

**Untersuchung einer neuen markierungsfreien
Nachweismethode zur Diagnostik von Virusinfektionen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Doreen Staat

aus Potsdam

Juni 2019

Die Promotion wurde vom 1. November 2013 bis 31. Dezember 2017 im Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene (Hochpathogene Viren) am Robert Koch-Institut unter der Leitung von Prof. Dr. Matthias Niedrig angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Niedrig
Robert Koch-Institut

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel
Freie Universität Berlin

Disputation am: 24.07.2019

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Niedrig bedanken – nicht nur für die Möglichkeit der Promotion, sondern auch für sein Vertrauen, seine unkomplizierte und freundliche Art sowie dafür, dass er sich immer Zeit für meine Fragen genommen und mir den Freiraum zur selbstständigen Arbeit gelassen hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Rupert Mutzel von der Freien Universität Berlin für seine Bereitschaft, die Zweitgutachter-Tätigkeit meiner Dissertation zu übernehmen.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Andreas Nitsche, der mich in seine Arbeitsgruppe ohne Wenn und Aber integriert und auch in schwierigen Situationen mit aufbauenden Worten unterstützt hat.

Darüber hinaus möchte ich allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe, insbesondere meinen Büro- und Doktorandenkollegen, für die schöne Zeit und die Unterstützung danken, die ich durch sie während der Anfertigung meiner Promotion erhalten habe. Besonders danken möchte ich Dr. Marica Grossegeesse, Dr. Jeanette Klenner, Dr. Nadine Litzba und Ravish Paliwal, die mich auf dem langen und manchmal beschwerlichen Weg der Doktorarbeit begleitet haben. Ohne Euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht. Hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Ilka Schlenther, die im Laufe der vielen Jahre zu einer engen Freundin geworden ist und die ich auch in meinem „Leben nach der Promotion“ nicht mehr missen möchte.

Dr. Pranav Patel und Dr. Daniel Stern möchte ich für den konstruktiven Wissensaustausch danken. Bei Lars Möller möchte ich mich für sein Engagement und die Durchführung der Elektronenmikroskopie bedanken.

Mein Dank geht auch an die Kooperationspartner der Biometrics GmbH: Dr. Günther Proll, Dr. Florian Pröll, Dr. Peter Fechner, Dr. Goran Markovic sowie Anja Hartjes.

Der größte Dank gebührt jedoch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich stets bei allem unterstützt haben. Ohne meine Mutter, die unzählige Spaziergänge mit dem Kinderwagen gemacht hat, damit ich in Ruhe die Dissertation verfassen kann, wäre dieses Werk nicht rechtzeitig fertig geworden. Meinem Mann Christian danke ich von ganzem Herzen für seinen Zuspruch, sein Verständnis, seine seelische und moralische Unterstützung sowie seine Liebe. Danke, dass Du an meiner Seite bist! Ganz zum Schluss, aber keineswegs weniger bedeutsam, möchte ich meiner kleinen Tochter für ihr sonniges Gemüt und die unendliche Kraft, die sie mir jeden Morgen durch ein einziges Lächeln schenkt, danken.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	IX
Abstract	X
1 Einleitung	1
1.1 Infektionskrankheiten.....	1
1.2 Flaviviren.....	2
1.2.1 Taxonomie.....	2
1.2.2 Virusaufbau und virale Proteine.....	3
1.2.3 Lokalisation der Viren in der Wirtszelle während ihrer Replikation.....	5
1.2.4 Ausgewählte Flaviviren.....	6
1.2.4.1 Gelbfiebereviren.....	6
1.2.4.2 Dengueviren.....	8
1.2.4.3 Frühsommer-Meningoenzephalitis-Viren.....	9
1.3 Orthopockenviren.....	10
1.4 Antikörper.....	11
1.5 Diagnostik von Virusinfektionen.....	13
1.6 Biosensor-Technologie.....	16
1.6.1 Optische Biosensoren.....	16
1.6.2 SCORE-Technologie.....	17
1.7 Zielsetzung.....	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und kommerzielle Reaktionsansätze.....	20
2.1.2 Chemikalien, Puffer und Gebrauchslösungen.....	21
2.1.3 Zellen, Viren und Antikörper.....	22
2.1.4 Enzyme, Primer und Sonden.....	23
2.1.5 Software.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Zytologische Methoden.....	25
2.2.1.1 Zellkultivierung.....	25
2.2.1.2 Kryokonservierung.....	25
2.2.1.3 Zellzahlbestimmung.....	26
2.2.2 Virologische Methoden.....	26
2.2.2.1 Virusanzucht und Inaktivierung.....	26
2.2.2.2 Plaque-Titrationstest.....	26
2.2.2.3 Herstellung von Antigenen aus Zelllysat.....	27
2.2.3 Herstellung von monoklonalen Antikörpern.....	27
2.2.3.1 <i>In vitro</i> -Produktion.....	28

2.2.3.2	Aufreinigung	29
2.2.3.3	Umpufferung und Quantifizierung.....	30
2.2.4	Markierungsfreie Biosensor-Technologie (SCORE)	30
2.2.4.1	Funktionalisierung der Biosensoroberfläche.....	30
2.2.4.2	SCORE-Messung mit dem Prototyp	32
2.2.4.3	Auswertung der Messung am Prototyp	33
2.2.5	Serologische Methode: Indirekter Immunfluoreszenztest.....	34
2.2.6	Mikroskopische Methoden	35
2.2.6.1	Immunfluoreszenzmikroskopie am cLSM.....	35
2.2.6.2	Transmissions-Elektronenmikroskopie.....	35
2.2.7	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.7.1	Kontaminationskontrolle auf Mykoplasmen und Simian Virus 5	36
2.2.7.2	Quantifizierung viraler Genomäquivalente.....	37
2.2.8	Statistik.....	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Hergestellte Antikörper und Viren.....	39
3.1.1	Quantifizierung der Antikörper.....	39
3.1.2	Quantifizierung der Viren	39
3.1.3	Visualisierung der Viren	40
3.2	Markierungsfreie Biosensor-Technologie (SCORE)	42
3.2.1	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombinationen.....	42
3.2.1.1	Nachweis des Gelbfiebervirus (Stamm Asibi und 17D).....	42
3.2.1.2	Nachweis des Denguevirus (Serotyp 1 - 4).....	44
3.2.1.3	Nachweis des FSME-Virus	46
3.2.1.4	Nachweis des Vacciniavirus	47
3.2.2	Spezifitätsuntersuchungen.....	49
3.2.2.1	Spezifität der Antikörper unter den initialen Messbedingungen ...	49
3.2.2.2	Optimierung der initialen Messbedingungen zur Antikörperspezifitätssteigerung	54
3.2.2.3	Spezifität der Antikörper unter den optimierten Messbedingungen.....	62
3.2.3	Sensitivitätsuntersuchungen	67
3.2.3.1	Einfluss der immobilisierten Antikörpermenge auf den Virusnachweis	67
3.2.3.2	Einfluss der Virusmenge auf den Nachweis – Ermittlung der Nachweisgrenze	68
3.2.4	Nachweis von Viren in humanem Blutserum	69
3.2.5	Nachweis von Antikörpern.....	70
3.3	Indirekter Immunfluoreszenztest	72
3.3.1	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombinationen	72
3.3.1.1	Nachweis des Gelbfiebervirus (Stamm Asibi und 17D).....	72
3.3.1.2	Nachweis des Denguevirus (Serotyp 1 - 4).....	73
3.3.1.3	Nachweis des FSME-Virus	74

3.3.1.4	Nachweis des Vacciniavirus	75
3.3.2	Spezifitätsuntersuchungen.....	77
3.3.2.1	Spezifität der Antikörper.....	77
4	Diskussion.....	79
4.1	Hergestellte Antikörper und Viren.....	79
4.1.1	Produktion monoklonaler Antikörper	79
4.1.2	Produktion der Virusstammlösungen	79
4.1.3	Visualisierung der Viren	82
4.2	Markierungsfreie Biosensor-Technologie.....	84
4.2.1	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombinationen	84
4.2.2	Spezifität der Antikörper unter den initialen Messbedingungen.....	86
4.2.3	Optimierung der initialen Messbedingungen zur Antikörperspezifitätssteigerung	88
4.2.3.1	Einfluss von Urea und Tween 20	88
4.2.3.2	Einfluss des pH-Wertes	90
4.2.3.3	Einfluss von Temperatur und Ionenstärke	91
4.2.3.4	Einfluss des Messpuffers.....	92
4.2.4	Spezifität der Antikörper unter den optimierten Messbedingungen	95
4.2.4.1	Nachweis des Gelbfiebervirus (Stamm 17D).....	95
4.2.4.2	Nachweis des Denguevirus (Serotyp 4)	95
4.2.4.3	Nachweis des FSME-Virus und des Vacciniavirus	96
4.2.5	Sensitivitätsuntersuchungen	97
4.2.5.1	Einfluss der immobilisierten Antikörpermenge auf den Virusnachweis	97
4.2.5.2	Einfluss der Virusmenge auf den Nachweis – Ermittlung der Nachweisgrenze	98
4.2.6	Nachweis von Viren in humanem Blutserum	98
4.2.7	Nachweis von Antikörpern.....	99
5	Schlussfolgerung und Ausblick	100
6	Literaturverzeichnis	102
7	Anhang.....	118
8	Eigene ausgewählte Veröffentlichungen.....	120
9	Eidesstattliche Erklärung	121

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenz des E-Proteins.	2
Abb. 2	Schematischer Aufbau eines Flaviviruspartikels.	4
Abb. 3	Schematische Darstellung des Flavivirus-Replikationszyklus sowie der antikörpervermittelten Neutralisierung und Verstärkung der Infektion.	5
Abb. 4	Schematischer Zeitverlauf einer Gelbfieberinfektion inklusive Virämie.	7
Abb. 5	Prinzip der SCORE-Technologie.	18
Abb. 6	Taumelrotationskammer (Bioreaktor) für die <i>in vitro</i> -Produktion von monoklonalen Antikörpern mittels Hybridomzellen.	28
Abb. 7	Apparatur zur Aufreinigung der produzierten Antikörper.	29
Abb. 8	Schematische Darstellung eines Biosensors für die SCORE-Technologie.	31
Abb. 9	<i>bScreen</i> -Prototyp.	32
Abb. 10	Schematische Darstellung eines Messbildes während des Auswertungsprozesses.	33
Abb. 11	Schematische Bindungskurve.	34
Abb. 12	Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen des GFV _{Asibi} und VACV.	40
Abb. 13	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des GFV.	43
Abb. 14	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des DENV.	44
Abb. 15	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des FSMEV.	46
Abb. 16	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des VACV.	47
Abb. 17	Spezifität der ausgewählten Antikörper hinsichtlich der Virustypen GFV _{Asibi} , DENV ₄ , FSMEV und VACV unter initialen Messbedingungen.	50
Abb. 18	Einfluss von Zellkulturüberstand auf die Bindungssignale unter initialen Bedingungen.	51
Abb. 19	Einfluss von Urea auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	54
Abb. 20	Einfluss des pH-Wertes des Messpuffers auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	56
Abb. 21	Einfluss von Messtemperatur (37 °C) und Ionenstärke auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	58
Abb. 22	Einfluss des Messpuffers auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	59
Abb. 23	Spezifität der Antikörper hinsichtlich der Virustypen GFV _{17D} und DENV ₄ unter den optimierten Messbedingungen.	64
Abb. 24	Spezifität der Antikörper hinsichtlich der Virustypen FSMEV und VACV unter den optimierten Messbedingungen.	65
Abb. 25	Einfluss von Zellkulturüberstand auf die Bindungssignale unter den optimierten Bedingungen.	66
Abb. 26	Einfluss der Antikörper-Spottingkonzentration auf den Nachweis des GFV _{Asibi}	67
Abb. 27	Ermittlung der Nachweisgrenze.	68
Abb. 28	Nachweis des GFV _{Asibi} in humanem Blutserum.	69
Abb. 29	Nachweis des monoklonalen Antikörpers α -GFV ₆₃₃₀	70
Abb. 30	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des GFV im IIFT. ..	73

