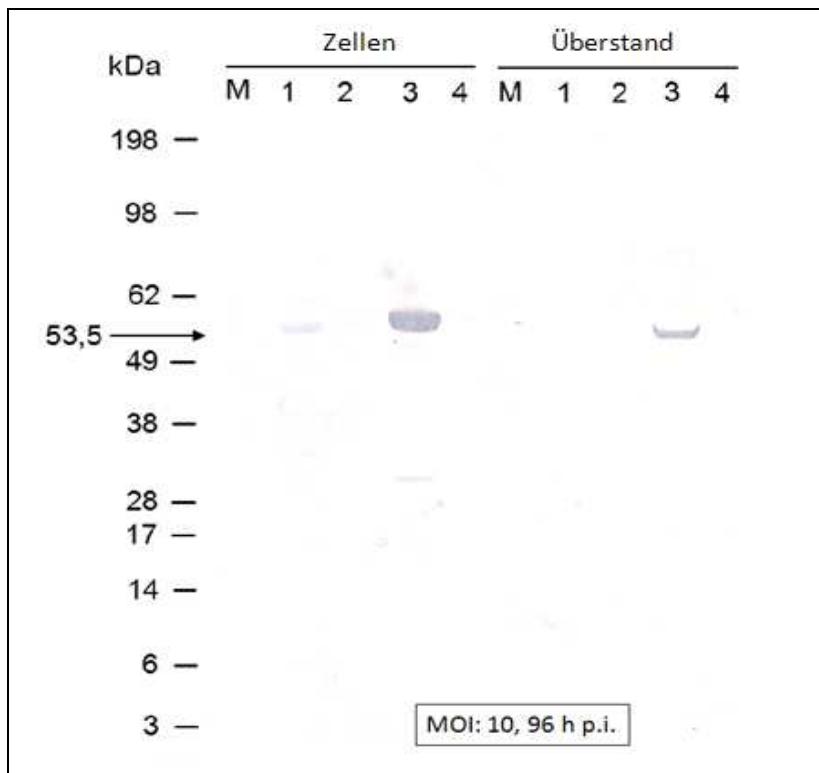


Abbildung 23: Immunodetektion der rekombinanten ORF2-Proteine mit monoklonalem Maus-Antikörper. Auf der Membran sind Proteinbanden bei ca. 53,5 kDa bei den Zellpellets der Genotypen 1, 2 und 3 und beim Zellkulturüberstand des Genotyps 3 zu sehen. Proteinmarker = SeeBlue Plus2; Zellen = Zellpellets aus Proteinexpression; Überstand = Zellkulturüberstand aus Proteinexpression; M = Mock-Kontrolle, d. h. original Baculovirus (AcMNPV); 1 - 4 = rekombinante Baculoviren mit HEV-ORF2 der Genotypen 1, 2, 3 und 4 (AcMNPV-ORF2-GT1-4); Durch das Einscannen hat sich die Qualität der Membran leider verschlechtert, sodass die Bande des Zellpellet von Genotyp 2 nicht mehr zu erkennen ist.

4.4. Nachweis der HEV-VLPs im Elektronenmikroskop

Für den elektronenmikroskopischen Nachweis der HEV-VLPs wurden Zellkulturüberstände aus der Proteinexpression (s. III/15.7.) mittels PEG-Fällung aufgereinigt (s. III/16.5.1.). In den aufgereinigten Proben konnten im Elektronenmikroskop Partikel mit einem Durchmesser von 27 nm nachgewiesen werden. Dies entspricht exakt der Größe, welche für den Durchmesser der HEV-VLPs zu erwarten ist (LI et al., 2005b). Der elektronenmikroskopische Nachweis (s. Abb. 24) wurde für die HEV-VLPs der Genotypen 2, 3 und 4 erbracht. Genotyp 1 VLPs konnten nicht nachgewiesen werden.

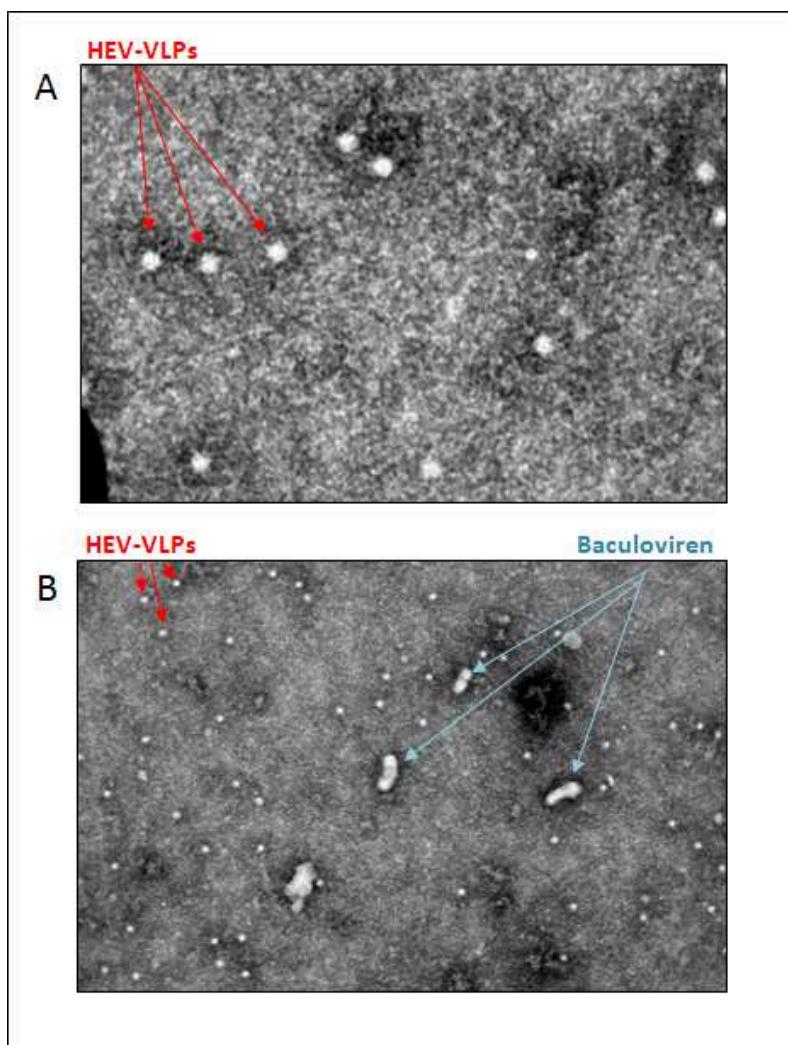


Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der HEV-VLPs (GT 3). HEV-VLPs des Genotyps 3 mit einem Durchmesser von ca. 27 nm (A). HEV-VLPs des Genotyps 3 und rekombinante Baculoviren mit einer Länge von ca. 260 nm (B). Aufnahmen angefertigt von Frau Dr. Neubauer-Juric und Frau Horvath, LGL Oberschleißheim.

V. DISKUSSION

Die Bestimmung des für eine Hepatitis-E-Infektion verantwortlichen HEV-Genotyps ist bislang nur im frühen Infektionsstadium möglich. Dazu wird HEV-RNA aus Serum oder Stuhl isoliert, mittels RT-PCR vervielfältigt und anschließend der Genotyp durch Sequenzierung bestimmt. Im späteren Infektionsstadium ist der Nachweis von HEV-RNA (und somit eine Genotypisierung) nicht mehr möglich.