Abb. 31	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des DENV im IIFT.....	74
Abb. 32	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des FSMEV im IIFT.....	75
Abb. 33	Verdünnungsreihe der monoklonalen Antikörper gegen das VACV.....	76
Abb. 34	Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des VACV im IIFT.....	76
Abb. 35	Spezifität der ausgewählten Antikörper im IIFT hinsichtlich der Virustypen GFV _{Asibi} , GFV _{17D} , DENV ₄ und FSMEV.	77
Abb. A36	Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen des GFV _{Asibi} und VACV.....	118
Abb. A37	Einfluss von NaCl auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	118
Abb. A38	Spezifität der Antikörper hinsichtlich des DENV ₄ in Phosphatpuffer.	119

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Geräte.....	20
Tab. 2	Verbrauchsmaterialien	20
Tab. 3	Kommerzielle Reaktionsansätze	20
Tab. 4	Chemikalien und biologische Agenzien.....	21
Tab. 5	Puffer und Gebrauchslösungen	22
Tab. 6	Zelllinien.....	22
Tab. 7	Zellkulturmedien.....	22
Tab. 8	Viren	23
Tab. 9	Antikörper.....	23
Tab. 10	Enzyme, Primer und Sonden.....	23
Tab. 11	Software.....	24
Tab. 12	Mykoplasmen-qPCR: Reaktionsansatz.....	36
Tab. 13	Mykoplasmen-qPCR: Thermoprofil	36
Tab. 14	SV5-RT-qPCR: Reaktionsansatz	37
Tab. 15	SV5-RT-qPCR: Thermoprofil.....	37
Tab. 16	Flavivirus-qRT-PCR: Reaktionsansatz	37
Tab. 17	Flavivirus-qRT-PCR: Thermoprofil.....	37
Tab. 18	Vacciniavirus-qPCR: Reaktionsansatz.....	37
Tab. 19	Vacciniavirus-qPCR: Thermoprofil	37
Tab. 20	Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des GFV.....	43
Tab. 21	Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des DENV.....	45
Tab. 22	Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des FSMEV.	46
Tab. 23	Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des VACV.	47
Tab. 24	Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der ausgewählten Antikörper in Abhängigkeit der Virustypen GFV _{Asibi} , DENV ₄ , FSMEV und VACV unter den initialen Messbedingungen.	51
Tab. 25	Einflusses von Zellkulturüberstand auf die maximalen Bindungssignale unter den initialen Messbedingungen.	52
Tab. 26	Einfluss von Urea und NaCl auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	55
Tab. 27	Einfluss des pH-Wertes des Messpuffers auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	57
Tab. 28	Einfluss von Messtemperatur und Ionenstärke auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	58

Tab. 29	Einfluss des Messpuffers auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV _{Asibi}	60
Tab. 30	Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des GFV _{17D} unter den optimierten Messbedingungen.	62
Tab. 31	Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des DENV ₄ unter den optimierten Messbedingungen.	63
Tab. 32	Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des FSMEV und VACV unter den optimierten Messbedingungen.	65
Tab. 33	Einfluss der Antikörper-Spottingkonzentration auf die maximalen Bindungssignale am Beispiel des GFV _{Asibi}	67
Tab. 34	Maximale Bindungssignale der Antikörper beim Nachweis des GFV _{Asibi} in humanem Blutserum.	70
Tab. 35	Maximale Bindungssignale im Rahmen des Nachweises des Antikörpers α -GFV ₆₃₃₀	71
Tab. A36	Quantifizierung der Virus-Stammlösungen auf Basis zytopathischer Viruspartikel.	118
Tab. A37	Quantifizierung der Virus-Stammlösungen auf Basis viraler Nukleinsäuren.	118
Tab. A38	Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des DENV ₄ in Phosphatpuffer.	119

Abkürzungsverzeichnis

	A		
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Statistikmethode)	PB	Phosphatpuffer
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
	C	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat Hydrat	PEG	Polyethylenglykol
cLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop	PFA	Paraformaldehyd
CMC	Carboxymethylcellulose	PFU	<i>Plaque Forming Units</i>
	D		Q
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser	qRT-PCR	Quantitative <i>Reverse Transcription</i> Polymerase-Kettenreaktion
DCPEG	Dicarboxy-Polyethylenglykol		R
DENV ₁₋₄	Denguevirus Serotyp 1, 2, 3 und 4	RIfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
DENV ₁	Denguevirus Serotyp 1	RKI	Robert Koch-Institut
DENV ₂	Denguevirus Serotyp 2	ROI	<i>Region of Interest</i>
DENV ₃	Denguevirus Serotyp 3	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Medium)
DENV ₄	Denguevirus Serotyp 4	RT	Raumtemperatur
DIC	Dichlormethan		S
DMF	N,N-Dimethylformamid	SCORE	<i>Single Colour Reflectometry</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	SV 5	Simian Virus 5
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat		T
	E		V
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		Z
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	VACV	Vacciniavirus
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
	F	ZBS1	Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene – Hochpathogene Viren
FFU	<i>Focus Forming Units</i>	ZBS4	Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene – Spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie
FITC	Fluorescein		
FKS	Fötales Kälberserum		
Flavi	Flavivirus		
FSMEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus		
	G		
GÄ	Genomäquivalente		
GFV _{Asibi}	Gelbfiebertvirus Stamm Asibi		
GFV _{17D}	Gelbfiebertvirus Stamm 17D		
GOPTS	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan		
	H		
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure		
	I		
Ig	Immunglobulin		
IIFT	Indirekter Immunfluoreszenztest		
	M		
mAk	Monoklonale/r Antikörper		
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>		
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure		
	N		
n. b.	Nicht bestimmt		
NHS	N-Hydroxysuccinimid		

Zusammenfassung

Der schnelle Nachweis von Virusinfektionen ist eine entscheidende Voraussetzung, um eine Diagnose und damit einhergehend eine adäquate Behandlung erkrankter Personen zu gewährleisten. Der „ideale diagnostische Test“ sollte u. a. sensitiv, spezifisch, schnell, robust, einfach in der Probenhandhabung, ohne aufwendige Gerätetechnik sowie kostengünstig sein. Damit wird dessen breite Anwendbarkeit erleichtert und die Möglichkeit eröffnet, den Test ohne ein zentrales Diagnostiklabor, z. B. direkt beim Arzt oder „im Feld“ durchzuführen (*Point-of-Care-Test*). Nur mittels zuverlässiger Diagnostik lassen sich Patienten effizient behandeln und geeignete Maßnahmen einleiten, um eine Ausbreitung von Infektionskrankheiten zu verhindern. Konventionelle Nachweismethoden zur Diagnostik sind u. a. zeitaufwendig, kostenintensiv, erfordern mehrere Probenbearbeitungsschritte, eine adäquate Laborausstattung oder geschultes Personal, was deren Anwendbarkeit, z.B. auch als *Point-of-Care-Test*, einschränkt. Eine vielversprechende neue Methode für die Virusdiagnostik und den möglichen Einsatz als *Point-of-Care-Test* stellt die *Single Colour Reflectometry* (SCORE)-Technologie dar. Diese optische Biosensormethode ermöglicht die markierungsfreie Echtzeitanalyse von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen. Für die vorliegende Arbeit wurde die Annahme verfolgt, dass über den mit Antikörpern funktionalisierten Biosensor die Bindung von Viren erfasst werden kann. Für die Untersuchung der SCORE-Technologie zur Diagnostik von Virusinfektionen wurden humanpathogene Viren (Gelbfieber-, Dengue-, FSME- und Vacciniaviren) angezüchtet und monoklonale Antikörper (mAk) für den Nachweis der genannten Viren im Labormaßstab hergestellt. In den Messungen mit einem SCORE-Prototyp konnten mAk identifiziert werden, die für das entsprechende Virus als einzige eine Bindung oder ein relevant stärkeres Signal als die weiteren getesteten mAk aufweisen. Eine Unterscheidung der Viren auf Basis der spezifischen Bindungsmuster der mAk konnte unter Einbeziehung der Probenvorbereitung in weniger als 10 min, sowohl bei 22 °C als auch bei 37 °C erfolgen. Darüber hinaus war auch der Nachweis von Antikörpern möglich. Untersuchungen zur Sensitivität zeigten, dass die Nachweisgrenze für das Gelbfiebervirus deutlich unterhalb des möglichen virämischen Virustiters einer Gelbfieber-Infektion liegt. Bezüglich der Messbedingungen konnten der pH-Wert, die Ionenstärke, das Puffersystem sowie die Konzentration der mAk und des Virus als beeinflussende Faktoren für den Virus-Nachweis identifiziert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Spezifität bzw. Funktionalität der mAk neben den Messbedingungen auch vom Messsystem abhängig ist. Insgesamt zeigt die Arbeit, dass mit der SCORE-Technologie eine schnelle, robuste, sensitive, spezifische Messplattform zur Verfügung steht, welche grundsätzlich für die Virusdiagnostik geeignet ist. Unter Berücksichtigung der Weiterentwicklung des verwendeten Prototyps durch die Biometrics GmbH und den damit verbundenen Verbesserungen in Hinblick auf Probenhandhabung und Bedienung, ist die SCORE-Technologie daher prinzipiell als *Point-of-Care-Diagnostik* für Virusinfektionen geeignet.

Abstract

The rapid detection of viral infections is a decisive prerequisite for ensuring a diagnosis and adequate treatment of patients. The "ideal diagnostic test" should be i.a. sensitive, specific, fast, robust, easy to handle, free of sophisticated equipment and cost-effective. This facilitates its broad applicability and opens up the possibility of carrying out the test without a central diagnostic laboratory, e. g. directly at the physician or in the field (point-of-care test). Only reliable diagnostics can ensure that patients are treated efficiently and that appropriate measures are taken to prevent the spread of infectious diseases. Conventional detection methods for diagnostics are time-consuming, cost-intensive, require several sample processing steps, adequate laboratory equipment or trained personnel, which limits their applicability, e.g. also as a point-of-care test. The SCORE technology represents a promising new method for virus diagnostics and point-of-care testing. This optical biosensor method enables label-free real-time analysis of interactions between biomolecules. The present work is based on the assumption that the binding of viruses can be detected via the biosensor functionalized with antibodies. To examine the potential of the SCORE technology for the diagnosis of viral infections human pathogenic viruses (yellow fever, dengue, tick-borne encephalitis and vaccinia viruses) were cultivated and monoclonal antibodies (mAb) were produced on a laboratory scale. In measurements with a SCORE prototype mAb could be identified which were the only ones with a binding or a relevantly stronger signal than the other mAb tested for the corresponding virus. A differentiation of the viruses on the basis of specific binding patterns of the mAb was possible in < 10 min including the sample preparation, at 22 °C as well as at 37 °C. Moreover, the detection of antibodies was also possible. Sensitivity studies showed that the detection limit for the yellow fever virus is well below the possible virus titer during a yellow fever infection. With regard to the measuring conditions, pH value, ionic strength, buffer system as well as the concentration of mAb and virus were identified as influencing factors for virus detection. It was also shown that the specificity or functionality of the mAb depends not only on measuring conditions but also on the measuring system. Overall, the work shows that the SCORE technology provides a fast, robust, sensitive, specific measurement platform that is basically suitable for virus diagnostics. Taking into account the further development of the prototype by Biometrics GmbH leading to improvements with regard to sample handling and operation, the SCORE technology is in principle suitable as point-of-care diagnostics for viral infections.

1 Einleitung

1.1 Infektionskrankheiten

Die Geschichte der Menschheit ist durch Infektionskrankheiten verschiedensten Ausmaßes geprägt. Beispielsweise infizierten sich in den Jahren 1918 - 1920 weltweit schätzungsweise ein Drittel der Weltbevölkerung mit der sogenannten „Spanischen Grippe“ [1]. Diese folgenschwere Influenza-Pandemie forderte neueren Untersuchungen zufolge ca. 50 - 100 Millionen Todesopfer [2].

Nach wie vor zählen Infektionskrankheiten mit ca. 15 Millionen Fällen pro Jahr zu den weltweit häufigsten Todesursachen (> 25 %) [3]. Betroffen sind insbesondere Entwicklungsländer [3] und dort wiederum vor allem Kinder und junge Erwachsene [4], das „Potenzial“ einer Gesellschaft. Wenngleich die Inzidenz von Infektionskrankheiten in den Industrieländern im Laufe des letzten Jahrhunderts zum Teil rückläufig war, lenken diverse weltweite Ausbrüche der jüngsten Vergangenheit erneut den Fokus auf (*re-*) *emerging infectious diseases* [5]. Beispielsweise verursachte das in den Jahren 2014/2015 ausgebrochene Ebola-Virus in mehreren westafrikanischen Ländern über 28000 Infektionen, von denen mehr als 11000 tödlich endeten [6]. Von besonderer Relevanz sind in diesem Zusammenhang auch die Flaviviren (z. B. Zika-, Gelbfieber-, Dengue- und FSME-Viren), da der größte Teil der Weltbevölkerung in Gebieten lebt, in denen diese endemisch vorkommen [7]. So entwickelte sich das 2015/2016 erstmalig in Südamerika aufgetretene Zika-Virus insbesondere in Brasilien zu einer Epidemie, die zum Teil mit schweren Fehlbildungen von Föten einherging [8,9]. Dengue gehört mit jährlich knapp 400 Millionen Infektionen [10] zu den weltweit häufigsten Erkrankungen tropischer und subtropischer Regionen [11]. Aufgrund der regen Reisetätigkeit bzw. der Globalisierung im Allgemeinen verbreiten sich Infektionserreger in kürzester Zeit weltweit und verursachen Ausbrüche und Todesfälle [12,13]. Ohne einen schnellen Nachweis von Infektionserregern oder spezifischen Antikörpern ist eine Diagnostik von Verdachtsfällen und Patienten nicht möglich. Darüber hinaus ist auch für die Einleitung entsprechender Public Health-Maßnahmen und die Überwachung einer Epi- bzw. Pandemie eine schnelle und zuverlässige Diagnostik notwendig [13].

Die in dieser Arbeit vorgestellte SCORE-Technologie bietet grundlegende Voraussetzungen für einen schnellen und sensitiven Nachweis der Interaktion von Biomolekülen. Ob sich diese Technologie für den Einsatz in der Virusdiagnostik eignet, wird in der vorliegenden Arbeit anhand von ersten Untersuchungen gezeigt.

1.2 Flaviviren

1.2.1 Taxonomie

Die Flaviviren gehören zusammen mit den Hepaci- (prominentester Vertreter: Hepatitis C-Virus), Pesti- und Pegiviren zur Familie der Flaviviridae [14]. Benannt wurde diese Familie nach dem Gelbfieberevirus („Prototyp“-Virus), genauer gesagt nach dessen charakteristischem Krankheitsbild, der Gelbsucht (lat. *Flavus*, gelb) [14]. Der Gattung *Flavivirus* werden bisher mehr als 90 Viren zugeordnet, von denen 30 humanpathogen sind [14]. Sie zählen zu den Arboviren (*arthropod-borne*; durch Arthropoden übertragen) [15]. Basierend auf Phylogenie-Analysen viraler Proteine (Abb. 1) können die Flaviviren in durch Zecken übertragene Erreger (z. B. Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus), durch Moskitos übertragene Erreger (z. B. Gelbfieber-, Dengue-, West-Nil-, Japanische Enzephalitis- und Zika-Viren), sowie in eine dritte Gruppe mit unbekanntem Vektor eingeteilt werden [16,17].

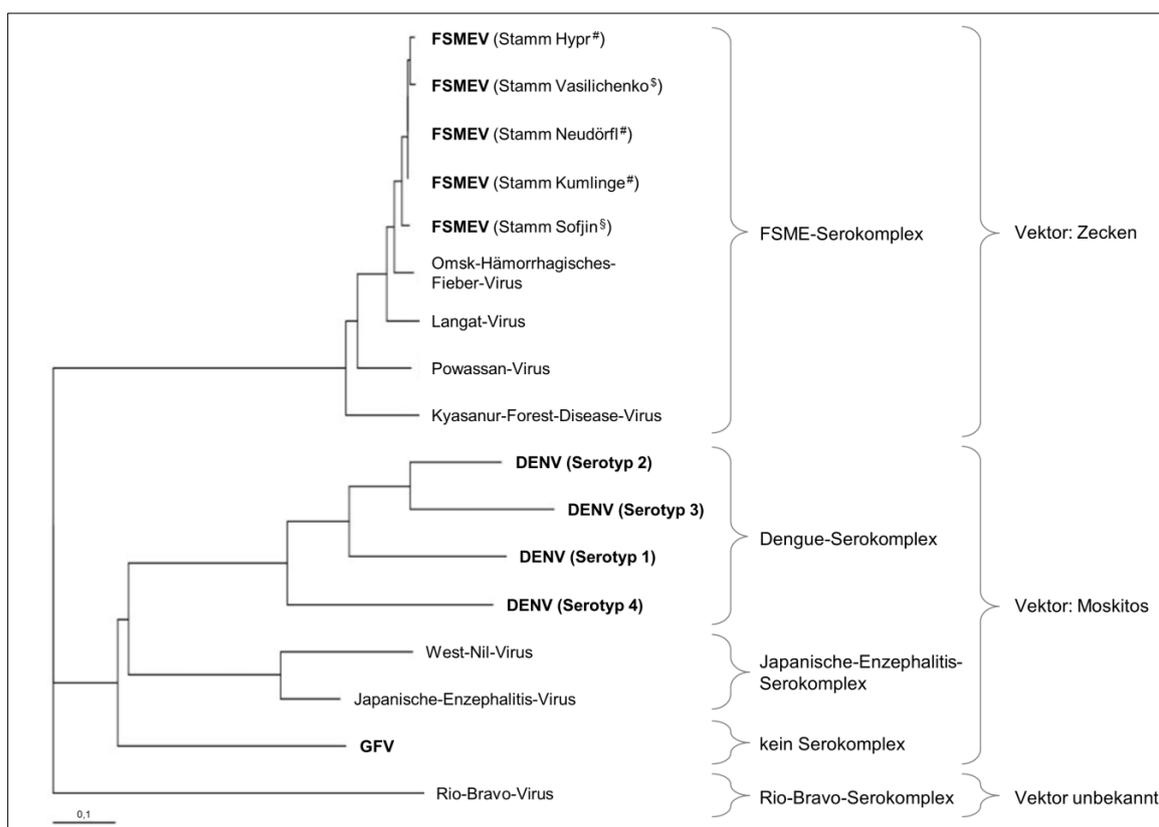


Abb. 1 Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenz des E-Proteins. Zur Analyse wurde die Domäne 3 des E-Proteins betrachtet. FSMEV: Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus, #: Europäischer Subtyp, §: Sibirischer Subtyp §: Fernöstlicher Subtyp, DENV: Denguevirus, GFV: Gelbfieberevirus. (modifiziert nach [16,18,19]).

1.2.2 Virusaufbau und virale Proteine

Bei Flaviviren handelt es sich um sphärische (ikosaedrische), membranumhüllte RNA-Viren, die mit einem Durchmesser von ca. 50 nm zu den kleinsten Vertretern humanpathogener Viren gehören [14,20,21]. Das virale Genom besteht aus einer einzelsträngigen Ribonukleinsäure in Plusstrangorientierung (+/ssRNA) und hat eine Gesamtlänge von ca. 11 kb [22]. Es agiert als infektiöse mRNA und enthält nur einen einzigen offenen Leserahmen, der für ein zusammenhängendes (Vorläufer-)Polyprotein kodiert [14]. Dieses wird im Zuge der Translation durch virale und zelluläre Proteasen in drei strukturelle Proteine (C, E, prM) sowie sieben Nicht-Strukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) gespalten [22]. Die C-Proteine (*capsid*) bilden das Nukleokapsid, welches die RNA umgibt (Abb. 2A). Die Lipiddoppelmembran unreifer Viruspartikel enthält zwei Oberflächenproteintypen, das prM- (*precursor membrane*) und das E- (*envelope*) Protein [23]. Im Zuge der Virusreifung werden die membranassoziierten Vorläuferproteine (prM) gespalten, wobei das M-Protein hierbei in der Membran verankert bleibt. Dieser Prozess hat die Umlagerung der E-Proteine von 60 trimeren Komplexen (unreife Viruspartikel) in 90 Homodimere zur Folge [24–26] und bewirkt somit die Bildung reifer, infektiöser Viruspartikel (Abb. 2B). Nach einer Infektion mit einem Flavivirus oder einer Impfung produziert der Körper zum Schutz virusspezifische Antikörper. Ein Teil dieser Antikörper hat neutralisierende Eigenschaften, von denen einige an das E-Protein binden und somit die Virusanheftung an die Wirtszelle inhibieren [21,27,28]. Daher stellt dieses Oberflächenprotein für die Diagnostik ein interessantes Antigen dar. Für das Dengue-, West-Nil- und FSME-Virus (Abb. 2C) konnte gezeigt werden, dass das E-Protein aus drei verschiedenen Domänen (D_I, D_{II}, D_{III}) und einem Fusionspeptid besteht [29–31] und mit ca. 50 kDa im Vergleich zum M-Protein (ca. 8 kDa) deutlich größer ist [23]. Neutralisierende Antikörper können gegen alle drei Domänen des E-Proteins gerichtet sein, wobei die Domäne D_{III} das überwiegende Epitop darstellt [28]. Die Vertreter der Gattung Flaviviren sind antigenisch eng miteinander verwandt und können verschiedenen Serokomplexen zugeordnet werden (Abb. 1). Viren eines Serokomplexes sind mit ähnlichen Krankheitsbildern assoziiert [7]. Ihre E-Proteine weisen zum Teil homologe Aminosäuresequenzen auf, was zu serologischen Kreuzreaktionen führt [14,21,32].