Derzeit gibt es keine serologischen Tests, die zwischen den Genotypen differenzieren können. Gängige serologische Tests wie z.B. "HEV IgG ELISA" von Axiom Diagnostic, "recomLine HEV IgG/IgM" Immunoblot von Mikrogen und "HEV ELISA" von MP Diagnostics ermöglichen derzeit nur den pauschalen Nachweis von anti-HEV Antikörpern. Es ist anzumerken, dass die in der Standarddiagnostik eingesetzten Testkits auf bakteriell exprimierten Antigenen beruhen.

In einer Vergleichsstudie mit 200 gesunden, im Gesundheitswesen beschäftigten Personen wurde bestätigt, dass diese drei Testsysteme große Differenzen bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität aufweisen. So variieren die Ergebnisse bezüglich der Seroprävalenz der anti-HEV-IgG-Antikörper von 29,5% (Axiom Diagnostics) über 18% (Mikrogen) bis hin zu 4,5% (MP Diagnostics) (WENZEL et al., 2013).

Ein Ansatz zur Verbesserung der Sensitivität und Spezifität serologischer Tests zur HEV-Genotypisierung könnte die Expression der Antigene in einem eukaryotischen System sein. Da das ORF2-Protein natürlicherweise glykosyliert vorliegt (ZAFRULLAH et al., 1999) besteht darin möglicherweise der große Vorteil der baculoviralen Expression. Diese posttranskriptionale Modifikation könnte die Affinität der Antikörper zu den Antigenen und somit die Sensitivität und Spezifität entscheidend verbessern, da im bakteriellen Expressionssystem keine Glykosylierung möglich ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Antigene aller vier humanpathogenen Genotypen des Hepatitis-E-Virus in Form von HEV-VLPs herzustellen. Als Grundlage dienten dabei die Arbeiten von Li et al (LI et al., 2005a), in denen nachgewiesen

wurde, dass sich baculoviral exprimierte HEV-ORF2-Proteine (Genotyp 1) zu virus like particles assemblieren.

Die Herstellung der rekombinanten Bacmide bMON14272-ORF2 war für repräsentative Stämme aller vier humanpathogenen Genotypen erfolgreich. Der Nachweis, dass die trunkierte ORF2-Gensequenz erfolgreich in das Bacmid integriert wurde, erfolgte mittels analytischer PCR und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte.

Ebenso war die Herstellung der rekombinanten Baculoviren AcMNPV-ORF2 für alle vier Genotypen erfolgreich. Um die rekombinanten ORF2-Proteine nachzuweisen, wurden Zelllysate und Zellkulturüberstände von Sf9-Zellen, welche mit den vier rekombinanten HEV-ORF2 Baculoviren infiziert wurden, mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Färbung der Proteine mit Coomassie zeigte keine ORF2-spezifischen Banden, da die Proteine des Insektenzellmediums diese überlagerten. Daraufhin wurden die aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Membran transferiert und eine Immunfärbung durchgeführt. Als Primärantikörper wurde humanes Patientenserum verwendet. Dieses Serum wurde in einer frühen Phase einer HEV-Infektion entnommen und war daher anti HEV-ORF2-IgM positiv und HEV-RNA positiv. Damit konnten in den aus der Proteinexpression stammenden Zellpellets die rekombinanten ORF2-Proteine aller vier Genotypen detektiert werden, wobei die Genotypen zwei und drei stärkere Banden ausbildeten als die Genotypen eins und vier. In den Zellkulturüberständen aus der Proteinexpression konnte der Nachweis für das Vorhandensein der ORF2-Proteine lediglich für die Genotypen 2, 3 und 4 erbracht werden, wobei die Bande des Genotyps 3 deutlich stärker ist als die Banden der Genotypen 2 und 4. Womöglich sind die ORF2-Proteine des Genotyps 1 nicht bzw. in zu geringer Konzentration in den Zellkulturüberstand freigesetzt worden, sodass in diesem Fall keine Bande nachzuweisen war.

Die unterschiedliche Bandenstärke könnte dadurch bedingt sein, dass durch die Proteinexpression für jeden Genotyp eine individuelle Menge an HEV-ORF2-Proteinen hergestellt wurde. Das würde bedeuten, dass die Genotypen 2 und 3 in größerer Menge exprimiert wurden als die Genotypen 1 und 4.

Die schwache Bande des Genotyps 1 ist möglicherweise auch dadurch zu erklären, dass die codonoptimierten Gensequenzen der Genotypen 2, 3 und 4 im

baculoviralen System in wesentlich höherer Konzentration exprimiert wurden als die Wildtypsequenz des Genotyps 1. Allerdings stammt das verwendete humane Patientenserum von einer Patientin mit Reiseanamnese (Pakistan). Das würde eine Infektion mit Genotyp 1 nahelegen. Es stellt sich die Frage, wie sehr sich die Epitope der vier Genotypen ähneln. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass mindestens ein genotypunspezifisches Epitop auf dem ORF2-Protein des Genotyps 4 existiert, an das die HEV-Antikörper aller vier Genotypen binden (ZHANG et al., 2009). Eventuell besitzen die Antikörper aus dem Patientenserum für die Antigene HEV-ORF2 der Genotypen 2 und 3 zwar eine niedrigere Affinität als für das Antigen HEV-ORF2 des Genotyps 1; es ist jedoch denkbar, dass aus der Gesamtsumme der niedrig affinen Einzelbindungen an die größere Menge des exprimierten HEV-ORF2 Antigen des Genotyps 2 und 3 eine hohe Avidität resultiert, welche sich in den starken Banden wiederspiegeln.

Somit konnte die erfolgreiche Expression der rekombinanten HEV-ORF2-Proteine aller vier Genotypen nachgewiesen werden. Zudem wurde dadurch gezeigt, dass die rekombinanten HEV-ORF2-Antigene aller vier Genotypen mit genotypunspezifischen Epitopen serologisch reaktiv sind.

In einem zweiten Nachweisverfahren kam als Primärantikörper ein monoklonaler Maus-Antikörper zum Einsatz. Mit diesem ließen sich spezifische ORF2-Protein-Banden der Genotypen 1, 2 und 3 nachweisen, nicht jedoch des Genotyps 4. Abbildung 27 zeigt die Aminosäuresequenzen der trunkierten HEV-ORF2-Proteine. Diese besitzen zwei mögliche Epitope, an die der monoklonale Antikörper spezifisch für Genotyp 1, 2 und 3 binden könnte. Dabei wurde bezüglich der Epitoplänge von sechs aufeinanderfolgende Aminosäuren ausgegangen (GRESSNER & ARNDT, 2007) (s. Abb. 25).

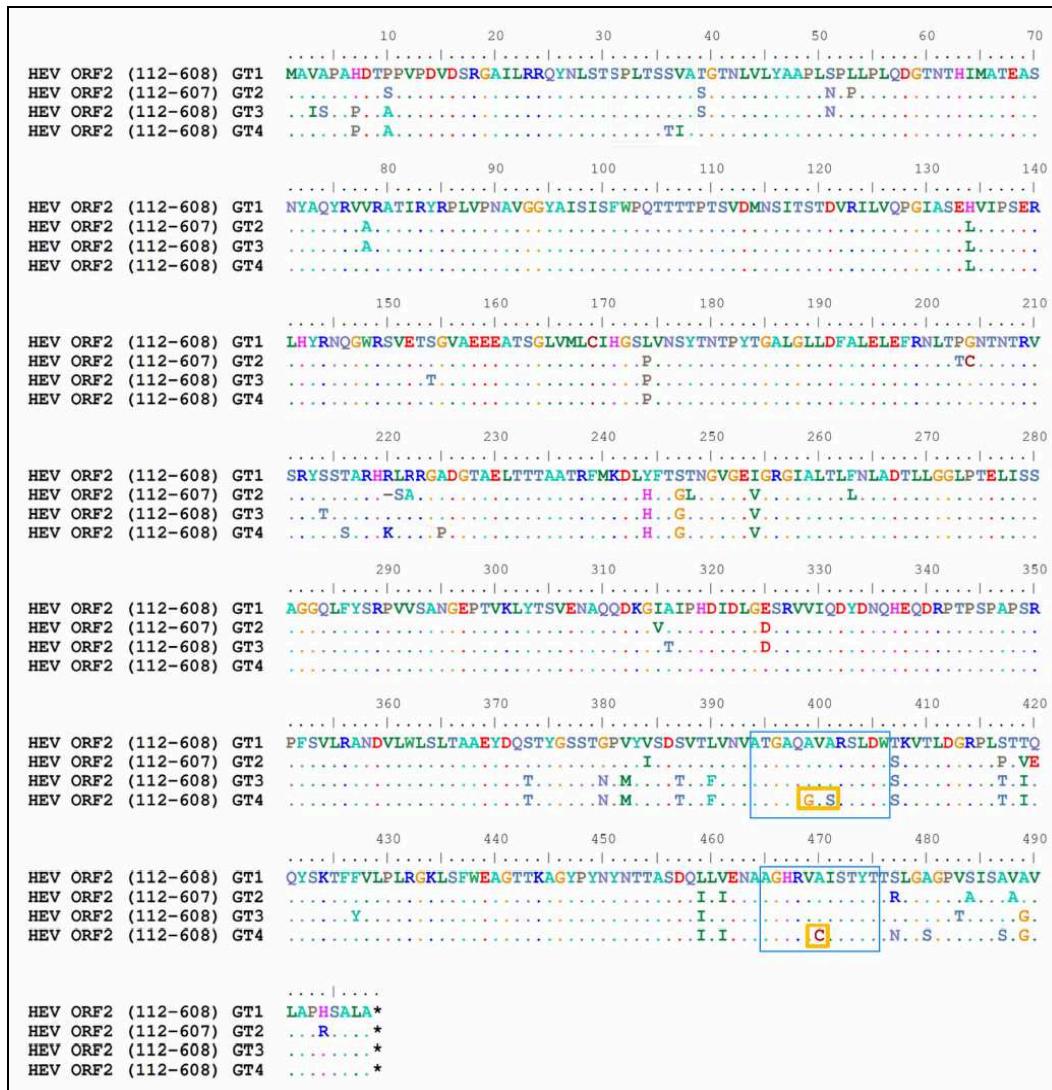


Abbildung 25: Sequenzalignment der HEV-ORF2-Proteine (Genotyp 1-4) auf Aminosäureebene mit den zwei möglichen Epitopen, an die eine spezifische Bindung des monoklonalen Antikörpers an ORF2 von Genotyp 1, 2 und 3 möglich wäre. Blau umrahmt: für Genotyp 4 spezifische Epitope; Gelb umrahmt: Abweichende Aminosäure in der Sequenz des Genotyps 4 im Vergleich zu der Sequenz der Genotypen 1, 2 und 3.

Ferner konnte in elektronenmikroskopischen Aufnahmen für Genotyp 2, 3 und 4 gezeigt werden, dass die rekombinanten HEV-ORF2-Proteine zu HEV-VLPs assemblieren. Für Genotyp 1 konnte der Nachweis im Elektronenmikroskop nicht erbracht werden. Sehr wahrscheinlich waren VLPs von Genotyp 1 in der für das Elektronenmikroskop aufgereinigten Probe in zu geringer Konzentration vorhanden.

Um die Konzentration der HEV-VLPs in den Proben zu erhöhen, könnte die Aufreinigung der Proteinexpression mit einer Cäsium-Chlorid-Fällung erfolgen (LI et al., 2005b). Der Vorteil besteht darin, dass das Ausgangsmaterial lysierte Gesamtzellen sind, in welchen eine höhere ORF2-Proteinkonzentration zu

erwarten ist. Im Zellpellet von Genotyp 1 konnte via Westernblot eine entsprechende Proteinbande nachgewiesen werden. Diese HEV-VLPs, welche sich nach der Proteinexpression noch in den Sf9-Insektenzellen befinden, werden durch die Lyse der Insektenzellen mittels eines Einfrier-Auftau-Vorgangs freigesetzt.

Zur Entwicklung von sensitiveren und spezifischeren Tests zum anti-HEV-Nachweis sowie zur Entwicklung von Tests, welche die Serotypisierung der vier humanpathogenen Genotypen ermöglichen, müssten die baculoviral exprimierten HEV-ORF2-Proteine im weiteren Vorgehen hochsauber aufgereinigt und anschließend quantifiziert werden. Die Aufreinigung könnte durch Dichtegradientenzentrifugation oder durch säulenchromatographische Verfahren erfolgen. Anschließend müssten die aufgereinigten HEV-ORF2-Proteine exakt quantifiziert werden, beispielsweise mit dem Bradford-Test. Hierfür wird der Farbstoff Coomassie-Brillantblau-G-250 genutzt. Dieser bildet in saurer Lösung mit den Proteinen Komplexe, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm (ungebundener Farbstoff) zu 595 nm (komplexierter Farbstoff) verschiebt. Durch photometrische Messung ist es möglich, auf die Proteinkonzentration der Probe zu schließen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit könnten mit dem Dot-Blot-Verfahren äquimolare Proteinproben auf Membrane transferiert und mit aufgereinigtem HEV-Patientenserum beprobt werden. Dadurch könnte die serologische Reaktivität der HEV-ORF2-Proteine der vier humanpathogenen Genotypen verglichen werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Doktorarbeit war es, virus-like particles des Hepatitis E Virus, so genannte HEV-VLPs, aller vier humanrelevanten Genotypen herzustellen. Besonderes Augenmerk lag auf den zoonotisch übertragbaren Genotypen 3 und 4.

Die Gateway Technologie der Firma *Invitrogen* wurde verwendet, um von jedem Genotyp einen Expressionsvektor zu erzeugen, welcher die trunkierte ORF2-Gensequenz enthält. Dafür wurde die Gensequenz in den Zielvektor pDEST8 kloniert.