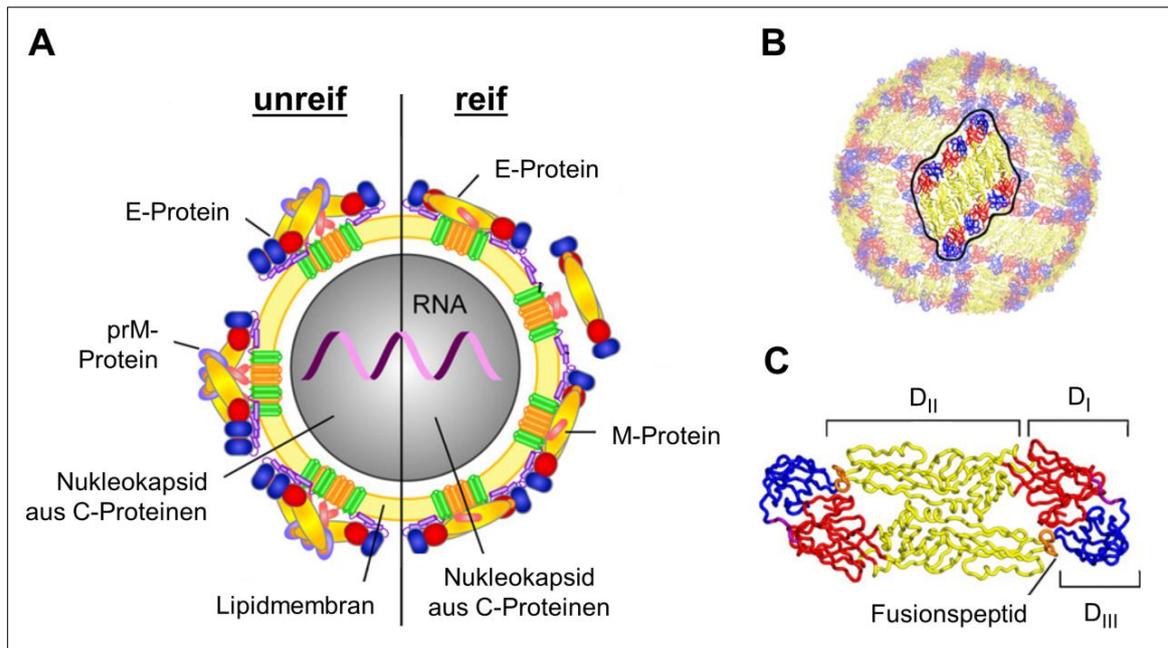


Abb. 2 Schematischer Aufbau eines Flaviviruspartikels. [A]: Das aus C-Proteinen bestehende Nukleokapsid umschließt die virale RNA und ist selbst von einer Lipidmembran umgeben. Auf der „stacheligen“ Oberfläche des unreifen Virions (links) befinden sich 60 Trimer-Strukturen mit Heterodimeren aus prM- und E-Proteinen. Aus dem prM-Protein entsteht während der Virusreifung durch Abspaltung des pr-Anteils das M-Protein, wodurch es zur Reorganisation der E-Proteine in 90 Homodimere kommt. Dies führt beim reifen Virion (rechts) zu einer Glättung der Oberfläche. [B]: Reifes, ikosaedrisches Virion mit 30 membranassoziierten Gruppierungen von jeweils drei parallelen E-Protein-Dimeren (eine Gruppe farblich hervorgehoben). [C]: Kristall-Struktur des löslichen E-Proteins des FSME-Virus, bestehend aus drei unterschiedlichen Domänen. (modifiziert nach [21]).

Das NS1-Protein liegt membranassoziiert auf der Oberfläche infizierter Zellen als Dimer (ca. 46 kDa) [33] oder sezerniert als ca. 11 nm großes Hexamer vor [34]. Es induziert auch die Bildung neutralisierender Antikörper [21]. Neben der Modulation der antiviralen Immunantwort ist das NS1-Protein zusammen mit den anderen Nicht-Strukturproteinen essentieller Bestandteil des viralen Replikationskomplexes [22]. Des Weiteren sind die restlichen Nicht-Strukturproteine u. a. für die Spaltung des synthetisierten Vorläufer-Polyproteins verantwortlich oder agieren im Zuge der Replikation als RNA-abhängige RNA-Polymerase [23]. Sie stellen jedoch keinen Bestandteil des infektiösen, reifen Virions dar [22].

1.2.3 Lokalisation der Viren in der Wirtszelle während ihrer Replikation

Im Zuge der Infektion binden Flaviviren mit ihren E-Proteinen an Rezeptoren der Wirtszelle und induzieren somit ihre Endozytose [21]. Die ins Zytoplasma freigesetzte RNA wird translatiert, wobei sich das naszierende Polyprotein in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) einlagert. Sobald die aus dem Polyprotein gespaltenen Nicht-Strukturproteine vorliegen, kann die Replikation der viralen RNA erfolgen [14]. Der Zusammenbau der unreifen Viruspartikel aus den Strukturproteinen findet in den Zisternen des ER statt [14,23,35]. Nach Reifung der Viren im Golgi-Apparat werden sie in sekretorischen Vesikeln zur Zellmembran transportiert, wo es zur Exozytose kommt [14]. Eine ausführliche Erläuterung des Replikationszyklus der Flaviviren ist der Abbildung 3 zu entnehmen.

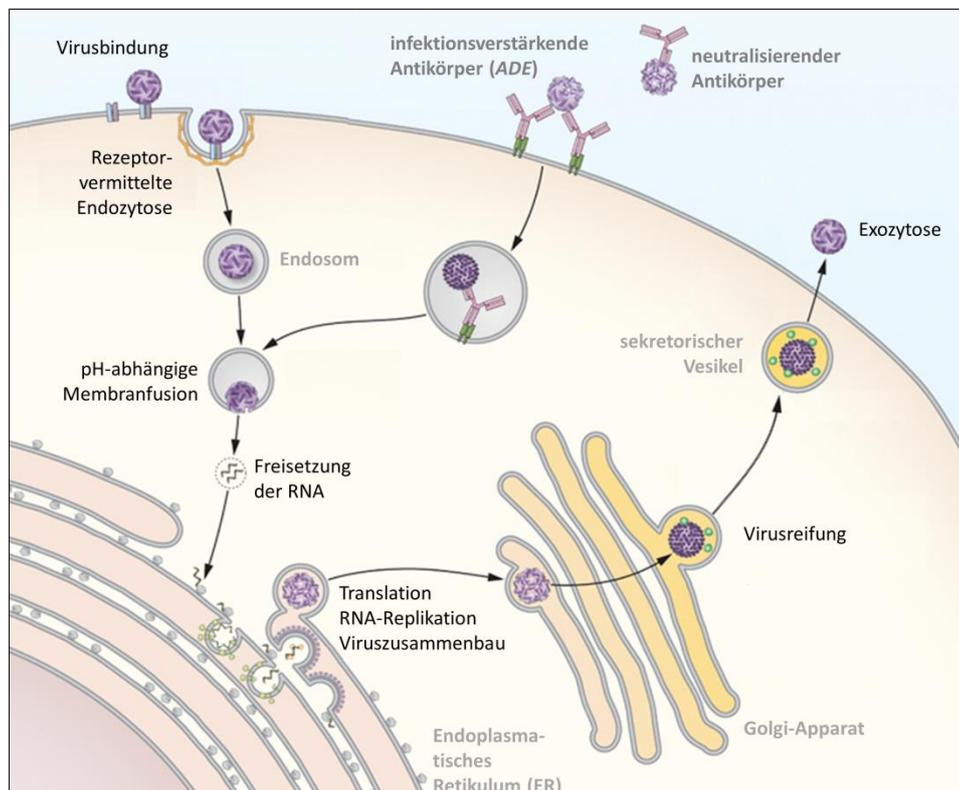


Abb. 3 Schematische Darstellung des Flavivirus-Replikationszyklus sowie der antikörpervermittelten Neutralisierung und Verstärkung der Infektion. Die virale Infektion einer Wirtszelle erfolgt durch Bindung des E-Proteins und die anschließende rezeptorvermittelte Endozytose des Flavivirus [21]. Die Ansäuerung des pH-Wertes ($< 6,6$) im Endosom bewirkt die Umlagerung der E-Proteine von Dimer- zu Trimerstrukturen, wodurch es zur Membranfusion kommt [21]. Daraufhin wird das Nukleokapsid sowie die darin enthaltene virale genomische RNA ins Zytoplasma freigesetzt [35]. Während seiner Translation lagert sich das (Vorläufer-)Polyprotein in die Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Virale und zelluläre Proteasen spalten es in drei Struktur- sowie sieben Nicht-Strukturproteine [35]. Sobald die erforderlichen Nicht-Strukturproteine synthetisiert sind, kann die Replikation des viralen RNA-Genoms im Zytoplasma erfolgen. Der Zusammenbau der noch unreifen Viruspartikel findet in den Zisternen des ER statt [14,23,35]. Die pH-induzierte Reifung erfolgt im Golgi-Apparat. Damit geht die Reorganisation der viralen E-Proteine in Dimere einher [36]. Die infektiösen Viruspartikel werden in sekretorischen Vesikeln zur Zellmembran transportiert und via Exozytose oder durch Zellyse freigesetzt [14]. (Fortsetzung)

Darüber hinaus ist auch die antikörpervermittelte Neutralisierung des Virus sowie das Prinzip der Infektionsverstärkung im Zusammenhang mit einer Sekundärinfektion gezeigt (ADE, *antibody dependent enhancement*). Durch die Bindung mehrerer neutralisierender Antikörper an die viralen E-Proteine wird eine Adhäsion des Virus an die Zellmembran und somit die Infektion der Zelle verhindert. Das Gegenteil bewirken infektionsverstärkende Antikörper, die im Rahmen der Erstinfektion gebildet und im Zuge der Zweitinfektion mit einem ähnlichen Virusserotyp zu schweren Krankheitsverläufen führen [37]. Sie binden das Virus, neutralisieren es jedoch nicht, sondern bewirken dessen verstärkte Aufnahme in die Zelle [21]. (modifiziert nach [38])

1.2.4 Ausgewählte Flaviviren

1.2.4.1 Gelbfiebertviren

Der erste dokumentierte Gelbfiebersausbruch fand 1648 in der Karibik statt [39]. Die geographische Verbreitung erstreckt sich über tropische und subtropische Regionen in Afrika und Südamerika [7,21]. Hauptvektoren sind Moskitos der Gattungen *Aedes* spp., insbesondere *A. aegypti* und *A. albopictus*, und *Haemagogus* spp. [32]. Als Erregerreservoirwirte gelten Affen und Menschen [32,40].

Schätzungsweise treten jährlich 200 000 Fälle auf, von denen etwa 30 000 versterben [41], wobei noch weitaus höhere Inzidenzen vermutet werden. Waggoner et al. diskutiert Literatur, in der von 10 - 250 Gelbfieberinfektionen pro gemeldetem Fall ausgegangen wird [32]. Diese dramatische Unterschätzung der Fallzahlen wird u. a. auf Einschränkungen hinsichtlich der verfügbaren Diagnostikmöglichkeiten, das häufige Auftreten milder Krankheitsverläufe ohne medizinische Versorgung sowie Fälle in entlegenen Regionen ohne Zugang zur medizinischen Versorgung zurückgeführt [32].