Zur Herstellung rekombinanter Viruskapsidproteine wurde das Bac-to-Bac Baculovirus Expressions System der Firma *Invitrogen* verwendet. Das rekombinante Plasmid, der sog. Expressionsvektor, wurde in *E. coli* DH10Bac transformiert. Ist die Transposition in das enthaltene AcMNPV-Bacmid erfolgreich, wird die Expression des LacZ α -Peptids verhindert. Dadurch konnten Kolonien mit rekombinantem Bacmid durch Blau-Weiß-Selektion isoliert werden. Das Vorhandensein des Inserts wurde durch PCR und anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt. Die Herstellung rekombinanter Baculoviren erfolgte durch Transfektion der rekombinanten AcMNPV-Bacmide in Sf9-Insektenzellen. Die daraus resultierenden Viren wurden unter Verwendung von Sf9ET-Insektenzellen zum Endpunkt titriert, um den TCID₅₀/ml-Wert bestimmen zu können. Aus ihm errechnet sich das benötigte Volumen für die weitere Amplifikation des Virusstocks. Der amplifizierte Virusstock wurde geerntet und nochmals zum Endpunkt titriert. Mit diesem hochtitrigen P1-Virusstock wurden Sf9-Insektenzellen mit einem MOI von 10 infiziert, um große Mengen rekombinanter ORF2-Proteine herzustellen.

Zum Proteinnachweis diente die indirekte Immundetektion. Hierzu wurden humanes Patientenserum und ein monoklonaler Maus-Antikörper verglichen. Mit dem humanen Patientenserum (polyklonale Antikörper) konnten alle vier Genotypen detektiert werden. Der monoklonale ORF2 Antikörper aus Maus-Hybridomazellen detektierte hingegen nur die Genotypen 1, 2, und 3; nicht jedoch Genotyp 4. Das deutet auf die Existenz genotypspezifischer Antikörper hin.

Für den elektronenmikroskopischen Nachweis von HEV-VLPs wurden die Zellkulturüberstände der Proteinexpressionen mit einer Polyethylenglykol-Fällung

aufgereinigt. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der assemblierten HEV-VLPs gelangen für die HEV Genotypen 2, 3 und 4.

VII. SUMMARY

The objective of this thesis is to develop virus-like particles of the hepatitis E virus, so-called HEV-VLPs, from all four human-pathogenic genotypes. Particular attention has been paid to the zoonotic HEV genotypes 3 and 4.

The Gateway Technology from *Invitrogen* was used to create an expression clone for each genotype, which contains the truncated gene sequence ORF2. Therefore the gene sequence was cloned into the destination vector pDEST8.

The Bac-to-Bac Baculovirus Expression System from *Invitrogen* was used for synthesising recombinant virus capsid proteins. The recombinant plasmid, the so-called expression clone, was transformed into *E. coli* DH10Bac. A successful transposition in the containing AcMNPV-bacmid inhibits the expression of the LacZ α peptide. As a result colonies including the recombinant bacmid could be isolated by blue/white selection. The insert sequences were verified by sequencing. To produce recombinant baculoviruses, the recombinant AcMNPV-bacmids were transfected in Sf9 insect cells. The end-point dilution assay was used to determine baculovirus titers and TCID₅₀/ml. Therefore we used the Sf9 Easy Titer cell line. From these results we calculate the required volume for virus stock amplification. These amplified stocks were harvested and titrated again by EPDA. Sf9 insect cells were infected with this high-titer P1 baculovirus stock using an MOI of 10 to produce large quantities of recombinant ORF2 proteins.

Indirect immunodetection was used for protein verification. For this purpose human patient serum was compared with mouse monoclonal antibody. The human patient serum (polyclonal antibodies) was able to detect all four genotypes. The monoclonal antibody from mouse hybridoma cells could detect only genotypes 1, 2 and 3; but not genotype 4. This discovery suggests the existence of genotype specific antibodies.

To show self-assembling of HEV ORF2 proteins to VLPs by electron microscopy, the proteins in the supernatant of protein expression were purified by polyethyleneglycol precipitation. Electron microscopic pictures, which show self-assembled HEV VLPs, could be taken for HEV genotypes 2, 3 and 4.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adlhoch C, Wolf A, Meisel H, Kaiser M, Ellerbrok H, Pauli G. High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet Microbiol* 2009; 139: 270-8.

Aggarwal R, Shahi H, Naik S, Yachha SK, Naik SR. Evidence in favour of high infection rate with hepatitis E virus among young children in India. *J Hepatol* 1997; 26: 1425-6.

Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res* 2011; 161: 47-58.

Anderson DA, Li F, Riddell M, Howard T, Seow HF, Torresi J, Perry G, Sumarsidi D, Shrestha SM, Shrestha IL. ELISA for IgG-class antibody to hepatitis E virus based on a highly conserved, conformational epitope expressed in Escherichia coli. *J Virol Methods* 1999; 81: 131-42.

Arankalle VA, Chadha MS, Tsarev SA, Emerson SU, Risbud AR, Banerjee K, Purcell RH. Seroepidemiology of water-borne hepatitis in India and evidence for a third enterically-transmitted hepatitis agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3428-32.

Arankalle VA, Chobe LP, Walimbe AM, Yergolkar PN, Jacob GP. Swine HEV infection in south India and phylogenetic analysis (1985-1999). *J Med Virol* 2003; 69: 391-6.

Asimoula S, Elena T, Alexopolilos C, Kyriakis SC, Froesner G. First report of serological evidence of hepatitis e virus infection in swine in northern greece. *Acta Veterinaria-Beograd* 2009; 59: 205-11.

Aye TT, Uchida T, Ma XZ, Iida F, Shikata T, Zhuang H, Win KM. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. Nucleic Acids Res 1992; 20: 3512.

Aye TT, Uchida T, Ma X, Iida F, Shikata T, Ichikawa M, Rikihisa T, Win KM. Sequence and gene structure of the hepatitis E virus isolated from Myanmar. Virus Genes 1993; 7: 95-109.

Baechlein C, Schielke A, Johne R, Ulrich RG, Baumgaertner W, Grummer B. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. Vet Microbiol 2010; 144: 187-91.

Baechlein C, Seehusen F, Nathues H, grosse Beilage E, Baumgartner W, Grummer B. Molecular detection of hepatitis E virus in German domestic pigs. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2013; 126: 25-31.

Balyan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, Ketiladze ES, Braginsky DM, Savinov AP, Poleschuk VF. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology 1983; 20: 23-31.

Balyan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, Djumalieva DI, Karas FR. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. J Med Virol 1990; 32: 58-9.

Balyan MS, Fedorova OE, Mikhailov MI. Antibody to hepatitis E virus in HIV-infected individuals and AIDS patients. Jounal of viral hepatitis 1997; 4(4): 279-83.

BayLfStaD (2015) Viehbestände in Bayern 2015. Ed Berichte S. Bayerisches Landesamt für Statistik und Datenverarbeitung, München

Beniwal M, Kumar A, Kar P, Jilani N, Sharma JB. Prevalence and severity of acute viral hepatitis and fulminant hepatitis during pregnancy: a prospective study from north India. Indian J Med Microbiol 2003; 21: 184-5.

Bradley D, Andjaparidze A, Cook EH, Jr., McCaustland K, Balayan M, Stetler H, Velazquez O, Robertson B, Humphrey C, Kane M, et al. Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. J Gen Virol 1988; 69 (Pt 3): 731-8.