Das Krankheitsbild reicht von subklinischen Infektionen über schweres hämorrhagisches Fieber bis hin zum Tod. Im Anschluss an die oft selbst-limitierende, grippeähnliche Infektionsphase gehen ca. 12 % der Patienten [42], nach einer kurzen Remissionsphase, in die lebensbedrohliche Intoxikationsphase über (biphasischer Verlauf; Abb. 4) [7,32]. Diese hämorrhagische Phase geht mit erneutem hohem Fieber, Multiorganversagen sowie der charakteristischen Gelbsucht einher. Auch neurologische Manifestationen samt Krämpfen, Delirium und Koma sind möglich [7]. Innerhalb von 7 - 10 Tagen sterben knapp 50 % der Patienten mit schwerem Verlauf [42,43].

Während der Virämie (Abb. 4), welche 1 - 2 Tage nach Infektion beginnt und unterschiedlich lange andauern kann, sind die Viren in Serum, Plasma und Urin nachweisbar [32]. In Einzelfällen wurde eine Virämiedauer von bis zu 20 Tagen berichtet [44]. Von Domingo et al. werden Virustiter in der virämischen Phase von bis zu 10^8 PFU/ml für Patienten mit einer Gelbfiebervirus (GFV)-Infektion oder unerwünschten GFV-Impfnebenwirkungen diskutiert [45].

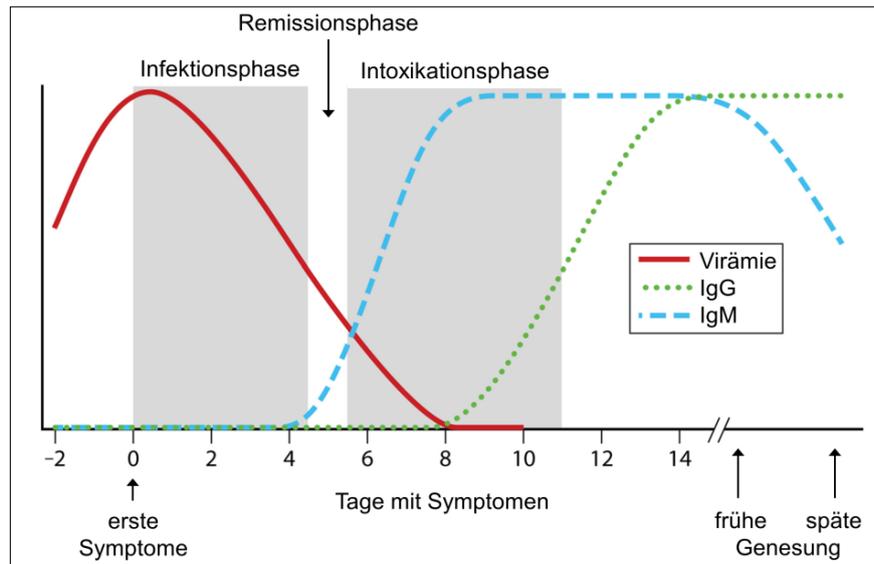


Abb. 4 Schematischer Zeitverlauf einer Gelbfieberinfektion inklusive Virämie. Die Inkubationszeit beträgt durchschnittlich vier Tage [46]. Die Infektionsphase ist meist selbst-limitierend. In seltenen Fällen folgt jedoch nach kurzer Remissionsphase (2 - 48 h) die Phase der Intoxifikation. Die Dauer der virämischen Phase ist unterschiedlich und erstreckt sich bei schweren Krankheitsverläufen sogar über den betrachteten Zeitraum hinaus. GFV-RNA ist im Urin bis zur frühen Genesung nachweisbar. (modifiziert nach [32,47])

Eine antivirale Therapie ist derzeit nicht möglich [43]. Bei dem seit 1937 verfügbaren attenuierten Lebendimpfstoff [21,48] handelt es sich um den GFV_{17D}-Impfstamm [21], welcher aus dem Wildtyp des Gelbfiebervirus (GFV_{Asibi}) durch fortlaufende Passagierung hervorgegangen ist [41]. Bereits eine einmalige Impfung bietet bei der überwiegenden Zahl der geimpften Personen (Schutzrate: 98 %) einen meist lebenslangen Schutz gegen Wildtyp-Infektionen [49,50].

1.2.4.2 Dengueviren

Bereits im Jahre 1779 sind Dengueviren (DENV) im Zusammenhang mit einem Ausbruch in Java beschrieben worden [7,51]. Bhatt et al. gehen von weltweit 390 Millionen Infizierten pro Jahr aus, von denen 96 Millionen erkranken [10]. Damit ist Dengue die häufigste Flavivirus-Infektion mit den global größten Krankheitsauswirkungen [21]. Die Inzidenz hat sich innerhalb von 50 Jahren (1959 - 2009) verdreißigfacht [52]. Die DENV sind in den tropischen sowie subtropischen Regionen Afrikas, Asiens, Ozeaniens, Australiens sowie in Mittel- und Südamerika endemisch, womit schätzungsweise 40 % der Weltbevölkerung in Risikogebieten leben [7]. Die Übertragung findet durch Stechmücken der Gattung *Aedes* spp., insbesondere *A. aegypti* und *A. albopictus*, statt [22,52,53]. Der Mensch stellt das wichtigste Virusreservoir dar [40].

Dengue-Infektionen können nach einer Inkubationszeit von 4 - 10 Tagen zu grippeähnlichen Erkrankungen mit hohem Fieber führen [54]. Das klinische Spektrum reicht von asymptomatisch über eine vergleichsweise milde Form (Dengue-Fieber) bis hin zu schweren Krankheitsverläufen (Dengue-hämorrhagisches Fieber (DHF) und Dengue-Schock-Syndrom (DSS)) mit Todesfolge. Das selbst-limitierende Dengue-Fieber dauert 2 - 7 Tage und geht mit starken Kopf-, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie Erbrechen und einem charakteristischen Hautausschlag einher [7]. Ein geringer Prozentsatz der Patienten entwickelt jedoch das DHF bzw. DSS, die mit einer Mortalitätsrate von bis zu 5 % assoziiert sind.

DENV werden in vier antigenisch unterschiedliche, jedoch eng miteinander verwandte Serotypen (DENV₁₋₄) mit jeweils mehreren Genotypen untergliedert, die zusammen einem Serokomplex angehören [18]. Eine überwundene Dengue-Infektion führt zu einer lebenslangen Immunität gegen den entsprechenden Serotyp [37]. Eine Kreuzimmunität hinsichtlich der anderen DENV-Serotypen besteht jedoch nur für wenige Monate [21,37]. Regionen, in denen verschiedene DENV-Serotypen co-zirkulieren, haben sich in den letzten Jahrzehnten enorm ausgedehnt. Damit einhergehend ist auch die Inzidenz der schweren Krankheitsverläufe (DHF/DSS) dramatisch gestiegen [53], denn eine vorangegangene Infektion mit einem der Serotypen begünstigt bei erneuter Infektion mit einem anderen Serotyp die schweren Verläufe [7]. Ursächlich dafür ist die Antikörper-abhängige Verstärkung der Infektion (*antibody-dependent enhancement* (ADE) Abb. 3). Dieses Phänomen stellt auch eine große Herausforderung bei der Entwicklung eines Dengue-Impfstoffes dar [21]. Eine antivirale Therapie ist bisher nicht verfügbar [37].

1.2.4.3 Frühsommer-Meningoenzephalitis-Viren

Das FSME-Virus umfasst drei humanpathogene Subtypen, den fernöstlichen, den sibirischen sowie den europäischen Subtyp, wozu der in dieser Arbeit verwendete Stamm K23 gehört [55]. Die geographische Verbreitung der erstmalig 1937 entdeckten FSME-Viren [56,57] erstreckt sich über den eurasischen Raum und reicht von Westeuropa über Russland bis nach Ostasien [7], womit es sich mit dem Vorkommen seiner Vektoren, den Zecken der Gattung *Ixodes* spp., deckt [58]. In seltenen Fällen kommt es auch zu einer alimentären Übertragung durch nicht pasteurisierte Milch infizierter Schafe, Ziegen und Kühe sowie den daraus hergestellten Produkten [59]. Als Erregerreservoir gelten Kleinsäugerpopulationen, insbesondere Mäuse, aber auch Vögel, Rehe sowie Rotwild [40]. Die von den FSME-Viren hervorgerufene Frühsommer-Meningoenzephalitis zählt zu den gefährlichsten und mit mindestens 10 000 - 12 000 Fällen pro Jahr zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten des zentralen Nervensystems in Europa und Asien [21,60,61]. In Europa wurde von 1974 bis 2003 ein Anstieg der Inzidenz von über 400 % registriert [62,63]. In Deutschland ist die FSME-Erkrankung mit einer Inzidenz von 0,7 - 2,0 Fällen pro 100 000 Einwohner vor allem im süddeutschen Raum endemisch, wobei 89 % aller Fälle in Bayern und Baden-Württemberg zu verzeichnen sind [64].

Betrachtet man den europäischen FSMEV-Subtyp, so erkranken 2 - 30 % der Infizierten klinisch [57]. Die verbleibenden Patienten weisen einen subklinischen Krankheitsverlauf auf, weshalb Infektionen oft unentdeckt bleiben und von weitaus höheren, tatsächlichen Fallzahlen ausgegangen werden muss. Nach einer Inkubationszeit von 7 - 14 Tagen (in Ausnahmefällen: 2 - 28 Tage) treten meist grippeähnliche Symptome (Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen, leichtes Fieber, Appetitlosigkeit) auf [57,58]. Bei ca. einem Drittel der Patienten folgt im Anschluss an einige symptomfreie Tage eine zweite klinische Phase (biphasischer Verlauf) [57,58,65]. Diese geht mit der Beteiligung des zentralen Nervensystems einher, wodurch eine Meningitis, Meningoenzephalitis oder Meningoenzephalomyelitis auftreten kann [66,67]. Infektionen mit dem europäischen FSMEV-Subtyp verlaufen in der Regel weniger schwerwiegend (Letalität: 1 - 2 %) als Infektionen mit dem fernöstlichen Subtyp (Letalität: 20 - 40 %) [67,68]. Eine spezifische, antivirale Therapie gibt es bisher nicht [60]. Seit 1976 besteht aber die Möglichkeit der Impfung gegen alle Subtypen [58].

1.3 Orthopockenviren

Trotz der erfolgreichen Eradikation der durch Variolaviren verursachten verheerenden Menschenpocken, treten weiterhin zoonotische Infektionen durch z. B. Affen-, Kuh- und Kamelpockenviren sowie Vacciniaviren (VACV) auf [69]. Diese Vertreter gehören zur Gattung *Orthopockenvirus* innerhalb der Familie der *Poxviridae* [40].

VACV führen zu Infektionen mit leichtem Fieber, lokaler Lymphknotenschwellung sowie lokalen pustelförmigen Hautveränderungen [40]. Das VACV stellt das „Prototypvirus“ zur Erforschung der Pockenviren dar [70]. Darüber hinaus wurde es aufgrund des milden Krankheitsverlaufs und der Orthopocken-Kreuzprotektivität [69] als natürlich attenuierter Lebend-Impfstoff zur Eradikation der Menschenpocken verwendet [70].