Cao D, Meng X. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. Emerging Microbes & Infections 2012;

Chang Y, Wang L, Geng J, Zhu Y, Fu H, Ren F, Li L, Wang X, Zhuang H. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. Hepatol Res 2009; 39: 1153-8.

de Deus N, Seminati C, Pina S, Mateu E, Martin M, Segales J. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. Vet Microbiol 2007; 119: 105-14.

de Deus N, Casas M, Peralta B, Nofrarias M, Pina S, Martin M, Segales J. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. Vet Microbiol 2008a; 132: 19-28.

de Deus N, Peralta B, Pina S, Allepuz A, Mateu E, Vidal D, Ruiz-Fons F, Martin M, Gortazar C, Segales J. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. Vet Microbiol 2008b; 129: 163-70.

Dell'Amico MC, Cavallo A, Gonzales JL, Bonelli SI, Valda Y, Pieri A, Segund H, Ibanez R, Mantella A, Bartalesi F, Tolari F, Bartoloni A. Hepatitis E virus genotype 3 in humans and Swine, Bolivia. Emerg Infect Dis 2011; 17: 1488-90.

Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, Ruggeri FM. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol* 2008; 132: 47-55.

Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol* 2011; 149: 330-8.

dos Santos DR, de Paula VS, de Oliveira JM, Marchevsky RS, Pinto MA. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet Microbiol* 2011; 149: 236-41.

Dremsek P, Wenzel JJ, Johne R, Ziller M, Hofmann J, Groschup MH, Werdermann S, Mohn U, Dorn S, Motz M, Mertens M, Jilg W, Ulrich RG. Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med Microbiol Immunol* 2012; 201: 189-200.

Dremsek P, Joel S, Baechlein C, Pavio N, Schielke A, Ziller M, Durrwald R, Renner C, Groschup MH, Johne R, Krumbholz A, Ulrich RG. Hepatitis E virus seroprevalence of domestic pigs in Germany determined by a novel in-house and two reference ELISAs. *J Virol Methods* 2013; 190: 11-6.

Emerson SU, Arankalle VA, Purcell RH. Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis* 2005; 192: 930-3.

Fernandez-Barredo S, Galiana C, Garcia A, Vega S, Gomez MT, Perez-Gracia MT. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 2006; 18: 462-5.

Forgach P, Nowotny N, Erdelyi K, Boncz A, Zentai J, Szucs G, Reuter G, Bakonyi T. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet Microbiol* 2010; 143: 106-16.

Geng J, Wang L, Wang X, Fu H, Bu Q, Liu P, Zhu Y, Wang M, Sui Y, Zhuang H. Potential risk of zoonotic transmission from young swine to human: seroepidemiological and genetic characterization of hepatitis E virus in human and various animals in Beijing, China. *J Viral Hepat* 2011; 18: e583-90.

Geng Y, Wang C, Zhao C, Yu X, Harrison TJ, Tian K, Wang Y. Serological prevalence of hepatitis E virus in domestic animals and diversity of genotype 4 hepatitis E virus in China. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010; 10: 765-70.

Geng Y, Zhang H, Huang W. Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *hepatitis monthly journal* 2014; 14(1): e15618

Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol* 2006; 80: 5919-26.

Green KY, Ando T, Balayan MS, Berke T, Clarke IN, Estes MK, Matson DO, Nakata S, Neill JD, Studdert MJ, Thiel HJ. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 2: S322-30.

Gressner A, Arndt T (2007) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Guu T, Liu Z, Ye Q. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *PNAS* 2009; 106(31): 12992–7.

Hakze-van der Honing RW, van Coillie E, Antonis AF, van der Poel WH. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* 2011; 6: e22673.

Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol* 2001; 82: 2449-62.

He J, Hoffman SL, Hayes CG. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the hepatitis E virus structural protein gene induces immune response in mice. *Vaccine* 1997; 15: 357-62.

Herremans M, Duizer E, Jusic E, Koopmans MP. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 276-80.

Hopkins R, Esposito D. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. *BioTechniques* 2009; 47:785-8.

Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, Liu ST, Tam AW, Lin DY, Liaw YF. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3828-34.

Huang F, Hua X, Yang S, Yuan C, Zhang W. Effective inhibition of hepatitis E virus replication in A549 cells and piglets by RNA interference (RNAi) targeting RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res* 2009; 83: 274-81.

Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1326-32.

Huang YW, Opriessnig T, Halbur PG, Meng XJ. Initiation at the third in-frame AUG codon of open reading frame 3 of the hepatitis E virus is essential for viral infectivity in vivo. *J Virol* 2007; 81: 3018-26.

Ichiyama K, Yamada K, Tanaka T, Nagashima S, Jirintai, Takahashi M, Okamoto H. Determination of the 5'-terminal sequence of subgenomic RNA of hepatitis E virus strains in cultured cells. Arch Virol 2009; 154: 1945-51.

Ingham K. Precipitation of proteins with polyethylene glycol. Methods in enzymology 1990; 182: 301-6.

Invitrogen. Gateway Technology with Clonase II User Manual.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/gateway_clonaseii_man.pdf: 2012:

Invitrogen (2013a) Bac-to-Bac Baculovirus Expression System User Manual,
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/bactobac_man.pdf:

Invitrogen. Growth and Maintenance of Insect Cell Lines. 2013b;

Ippagunta SK, Naik S, Jameel S, Ramana KN, Aggarwal R. Viral RNA but no evidence of replication can be detected in the peripheral blood mononuclear cells of hepatitis E virus-infected patients. J Viral Hepat 2011; 18: 668-72.

Jimenez de Oya N, de Blas I, Blazquez AB, Martin-Acebes MA, Halaihel N, Girones O, Saiz JC, Escribano-Romero E. Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds. BMC Res Notes 2011; 4: 412.

Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H. Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. Arch Virol 2010; 155: 1217-26.

Johne R, Heckel G, Plenge-Bonig A, Kindler E, Maresch C, Reetz J, Schielke A, Ulrich RG. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. Emerg Infect Dis 2010a; 16: 1452-5.

Johne R, Plenge-Bonig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol* 2010b; 91: 750-8.

Kaba M, Davoust B, Marie JL, Barthet M, Henry M, Tamalet C, Raoult D, Colson P. Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France. *J Med Virol* 2009; 81: 1750-9.

Kaba M, Davoust B, Marie JL, Colson P. Detection of hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) livers. *Vet J* 2010a; 186: 259-61.

Kaba M, Colson P, Musongela JP, Tshilolo L, Davoust B. Detection of hepatitis E virus of genotype 3 in a farm pig in Kinshasa (Democratic Republic of the Congo). *Infect Genet Evol* 2010b; 10: 154-7.

Kaci S, Nockler K, Johne R. Detection of hepatitis E virus in archived German wild boar serum samples. *Vet Microbiol* 2008; 128: 380-5.

Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol* 2009; 83: 12714-24.

Kamar N, Selves J, Mansuy JM. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008; 358(8): 811-7.

Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How Should Hepatitis E Virus Infection Be Defined in Organ-Transplant Recipients? *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 1935–6.

Kamili S. Toward the development of a hepatitis E vaccine. *Virus Res* 2011; 161: 93-100.

Karetnyi Iu V, Dzhumalieva DI, Usmanov RK, Titova IP, Litvak Ia I, Balaian MS. [The possible involvement of rodents in the spread of viral hepatitis E]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1993; 52-6.

Kasorndorkbua C, Guenette DK, Huang FF, Thomas PJ, Meng XJ, Halbur PG. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. J Clin Microbiol 2004; 42: 5047-52.

Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. Lancet 1995; 345: 1025-6.

Khuroo MS, Kamili S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. J Viral Hepat 2003; 10: 61-9.

Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. J Viral Hepat 2009; 16: 519-23.

Kumar RM, Uduman S, Rana S, Kochiyil JK, Usmani A, Thomas L. Sero-prevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis E virus among pregnant women in the United Arab Emirates. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2001; 100: 9-15.

Lee WJ, Kang ML, Cha SB, Park BK, Choi IS, Yoo HS. Analysis of the helicase gene of Korean swine hepatitis E virus isolates and trends in viral infection. Arch Virol 2009; 154: 1361-4.

Lemon S. Hepatitis E virus. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, 4 edn. Mandell G, Bennett J, Dolin R, eds. New York: Churchill Livingstone 1995: 1663-6.

Li SW, Zhang J, Li YM, Ou SH, Huang GY, He ZQ, Ge SX, Xian YL, Pang SQ, Ng MH, Xia NS. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine:

antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. Vaccine 2005a; 23: 2893-901.

Li T, Takeda N, Miyamura. Essential elements of the capsid protein for self-assembly into empty virus-like particles of hepatitis E virus. Journal of virology 2005b; 29: 12999-3006.

Li X, Zhao C, Harrison TJ, Song A, Fan J, Zhang J, Wang Y. Investigation of hepatitis E virus infection in swine from Hunan province, China. J Med Virol 2008; 80: 1391-6.

Li Z, Yu S, Dong S, Zhu Y, Si F, Shen S, Jiang Z, Yu R, Zou S. Reduced prevalence of genotype 3 HEV in Shanghai pig farms and hypothetical homeostasis of porcine HEV reservoir. Vet Microbiol 2009; 137: 184-9.

Lindenbach B. Reed & Muench Calculator.
<http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CDQQFjAB&url=http%3A%2F%2Flindenbachlab.org%2FReed%26Muenchv3.xlsx&ei=rr4AU4ueHZDd7QaKzoGQBg&usg=AFQjCNEPwgCR8-CNeNsK4-ZBUoK3WUuC1g::> 2004:

Liu P, Du R, Wang L. Management of Hepatitis E Virus (HEV) Zoonotic Transmission: Protection of Rabbits against HEV Challenge following Immunization with HEV 239 Vaccine. PLoS One 2014;

Lorenzo FR, Tsatsralt-Od B, Ganbat S, Takahashi M, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia. J Med Virol 2007; 79: 1128-37.

Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev Med Virol 2006; 16: 5-36.

Martelli F, Caprioli A, Zengarini M, Marata A, Fiegna C, Di Bartolo I, Ruggeri FM, Delogu M, Ostanello F. Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet Microbiol* 2008; 126: 74-81.

Martelli F, Toma S, Di Bartolo I, Caprioli A, Ruggeri FM, Lelli D, Bonci M, Ostanello F. Detection of Hepatitis E Virus (HEV) in Italian pigs displaying different pathological lesions. *Res Vet Sci* 2010; 88: 492-6.

Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, Takahashi K, Shindo M, Kato M, Sato S, Kato T, Nishimori H, Tsuji K, Maguchi H, Yoshida J, Maekubo H, Mishiro S, Ikeda H. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 2008; 48: 1368-75.

McCreary C, Martelli F, Grierson S, Ostanello F, Nevel A, Banks M. Excretion of hepatitis E virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet Rec* 2008; 163: 261-5.

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 9860-5.

Meng XJ, Halbur PG, Haynes JS, Tsareva TS, Bruna JD, Royer RL, Purcell RH, Emerson SU. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch Virol* 1998; 143: 1405-15.

Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 117-22.

Meng XJ. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res* 2011; 161: 23-30.

Munne MS, Vladimirsky S, Otegui L, Castro R, Brajterman L, Soto S, Guarnera E, Molina V, Monfellano M, Schlauder GG, Gonzalez JE. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol* 2006; 78: 1579-83.

Naik SR, Aggarwal R, Salunke PN, Mehrotra NN. A large waterborne viral hepatitis E epidemic in Kanpur, India. *Bull World Health Organ* 1992; 70: 597-604.

Nanda SK, Panda SK, Durgapal H, Jameel S. Detection of the negative strand of hepatitis E virus RNA in the livers of experimentally infected rhesus monkeys: evidence for viral replication. *J Med Virol* 1994; 42: 237-40.

Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int* 2008; 28: 1190-9.

Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, Fujiwara S, Sakuma N, Kawazuma F, Sakamoto H, Sato Y, Bando M, Okamoto H. Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol* 2005; 86: 3321-6.

Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res* 2007; 127: 216-28.

Okamoto H. Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Res* 2011; 161: 65-77.

Panda SK, Ansari IH, Durgapal H, Agrawal S, Jameel S. The in vitro-synthesized RNA from a cDNA clone of hepatitis E virus is infectious. *J Virol* 2000; 74: 2430-7.

Panda SK, Thakral D, Rehman S. Hepatitis E virus. Rev Med Virol 2007; 17: 151-80.

Peralta B, Casas M, de Deus N, Martin M, Ortuno A, Perez-Martin E, Pina S, Mateu E. Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. Vet Microbiol 2009; 137: 66-73.

Perez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: An emerging disease. Infect Genet Evol 2014; 22C: 40-59.

Peron JM, Bureau C, Poirson H, Mansuy JM, Alric L, Selves J, Dupuis E, Izopet J, Vinel JP. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. J Viral Hepat 2007; 14: 298-303.

Pina S, Buti M, Cotrina M, Piella J, Girones R. HEV identified in serum from humans with acute hepatitis and in sewage of animal origin in Spain. J Hepatol 2000; 33: 826-33.

Polyplus-transfection. FectoFly in vitro Transfection Protocol.
http://www.polyplus-transfection.com/wp-content/uploads/2009/08/112FectoFly_vC.pdf: 2010:

Ponterio E, Bartolo I, Orru G, Detection of serum antibodies to hepatitis E virus in domestic pigs in Italy using a recombinant swine HEV capsid protein. Vet Res 2014; 10:133.

Purcell RH. Hepatitis E virus. In: Fields Virology, 3 edn. Fields B, Knipe D, Howley P, eds. Philadelphia: Lippincott 1996: 2831-43.

Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. J Hepatol 2008; 48: 494-503.

Quizlet (2014) HEV infection: typical serological course,
<http://quizlet.com/10903165/micro-block-3-l11-hepatitis-12-flash-cards/>:

Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. Nat Rev Immunol 2005; 5: 215-29.

Reuter G, Fodor D, Forgach P, Katai A, Szucs G. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. J Clin Virol 2009; 44: 277-81.

Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE, Bradley DW. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. Science 1990; 247: 1335-9.

RKI (2014), <http://www.rki.de>:

Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, Merbah T, Eono F, Eloit M, Madec F, Pavio N. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 2011; 34: 419-27.

Sakano C, Morita Y, Shiono M, Yokota Y, Mokudai T, Sato-Motoi Y, Noda A, Nobusawa T, Sakaniwa H, Nagai A, Kabeya H, Maruyama S, Yamamoto S, Sato H, Kimura H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars (*Sus scrofa leucomystax*) and pigs in Gunma Prefecture, Japan. J Vet Med Sci 2009; 71: 21-5.