Beim VACV handelt es sich um ein behülltes, doppelsträngiges DNA-Virus mit einer ziegelsteinförmigen bzw. abgeflacht ellipsoiden, d.h. komplexen Symmetrie [20,70]. Es zählt mit ca. $300 - 310 \times 240 - 250 \times 110 - 140$ nm zu den Größten aller Viren [20,71] und besitzt ein Genom aus 200 kb, das für mehr als 200 Proteine kodiert [72]. Bisher wurden 22 Membranproteine identifiziert [70], u. a. das A27-Protein.

In Bezug auf die Morphologie unterscheidet sich das VACV gegenüber den Flaviviren (ca. 50 nm, ikosaedrisch) damit deutlich hinsichtlich seiner Größe und Form.

1.4 Antikörper

Antikörper, sogenannte Immunglobuline (Ig), spielen eine essentielle Rolle bei der humoralen Immunantwort zur Abwehr von Pathogenen wie Viren, Bakterien, Parasiten und Pilzen [73]. Nach spezifischer Stimulation von B-Lymphozyten durch Kontakt mit körperfremden Substanzen (Antigene) erfolgt die Sezernierung von Antikörpern durch Plasmazellen [74,75].

Humane Antikörper lassen sich in fünf Immunglobulinklassen (Isotypen) unterteilen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM [74]. Während sich IgA-Antikörper in Schleimhäuten sowie externen Sekreten (u. a. Speichel, Muttermilch) befinden und dort z. B. die Anheftung von Viren und Bakterien an die Schleimhautoberfläche verhindern können, ist über die Funktion der IgD-Antikörper, bis auf die Bindung spezifischer bakterieller Proteine, bisher noch wenig bekannt [76]. IgE-Antikörper stehen u. a. im Zusammenhang mit allergischen Reaktionen und werden bei Wurminfektionen gebildet [76]. Bei erstmaligem Antigenkontakt (Primärinfektion) stellen Antikörper der Klasse IgM den dominierenden Ig-Isotyp dar [77]. Diese werden innerhalb von ca. 1 - 7 Tagen [74,77] als früheste Immunglobuline im Verlauf einer Immunantwort gebildet und verdeutlichen somit die akute Infektionsphase einer Erkrankung [76,77]. Demgegenüber werden IgG erst ab ca. 7 Tagen [77] nach einem Wechsel der Immunglobulinklassen [76] gebildet und zirkulieren im Vergleich zu den IgM über längere Zeit [32]. Bei erneuter Infektion (Sekundärinfektion) stellen Antikörper der Klasse IgG den dominierenden Isotyp dar. Ihre Produktion erfolgt sofort auf der Grundlage der B-Gedächtniszellen der Erstinfektion, wobei der maximale Antikörper-Serumtiter den der Primärinfektion um den Faktor 100 - 1000 übersteigt [74,75].

Antikörper der IgG-Klasse stellen mit ca. 75 - 78 % den größten Anteil an Antikörpern im Serum dar [76,77]. Die IgGs unterteilen sich in die vier Subklassen IgG1 - IgG4. Die Bezeichnung der Subklassen 1 - 4 spiegelt hierbei den jeweiligen Mengenanteil im Blutserum wider, wonach die Subklasse IgG1 ca. 67 %, IgG2 ca. 22 %, IgG3 ca. 7 % und die Subklasse IgG4 ca. 4 % der IgG ausmachen [76,77]. Weitere Unterschiede liegen bezüglich der biologischen Eigenschaften vor, wobei die IgG insgesamt an der Pathogen-Neutralisation, Komplementaktivierung sowie der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität beteiligt sind [76]. Gegenüber den anderen Immunglobulinen weisen die IgG-Subtypen mit einer Halbwertszeit von ca. 3 Wochen die größte Stabilität sowie längste Serum-Persistenz auf [77,78].

Die IgG (wie auch IgD und IgE) liegen im Gegensatz zu den IgA (Monomer oder Dimer) und IgM (v.a. Pentamer) als monomere Glykoproteine vor [76]. In der Literatur werden für die IgG1 - 4 in Abhängigkeit der Subklasse 146 - 170 kDa angegeben [77,78] sowie eine Größe von 14,5 nm × 8,5 nm × 4,0 nm diskutiert [79].

Immunglobuline bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken untereinander verbunden sind und oft schematisch als Y-förmige Moleküle dargestellt werden [76,77,80]. Aufgrund der beweglichen Gelenkregion („*hinge region*“) zwischen dem antigenbindenden (F_{ab})- und dem konstanten (F_c)-Fragment [78] weisen Antikörper jedoch eine große strukturelle Flexibilität auf, die weit über die Y-Form hinausgeht [78,80,81].

Während das F_c-Fragment mit anderen Bestandteilen des Immunsystems interagiert, besitzt das F_{ab}-Fragment zwei identische Bindungsstellen (Paratope) für sein spezifisches Epitop (Bindungsstelle des komplementären Antigens) [76]. Ein Paratop ist durch die hypervariablen Enden (*complementarity determining regions*, CDR) der schweren und leichten Kette des Antikörpers gekennzeichnet und bedingt die Spezifität der Bindung des Antikörpers an das Epitop des Antigens [76,77]. Die Paratop-Epitop-Bindung erfolgt hierbei nicht kovalent, sondern kann auf Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen, hydrophoben Wechselwirkungen bzw. Van-der-Waals-Kräften basieren [82,83] und u. a. durch den pH-Wert, die Temperatur sowie die Ionenstärke beeinflusst werden [82].

Während ein individuelles Immunglobulin über seine Paratope folglich eine limitierte Zahl an Antigenen binden kann, können Immunglobuline praktisch gegen eine unbegrenzte Anzahl von Antigenen gebildet werden [76,84].

Diese besondere Eigenschaft der spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung sowie die Stabilität und Serum-Häufigkeit der IgG [76,77,84,85] ermöglichen die Verwendung dieser Immunglobuline als Nachweismolekül in Detektionssystemen wie z. B. *Enzyme immunoassays* (EIA, ELISA), *Immunofluorescence staining* (z.B. IIFT), Immunohistochemie, Western Blot oder der Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie [85]. Die klassische Herstellung von Antikörpern für ihre Verwendung in den genannten Messsystemen wird durch die von Köhler und Milstein entwickelte Hybridom-Technik ermöglicht [86,87]: Es handelt sich hierbei um ein zellbiologisches Verfahren zur Herstellung von Hybridomzellen, die ohne weitere Stimulierung durch das Antigen kontinuierlich Antikörper sezernieren. Hierfür werden *in vitro* zwei Zelltypen derselben Tierart mit unterschiedlichen Eigenschaften fusioniert. Die Fähigkeit zur

Antikörperproduktion erhalten die Hybridomzellen von den B-Lymphozyten, die aus der Milz des zuvor mit dem Antigen der Wahl immunisierten Versuchstieres isoliert wurden. Die Eigenschaft der Unsterblichkeit resultiert von den permanenten B-Zell-Tumorzellen. Die Zellhybride (Hybridomzellen) werden anschließend hinsichtlich der Produktion des gewünschten Antikörpers, z. B. per ELISA oder IIFT, überprüft und selektiert [84]. Die Hybridom-Technik ermöglicht damit, aus dem Gemisch diverser antikörperproduzierender Zellen, deren Antikörper gegen unterschiedliche Epitope gleicher oder verschiedener Antigene gerichtet sind (polyklonale Antikörper), einzelne antikörperproduzierende Hybridomzellen zu isolieren. Somit können monoklonale Antikörper hergestellt werden, die lediglich ein einziges Epitop erkennen.

Auf Basis der Hybridom-Technik war es möglich, monoklonale Antikörper gegen Flaviviren im allgemeinen (α -all-Flavi [88]) sowie gegen das GFV (α -GFV₆₃₃₀, α -GFV₆₅₃₈ [89]), DENV (α -all-DENV, α -DENV₁, α -DENV₂, α -DENV₃, α -DENV₄ [88]), FSMEV (α -FSMEV₇₅, α -FSMEV₁₃₆₇, α -FSMEV₁₄₁₈, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆ [90]) sowie gegen das VACV (VACV_{A1} und α -VACV_{A3} [91]) zu gewinnen. Die Eignung der Antikörper als Nachweismolekül für das GFV, DENV, FSMEV und VACV wurde u. a. mit Messsystemen wie dem IIFT und ELISA gezeigt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper gehören zur (Sub-)Klasse der IgG1 bzw. IgG2 Antikörper (Tab. 9) und sind im Fall der Flaviviren fast ausschließlich gegen das E-Protein [90,92–97] und im Fall des VACV gegen das A27-Protein gerichtet [91].

1.5 Diagnostik von Virusinfektionen

Bessere und umfassend verfügbare Nachweismethoden zur Diagnostik von Virusinfektionen würden die Kontrolle vieler Infektionskrankheiten erleichtern und zur Verbesserung der Identifikation, des Managements und der Surveillance von Krankheitsfällen beitragen [4] sowie die Zahl schwerer Krankheitsverläufe reduzieren [54]. Hierbei ist insbesondere der schnelle Nachweis von Virusinfektionen von entscheidender Bedeutung, um eine Diagnose und eine adäquate Behandlung der Patienten zu gewährleisten.

Der „ideale diagnostische Test“ sollte u. a. sensitiv, spezifisch, schnell, robust, einfach in der Probenhandhabung und den technischen Anforderungen sowie kostengünstig sein [4]. Abhängig von den Eigenschaften eines diagnostischen Tests, kann dieser als *Point-of-Care-Test* angewendet werden. Hierbei handelt es sich um einen diagnostischen Test, der nicht in einem zentralen Diagnostiklabor, sondern z. B. direkt beim Arzt oder „im Feld“

durchgeführt werden kann und dessen Ergebnis innerhalb kürzester Zeit vorliegt. Somit können unmittelbar therapeutische Maßnahmen für den Patienten [4,98] sowie geeignete Vorkehrungen zur Verhinderung einer Ausbreitung der Infektionskrankheit eingeleitet werden. Die Eignung eines diagnostischen Tests für eine *Point-of-Care*-Diagnostik hängt davon ab, in welchem Umfang die oben genannten Eigenschaften eines „idealen diagnostischen Tests“ erfüllt sind.

Konventionelle Methoden der Virusdiagnostik umfassen die Virusanzucht, den Antigen-, den Nukleinsäure- und den Antikörpernachweis [32,99–102]; darüber hinaus stellen auch die Elektronenmikroskopie und histologische Methoden weitere Diagnostikmöglichkeiten dar.

Die Virusanzucht, als eine traditionelle Methode der Virusdiagnostik, ist im Vergleich zu modernen molekularbiologischen Nachweisverfahren zeit- (1 - 2 Tage bis 1 - 3 Wochen), labor- und kostenintensiv und bedarf einer stringenten Probenhandhabung, um die Viabilität des Virus zu erhalten [32,99–102]. Gleichwohl hat die Virusanzucht auch gegenwärtig ihren spezifischen Stellenwert in der Virusdiagnostik, da sie als einzige Methode die Möglichkeit eröffnet, infektiöse Viruspartikel nachzuweisen, zu quantifizieren und Viren für die weitere Charakterisierung zu gewinnen [32,96,99]. Zusätzlich ermöglicht die Virusanzucht einfacher als die anderen genannten Methoden (mit Ausnahme der Elektronenmikroskopie [100]) auch andere, ursprünglich nicht in der Probe vermutete Viren zu identifizieren [99,102].

Der Antigennachweis, z.B. durch *Immunofluorescence staining* (z.B. IIFT), *Immunohistochemical staining* oder *Enzyme immunoassays* (EIA, ELISA) kann innerhalb von 2 - 4 Stunden erfolgen, ist sensitiv, spezifisch und im Multiplex-Ansatz möglich [4,99,100,102]. Der Antigennachweis ist kostengünstiger als die Virusanzucht und insbesondere auch für die Diagnostik von Viren relevant, welche in der Zellkultur langsam wachsen oder labil sind [4,99]. Gleichwohl setzt der Antigennachweis die Markierung des Antigens oder des Detektionsmoleküls und eine entsprechende Laborausstattung voraus.

Die Nukleinsäure-basierte Virusdiagnostik ist hochsensitiv, hochspezifisch, innerhalb von 1 - 4 Stunden möglich und multiplexfähig [4,96,99,100,103]. Jedoch sind die Tests kostenintensiv und setzen eine entsprechende technische Ausstattung, Probenvorbereitung und zur Verhinderung falsch-positiver Resultate einen adäquaten Probenumgang voraus [4,32,101,102]. Die PCR-basierte Virusdiagnostik erlaubt jedoch keine Aussage über die biologischen Eigenschaften des Virus, da nur die Nukleinsäuren detektiert werden [96].

Der serologische Nachweis einer Virusinfektion anhand von Antikörpern, die infolge der Immunantwort auf das Virus gebildet wurden (1.4), stellt eine klassische Methode der Virusdiagnostik dar. Er ist innerhalb von 2 - 3 Stunden möglich und basiert v. a. auf dem Nachweis von spezifischen IgM-, aber auch IgG-Antikörpern [32,99] (1.4). Hierbei finden z. B. der IIFT, der ELISA und der Serum-Neutralisationstest Anwendung [32,102]. Einen relevanten Störfaktor stellen Kreuzreaktivitäten der Antikörper dar [14,21,32]. Da sich die Bindung der spezifischen Antikörper im ELISA und IIFT nicht direkt nachweisen lässt, sind zusätzliche Inkubationsschritte mit markierten Zweit-Antikörpern (α -IgM, α -IgG), welche mit einem Fluorochrom oder Enzym gekoppelt sind, erforderlich.

Die Elektronenmikroskopie stellte ab den 1960er Jahren bis zur Entwicklung molekularbiologischer und genetischer Methoden ein Routineverfahren der Virusdiagnostik dar [100]. Sie zeichnet sich u. a. durch einen „offenen Blick“ auf die Probe aus [100,102], da keine vorherige Selektion (z.B. durch Kultivierung, Primer oder Antikörper) erfolgt. Darüber hinaus ermöglicht die Elektronenmikroskopie eine schnelle Analyse „unreiner“ Proben [100]. Diesen Vorteilen stehen eine geringere Sensitivität und Spezifität als die der oben genannten Verfahren und die anspruchsvollen, kostenintensiven technischen Voraussetzungen gegenüber [100–102].

Insgesamt sind die beschriebenen konventionellen diagnostischen Tests somit zum Teil zeitaufwendig, kostenintensiv, erfordern mehrere Probenbearbeitungsschritte, eine adäquate Laborausstattung oder geschultes Personal. Keine der beschriebenen Diagnostikmethoden vereinigt alle Eigenschaften für einen optimalen Test bzw. *Point-of-Care-Test*. Eine vielversprechende Methode für die Virusdiagnostik und den möglichen Einsatz als *Point-of-Care-Test* stellen Biosensor-basierte Technologien dar [101,104].

1.6 Biosensor-Technologie

Biosensoren finden u. a. im Bereich der Medizin, Wirkstoffentwicklung, Biotechnologie, Lebensmittelindustrie und der Umweltüberwachung Anwendung [104]. Sie bestehen aus einer sensitiven, selektiven Schicht und einem *Transducer* [104,105]. Bei der Interaktion eines Analyten mit der sensitiven Schicht erfolgt mit Hilfe des *Transducers* die Umwandlung der Änderung einer physikalischen Größe in ein messbares Signal [105,106]. Bei den Biosensor-Technologien können optische, elektrochemische, thermometrische, piezoelektrische und magnetische Signalübertragungsprinzipien unterschieden werden [104].

1.6.1 Optische Biosensoren

Optische Biosensoren zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und Sensitivität, ein kleines Format sowie Kosteneffektivität aus und stellen die häufigste Variante der Biosensoren dar [104]. Abhängig von der Fragestellung kann die sensitive Schicht z. B. aus Antikörpern bestehen, wobei der Analyt das entsprechende Antigen darstellt und *vice versa* [104]. Alternativ können z. B. auch Enzyme, Rezeptoren und Nukleinsäuren als sensitive Schicht fungieren [104]. Optische Biosensoren lassen sich in markierungsbasierte und markierungsfreie Verfahren unterteilen [104]. Der markierungsfreie, direkte Nachweis biologischer Substanzen bietet hierbei Vorteile gegenüber den klassischen Endpunkt-Analysemethoden (z. B. IIFT, ELISA) und den markierungsbasierten optischen Biosensor-Technologien, da auf die Markierung verzichtet und somit Arbeitsschritte, Kosten und Zeit gespart werden können.

Als derzeit vorherrschend für die optische markierungsfreie Interaktionsanalyse von Biomolekülen ist die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance* (SPR)) zu nennen [104]. In Bezug auf die Virusdiagnostik konnte mittels SPR u. a. gezeigt werden, dass prinzipiell die Detektion von einzelnen Viruspartikeln und Antikörpern möglich [107–110] ist. Gleichwohl ist die SPR durch Eigenschaften gekennzeichnet, die ihre Anwendbarkeit als diagnostische Methode bzw. *Point-of-Care*-Test einschränken. So wird die sensitive Schicht auf einem kostenintensiven Sensorchip (vergoldeter Glasträger) immobilisiert. Darüber hinaus ist sie sehr empfindlich gegenüber Temperaturänderungen, was eine entsprechende technische Ausstattung des Messgerätes notwendig macht [111,112]. Eine Alternative stellt die neuartige *Single Colour Reflectometry* (SCORE)-Technologie dar.

1.6.2 SCORE-Technologie

Bei der vom Kooperationspartner Biometrics GmbH entwickelten SCORE-Technologie, auch als 1-lambda Reflektometrie bezeichnet, handelt es sich um eine neue optische Messmethode zur markierungsfreien Echtzeitanalyse von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen [112]. Die SCORE-Technologie basiert auf der reflektometrischen Interferenzspektroskopie (RIFS) [112]. Sie macht sich die Interferenz von „quasi-monochromatischem“ Licht an den Schichtgrenzen des Biosensors zunutze und detektiert die Änderung der optischen Schichtdicke infolge eines Bindungsereignisses [105,106].

Die Grundlage bildet ein transparenter Biosensorchip, welcher auf der Vorderseite mit einer sensitiven Schicht versehen ist [105,106]. Diese Schicht kann z. B. aus immobilisierten monoklonalen Antikörpern (mAk) bestehen, welche als Liganden dienen. Die Rückseite des transparenten Biosensors wird mit „quasi-monochromatischem“ Licht bestrahlt (LED), welches an den beiden Grenzschichten „Chip/sensitive Schicht“ und „sensitive Schicht/Puffer“ zum Teil reflektiert wird (Abb. 5A) [105,106]. Im Fall der Bindung von Biomolekülen (z. B. Antigenen) an die sensitive Schicht (z. B. Antikörper) erhöht sich dort die optische Schichtdicke [105,106]. Diese stellt das Produkt aus der physikalischen Schichtdicke „d“ und dem Brechungsindex „n“ dar [112]. Die Schichtdickenerhöhung aufgrund des Bindungsereignisses resultiert in einer verstärkten Reflexion an der zweiten Grenzschicht („sensitive Schicht/Puffer“) (Abb. 5B). Dies führt zu einer veränderten Interferenz beider reflektierten Lichtstrahlen, was wiederum zu einer Änderung der Intensität des insgesamt reflektierten Lichtes führt (Abb. 5C). Letzteres wird von einer Photodiode bzw. CCD-Kamera detektiert [105]. Die zeitaufgelöste Erfassung der Intensitätsänderung des reflektierten „quasi-monochromatischen“ Lichtes ermöglicht somit die direkte Analyse von Interaktionen zwischen Biomolekülen in Echtzeit (Abb. 5D). Die SCORE-Technologie erlaubt es, verschiedene Liganden auf einem Biosensor zu immobilisieren und somit parallel verschiedene Analyt/Ligand-Interaktionen zu untersuchen.

Wie oben beschrieben, bedarf die SCORE-Technologie keiner Markierung des Analyten oder Liganden. Somit können mögliche Einflüsse der Markierung auf das Bindungsverhalten des Analyten oder Liganden ausgeschlossen werden [111]. Gegenüber konventionellen Methoden der Virusdiagnostik wie z. B. ELISA entfallen folglich aufwendige Arbeitsschritte und die Notwendigkeit weiterer Markierungsreagenzien, was zu einer Kosten- und Zeitersparnis führt [106,111]. Darüber hinaus werden die

Interaktionen zwischen Biomolekülen mit der SCORE-Technologie in Echtzeit erfasst, sodass Messergebnisse innerhalb von Minuten vorliegen.

Gegenüber der SPR ergeben sich in Hinblick auf die Temperaturempfindlichkeit und Verbrauchsmaterialien wesentliche Unterschiede. So wird die bei der SCORE-Technologie erfasste optische Schichtdicke ($n \times d$) nahezu nicht durch die Temperatur beeinflusst, da sich beide Größen (n , d) bei Temperaturänderungen gegenläufig verhalten [105,111,112]. Außerdem bestehen die Biosensorchips aus Glas oder Plastik, womit die Verbrauchsmaterialien günstiger als bei der SPR sind [106].

Insgesamt weist die SCORE-Technologie damit gegenüber konventionellen Methoden der Virusdiagnostik und alternativen optischen Biosensortechnologien entscheidende Vorteile auf, was sie zu einer vielversprechenden neuen Methode für die Virusdiagnostik macht.