Sato Y, Sato H, Naka K, Furuya S, Tsukiji H, Kitagawa K, Sonoda Y, Usui T, Sakamoto H, Yoshino S, Shimizu Y, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai, Nishizawa T, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. Arch Virol 2011; 156: 1345-58.

Schultheiß M, Böttler T, Thimme R (2013) Hepatitis-E-Virusinfektion, http://www.drfalkpharma.de/uploads/toccm2/FGK_2_13_Thimme.pdf:

Sherman KE. Hepatitis e virus infection: more common than previously realized? Gastroenterol Hepatol (N Y) 2011; 7: 759-61.

Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, Mammen MP, Jr., Thapa GB, Thapa N, Myint KS, Fourneau M, Kuschner RA, Shrestha SK, David MP, Seriwatana J, Vaughn DW, Safary A, Endy TP, Innis BL. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. N Engl J Med 2007; 356: 895-903.

SIB. Swiss Institute of Bioinformatics.
http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/770.html. 2008:

Siripanyaphinyo U, Laohasinnarong D, Siripanee J, Kaeoket K, Kameoka M, Ikuta K, Sawanpanyalert P. Full-length sequence of genotype 3 hepatitis E virus derived from a pig in Thailand. J Med Virol 2009; 81: 657-64.

Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. J Clin Microbiol 2004; 42: 5371-4.

Srivastava R, Aggarwal R, Sachdeva S, Alam MI, Jameel S, Naik S. Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. J Gastroenterol Hepatol 2011; 26: 306-11.

StBA (2015) Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

Suneetha PV, Pischke S, Schlaphoff V, Grabowski J. Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. Hepatology 2012; 55(3): 695-708.

Surjit M, Jameel S, Lal SK. The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J Virol* 2004; 78: 320-8.

Takahashi M, Nishizawa T, Miyajima H, Gotanda Y, Iita T, Tsuda F, Okamoto H. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2003; 84: 851-62.

Takahashi M, Nishizawa T, Tanaka T, Tsatsralt-Od B, Inoue J, Okamoto H. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J Gen Virol* 2005; 86: 1807-13.

Tanaka H, Yoshino H, Kobayashi E, Takahashi M, Okamoto H. Molecular investigation of hepatitis E virus infection in domestic and miniature pigs used for medical experiments. *Xenotransplantation* 2004; 11: 503-10.

Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 2007; 88: 903-11.

Tavitian S, Péron J, Huynh A. Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Virology* 2010; 49(2): 141-4.

Teo CG. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 24-32.

Tian DY, Chen Y, Xia NS. Significance of serum IgA in patients with acute hepatitis E virus infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3919-23.

Ticehurst J. Hepatitis E Virus. In: Manual of Clinical Microbiology, 7 edn. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F, Yolken R, eds. Washington DC: American Society for Microbiology Press 1999: 1053-69.

Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, Jameel S, Lal SK. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem* 2002; 277: 22759-67.

Tyagi S, Surjit M, Lal SK. The 41-amino-acid C-terminal region of the hepatitis E virus ORF3 protein interacts with bikunin, a kunitz-type serine protease inhibitor. *J Virol* 2005; 79: 12081-7.

Usmanov RK, Balaian MS, Dzhumalieva DI, Alymbaeva DB, Korolev MB, Karas FR, Zamiatina NA, Berdikozhoeva SK, Karymshakova Ch T, Kozhomkulov ET, et al. [Experimental hepatitis E infection in piglets]. *Vopr Virusol* 1991; 36: 212-6.

Vasickova P, Psikal I, Widen F, Smitalova R, Bendova J, Pavlik I, Kralik P. Detection and genetic characterisation of Hepatitis E virus in Czech pig production herds. *Res Vet Sci* 2009; 87: 143-8.

Vitral CL, Pinto MA, Lewis-Ximenez LL, Khudyakov YE, dos Santos DR, Gaspar AM. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 117-22.

Vivek R, Kang G. Hepatitis E virus infections in swine and swine handlers in Vellore, Southern India. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 84: 647-9.

Wacheck S, Werres C, Mohn U, Dorn S, Soutschek E, Fredriksson-Ahomaa M, Martlbauer E. Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9: 655-60.

Wang YC, Zhang HY, Xia NS, Peng G, Lan HY, Zhuang H, Zhu YH, Li SW, Tian KG, Gu WJ, Lin JX, Wu X, Li HM, Harrison TJ. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol* 2002; 67: 516-21.

Ward P, Muller P, Letellier A, Quessy S, Simard C, Trottier YL, Houde A, Brassard J. Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Can J Vet Res* 2008; 72: 27-31.

Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M. Test Performance Characteristics of Anti-HEV IgG Assays Strongly Influence Hepatitis E Seroprevalence Estimates. *J Infect Dis* 2013; 207: 497-500.

Widen F, Sundqvist L, Matyi-Toth A, Metreveli G, Belak S, Hallgren G, Norder H. Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol Infect* 2011; 139: 361-71.

Williams TP, Kasorndorkbua C, Halbur PG, Haqshenas G, Guenette DK, Toth TE, Meng XJ. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3040-6.

Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet* 1980; 2: 876-9.

Wu JC, Chen CM, Chiang TY, Sheen IJ, Chen JY, Tsai WH, Huang YH, Lee SD. Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol* 2000; 60: 166-71.

Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol* 2009; 90: 1880-91.

Yoo D, Willson P, Pei Y, Hayes MA, Deckert A, Dewey CE, Friendship RM, Yoon Y, Gottschalk M, Yason C, Giulivi A. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 1213-9.

Yu JN, Kim MY, Kim DG, Kim SE, Lee JB, Park SY, Song CS, Shin HC, Seo KH, Choi IS. Prevalence of hepatitis E virus and sapovirus in post-weaning pigs and identification of their genetic diversity. *Arch Virol* 2008; 153: 739-42.

Zafrullah M, Ozdener M, Kumar R, Panda S, Jameel S. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *Journal of Virology* 1999; 4074-82.

Zhang H, Dai X, Shan X, Meng J. Characterization of antigenic epitopes of the ORF2 protein from hepatitis E virus genotype 4. *Virus Res* 2009; 142: 140-3.

Zhang W, Shen Q, Mou J, Gong G, Yang Z, Cui L, Zhu J, Ju G, Hua X. Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health* 2008; 55: 291-8.

Zhang X, Li A, Shuai J, Dai Y, Zhu Z, Wu S, He Y. Validation of an internally controlled multiplex real time RT-PCR for detection and typing of HEV genotype 3 and 4. *J Virol Methods* 2013; 193: 432-8.

Zheng Y, Ge S, Zhang J, Guo Q, Ng MH, Wang F, Xia N, Jiang Q. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis* 2006; 193: 1643-9.

Zheng ZZ, Miao J, Zhao M, Tang M, Yeo AE, Yu H, Zhang J, Xia NS. Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking. *J Gen Virol* 2010; 91: 1728-36.

Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, Wang H, Yang CL, Jiang HM, Cai JP, Wang YJ, Ai X, Hu YM, Tang Q, Yao X, Yan Q, Xian YL, Wu T, Li YM, Miao J, Ng MH, Shih JW, Xia NS. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet 2010; 376: 895-902.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hepatitis E Viren.....	S. 5
Abbildung 2: Anordnung und Funktion der drei ORFs im HEV-Genom.....	S. 7
Abbildung 3: Replikationszyklus des Hepatitis E Virus.....	S. 8
Abbildung 4: Übertragungswege von HEV.....	S. 9
Abbildung 5: Verlauf diagnostisch relevanter Parameter einer HEV-Infektion in Wochen p.i.....	S. 18
Abbildung 6: Geographische Verteilung der HEV-Genotypen bei Mensch und Schwein.....	S. 23
Abbildung 7: Sprunghafter Anstieg der gemeldete Hepatitis-E-Erkrankungen nach Meldejahr von 2001 bis 2013 in Deutschland.....	S. 24
Abbildung 8: Kristallstruktur und Durchmesser in Nanometer (nm) von HEV (A) und HEV-VLP (B) im Vergleich.....	S. 25
Abbildung 9: Kapsidmodell von HEV und HEV-VLP im Vergleich.....	S. 25
Abbildung 10: BP-Reaktion der Gateway-Klonierung, schematisch.....	S. 32
Abbildung 11: LR-Reaktion der Gateway-Klonierung, schematisch.....	S. 33
Abbildung 12: Übersicht zur baculoviralen Proteinexpression.....	S. 34
Abbildung 13: Übersicht zur Herstellung rekombinanter Bacmid-DANN.....	S. 35
Abbildung 14: pUC/M13-PCR zum Nachweis der rekombinanten Bacmide bMON14272-ORF2 (GT 1-4).....	S. 41
Abbildung 15: Transfektion von Sf9-Zellen in 6-Well-Platten mit dem FectoFly-Transfektionsreagenz.....	S. 45
Abbildung 16: Titrationsplatte mit grün-fluoreszierenden Sf9ET-Zellen in ansteigenden Verdünnungsstufen, schematisch.....	S. 47
Abbildung 17: BsrGI-Restriktionsverdau der pDEST8-ORF2-Plasmide.....	S. 53

Abbildung 18: pUC/M13-PCR-Fragmente der rekombinanten Bacmid-DNA bMON14272-ORF2 (GT 1-4).....	S. 55
Abbildung 19: Transfizierte Sf9ET-Insektenzellen im Lichtmikroskop (A) und im Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht (B) 72 h nach Inkubation.....	S. 57
Abbildung 20: Coomassie-Färbung.....	S. 58
Abbildung 21: Immundetektion der rekombinanten ORF2-Proteine mit HEV-positivem Humanserum.....	S. 60
Abbildung 22: Immundetektion der rekombinanten ORF2-Proteine mit HEV-negativem Humanserum als Negativ-Kontrolle.....	S. 60
Abbildung 23: Immundetektion der rekombinanten ORF2-Proteine mit monoklonalem Maus-Antikörper.....	S. 62
Abbildung 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der HEV-VLPs.....	S. 63
Abbildung 25: Sequenzalignment der HEV-ORF2-Proteine (Genotyp 1-4) auf Aminosäureebene mit den vier möglichen Epitopen, an die eine Bindung des monoklonalen Antikörpers möglich wäre.....	S. 67

X. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Die vier humanpathogenen Genotypen und deren Subtypen.....	S. 7
Tabelle 2: Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenz von anti-HEV-IgG, der Prävalenz von HEV-RNA sowie des Genotyps in verschiedenen Ländern beim Hausschwein.....	S. 11ff
Tabelle 3: Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenz von anti-HEV-IgG, der Prävalenz von HEV-RNA sowie des Genotyps in verschiedenen Ländern beim Wildschwein.....	S. 13
Tabelle 4: Beispielhafte Auflistung der Seroprävalenz von anti-HEV-IgG bei verschiedenen Tierarten.....	S. 14
Tabelle 5: Lytischer und lysogener Reaktionsweg der Gateway-Klonierung...S.	31
Tabelle 6: Ligationsansatz für die Gateway-LR-Reaktion.....	S. 36
Tabelle 7: Zusammensetzung des Mastermix zur Template-Vorbereitung auf die pUC/M13-PCR.....	S. 41
Tabelle 8: Thermocycler-Programm der pUC/M13-PCR.....	S. 42
Tabelle 9: Konzentration der rekombinanten Bacmid-DNA in ng/ μ l (GT 1-4) nach Maxipräparation.....	S. 56
Tabelle 10: Titrationsergebnisse, angegeben in TCID ₅₀ /ml, der P1- und P2-Virusstocks.....	S. 57

XI. DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Universitätsprofessor Doktor Gerd Sutter von der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, dass er mir ermöglichte an seinem Institut zu promovieren. Außerdem bedanke ich mich für seine wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge und für seine Geduld.

Ich danke Herrn Doktor Ulrich Busch, Leiter des Sachgebiets Lebensmittelhygiene und Gentechnik am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim, für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung GenTA anfertigen zu dürfen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die wichtigen Ratschläge und Anregungen bedanken, die meine Arbeit in diese Form gebracht haben.

Ich danke von ganzem Herzen Herrn PD Doktor Armin Baiker für die Betreuung meiner Dissertation und für die wissenschaftliche Expertise, ohne die die vorliegende Arbeit nicht hätte gelingen können. Außerdem möchte ich mich bei ihm für das sehr gute Arbeitsklima und die motivierenden, zuversichtlichen und aufmunternden Worte bedanken, die in vielen Situationen während der Entstehung dieser Arbeit außerordentlich hilfreich und prägend für mich waren.

Ich danke ganz besonders Herrn Doktor Thorsten Stellberger, ohne dessen Expertenwissen, Können und Unterstützung diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre. Ich bin unglaublich dankbar für seine Geduld mit mir und für die Zeit, in der ich mit ihm zusammen arbeiten und so viel von ihm lernen durfte.

Ich danke vielmals Frau Maren Haase, dass sie mir viele Fertigkeiten der Laborarbeit lehrte und mir stets mit ihrem Fachwissen zur Seite stand. Zudem bedanke ich mich für die von ihr angefertigten Listen und Dokumentationshilfen, welche mir so manchen Arbeitsschritt erleichtert haben. Ich möchte mich bei ihr für all die großen und kleinen Hilfen während der Entstehung dieser Arbeit bedanken.

Ich danke besonders Frau Doktor Antonie Neubauer-Juric und Frau Franziska Horvath für die Untersuchung meiner Proben mit dem Elektronenmikroskop. Die Bestätigung durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass sich die rekombinanten Proteine zu VLPs assemblieren, ist für mich außerordentlich bedeutend und großartig.

Ich danke Herrn Doktor Andreas Osterman, Frau Doktor Melanie Pavlovic, Herrn Doktor Patrick Gürtler, Herrn Doktor Lars Gerdes, Frau Mandy Fleischhauer und allen anderen Kollegen, die mir in dieser Zeit viele Tipps und Anregungen zuteilwerden ließen.

Ich danke Frau Doktor Elisabeth Zandt für ihre Motivation, ihr Interesse an meiner Arbeit und für ihre Freundschaft.

Ich danke meinem Mann, der immer an mich glaubt und mich während dieser Arbeit sehr unterstützt hat. Ohne seine wertvolle Hilfe wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die wichtigsten Grundsteine für mein Leben gelegt und mir diesen Weg ermöglicht haben. Außerdem danke ich Ihnen für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