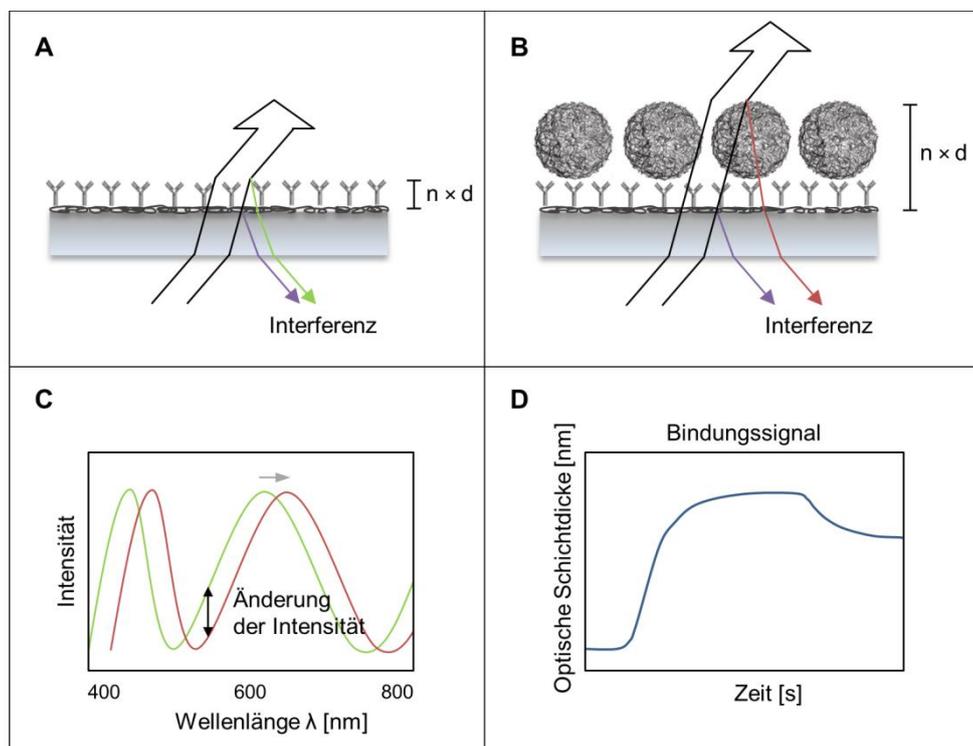


Abb. 5 Prinzip der SCORE-Technologie. [A]: Die Rückseite des transparenten Biosensors wird mit „quasi-monochromatischem“ Licht bestrahlt. An den Grenzschichten „Chip/sensitive Schicht (z. B. Antikörper)“ (violetter Pfeil) und „sensitive Schicht/Puffer“ (grüner Pfeil) wird das Licht zum Teil reflektiert. [B]: Infolge der Bindung des Analyten (z. B. Viren) an die sensitive Schicht erhöht sich die optische Schichtdicke (Produkt aus physikalischer Schichtdicke „d“ und Brechungsindex „n“). Die Schichtdickenerhöhung führt zu einer verstärkten Reflexion an der Grenzschicht „sensitive Schicht/Puffer“ (roter Pfeil). Dies resultiert in einer veränderten Interferenz beider reflektierten Lichtstrahlen. [C]: Dadurch kommt es zu einer Änderung der Intensität des insgesamt reflektierten Lichtes. [D]: Die zeitaufgelöste Erfassung der Intensitätsänderung des reflektierten Lichtes ermöglicht die direkte Analyse von Interaktionen zwischen Biomolekülen in Echtzeit. (erstellt nach [106,112])

1.7 Zielsetzung

Konventionelle Nachweismethoden zur Diagnostik von Virusinfektionen sind u. a. zeitaufwendig, kostenintensiv, erfordern mehrere Schritte der Probenbearbeitung, geschultes Personal sowie eine adäquate Laborausstattung, was deren Anwendbarkeit, z. B. auch als *Point-of-Care-Test*, einschränkt. Eine vielversprechende neue Methode für die Virusdiagnostik und den möglichen Einsatz als *Point-of-Care-Test* stellt die Biosensorbasierte SCORE-Technologie dar. Da diese optische Methode die markierungsfreie Echtzeitanalyse von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen erlaubt, wird sie in der vorliegenden Arbeit auf ihre Verwendbarkeit als eine Virus-Nachweismethode untersucht.

Als Probenmaterial sollen hierfür zunächst verschiedene relevante humanpathogene Viren sowie geeignete Antikörper für den Virusnachweis bereitgestellt werden. Die Antikörperauswahl soll sich hierbei an der mit anderen Methoden nachgewiesenen Eignung für den Virusnachweis orientieren.

Hierbei soll untersucht werden, inwieweit die Bindung der Viren an die Antikörper mit dem neuartigen Biosensor detektierbar ist. Auf Biosensor-Chips immobilisierte Antikörper sollen mit verschiedenen Viruspräparationen auf ihre Bindungseigenschaften bezüglich Spezifität und Sensitivität getestet werden. Sofern ein entsprechender Virusnachweis möglich ist, sollen die Messbedingungen evaluiert und optimiert werden. Darüber hinaus wäre dann zu prüfen, ob die Detektion der Viren auch in komplexen Proben (z. B. humanem Blutserum) möglich ist.

In Ergänzung zu den Analysen mit der SCORE-Methode sind Untersuchungen mit einer anderen Nachweismethode vorzunehmen, um die erzielten Ergebnisse in Hinblick auf die Antikörperauswahl und den Virusnachweis vergleichen und bewerten zu können.

Ziel der Arbeit ist die Klärung der Frage, ob mittels der SCORE-Technologie ein markierungsfreier Nachweis von spezifischen Virus-Antikörperbindungen für den Einsatz in der Virusdiagnostik möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien des täglichen Laborbedarfs wurden nicht gesondert aufgeführt.

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und kommerzielle Reaktionsansätze

Tab. 1 Geräte

Gerät	Spezifikation	Hersteller
Analysenwaage	RC 210P	Sartorius, Göttingen, DE
Bioreaktor	Taumelrotationskammer	Geske & Kretschmar GbR, Berlin, DE
Prototyp	SCORE-Prototyp, inkl. leistungsstarkem PC	Biometrics, Tübingen, DE
Elektronenmikroskop	Tecnai 12 Biotwin	FEI, Hillsboro, US
Fluoreszenzmikroskop	EUROStar II	EUROIMMUN, Lübeck, DE
Fraktionssammler	Pharmacia FRAC-100	Amersham Biosciences AB, Uppsala, SE
Homogenisator	SpeedMill PLUS	Analytik Jena, Jena, DE
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	LSM 780 <i>confocal microscope</i>	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Laborofen	MINO/30	Genlab LTD, Widnes, GB
Lichtmikroskope	Primovert; Axiovert 40 C	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Pumpe (Antikörper-Aufreinigung)	Gilson minipuls 2	Abimed, Langenfeld, DE
Pumpe (Biosensor-Technologie)	REGLO Digital 2-Ch 8-R Var-Speed	Ismatec, Wertheim, DE
<i>Real-Time</i> PCR System	ABI 7500	Applied Biosystems, Foster City, US
	CFX 96	Bio-Rad, München, DE
Spektralphotometer	NanoDrop 1000	PEQULAB Biotechnologie, Erlangen, DE
<i>Titerplane</i>	-	EUROIMMUN, Lübeck, DE
Ultraschallgerät	<i>Ultrasonic Cleaner</i> , Modell 1510	Branson, Danbury, US
UV-Crosslinker	Stratalinker [®] , Modell 2400	Stratagene, La Jolla, US
Vakuuexsikkator	DURAN [®] , Ø 300 mm	DWK Life Sciences, Wertheim, DE
Vakuumpumpe	Membranpumpe, Typ MP 201 E	Ilmvac, Ilmenau, DE

Tab. 2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Spezifikation	Bezugsquelle
Affinitätschromatographie-Säule	HiTrap Protein G HP, 5 ml	GE Healthcare, Little Chalfont, GB
Biosensor-Chip	75 × 25 × 1,1 mm, Glas, einseitig beschichtet	Biometrics, Tübingen, DE
Dialyseschlauch	VISKING, MWCO 12-14K, Porengröße: 25 Å, Ø 21 mm	Serva, Heidelberg, DE
Flaschenaufsatzfilter	Rapid-Flow TM , SFCA-Membran, 0,2 µm bzw. 0,45 µm	Nalgene, Rochester, US
Mikrotiterplatte	24- und 96-Kavitäten MaxiSorp TM -Mikrotiterplatte	Nunc, Roskilde, DK
quadriPERM [®] -Platten	4 × 12	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Stickstoff	Gas, Stickstoff 5.0	Linde, Pullach, DE
Zellkulturflaschen	Nunclon TM Surface; 25 cm ³ , 75 cm ³ , 175 cm ³	Nunc, Roskilde, DK
Zentrifugen-Filtereinheiten	Amicon [®] Ultra 15 ml, 100 kDa	Merck Millipore, Burlington, US

Tab. 3 Kommerzielle Reaktionsansätze

Produkt	Bezugsquelle
AgPath-ID TM One-Step RT-PCR Kit	Applied Biosystems, Foster City, US
Anti-FSME-Viren-IIFT	EUROIMMUN, Lübeck, DE
Anti-Gelbfieber-Viren-IIFT	EUROIMMUN, Lübeck, DE
IIFT: Flaviviren-Mosaik 1 (IgG)	EUROIMMUN, Lübeck, DE
PureLink [®] Viral RNA/DNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden, DE
QIAamp Viral RNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, DE

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Gebrauchslösungen

Tab. 4 Chemikalien und biologische Agenzien

Substanz	Bezugsquelle
10 × Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Aceton (≥ 99,5 %)	Sigma-Aldrich, München, DE
Aceton (wasserfrei, ≥ 99,8 %)	Sigma-Aldrich, München, DE
BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion V)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, DE
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat Hydrat, ≥ 98 %)	Sigma-Aldrich, München, DE
CMC (Carboxymethylzellulose)	Fluka, Buchs, CH
DCPEG (Dicarboxy-Polyethylenglykol, 2000 Da)	Rapp Polymere, Tübingen, DE
DIC (N,N'-Diisopropylcarbodiimid)	Sigma-Aldrich, München, DE
Dichlormethan	Sigma-Aldrich, München, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, DE
DMEM-Pulver (high glucose)	Life Technologies, Darmstadt, DE
DMF (N,N-Dimethylformamid)	Sigma-Aldrich, München, DE
DMF (N,N-Dimethylformamid, H ₂ O < 0,01 %)	Sigma-Aldrich, München, DE
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt, DE
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe, DE
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, München, DE
Eisessig (Essigsäure, 100 %)	Merck, Darmstadt, DE
Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
FKS (Fötale Kälberserum)	PAA, Cölbe, DE
Fluoroshield™ Mounting Medium (mit DAPI)	Sigma-Aldrich, München, DE
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glutaraldehyd (für TEM)	Sigma-Aldrich, München, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
GOPTS (3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan)	Sigma-Aldrich, München, DE
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Merck, Darmstadt, DE
Humanes Blutserum (ohne Flaviviren oder Antikörper gegen Flaviviren)	RKI, Berlin, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Leibovitz-15-Pulver	Life Technologies, Darmstadt, DE
L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt, DE
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, München, DE
Naphthol-Blauschwarz	Sigma-Aldrich, München, DE
Natriumacetat (wasserfrei)	Merck, Darmstadt, DE
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, DE
NHS (N-Hydroxysuccinimid)	Sigma-Aldrich, München, DE
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, DE
PCR-Wasser	Fluka, Buchs, CH
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe, DE
RPMI 1640-Pulver	Life Technologies, Darmstadt, DE
SDS (Natriumlaurylsulfat)	Sigma-Aldrich, München, DE
β-Propiolacton	Ferak, Berlin, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DE
Trizma® base	Sigma-Aldrich, München, DE
Tween® 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Urea	Sigma-Aldrich, München, DE

Tab. 5 Puffer und Gebrauchslösungen

Name	Zusammensetzung
Bindungspuffer	20 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,0
CMC-Medium	1,6 g CMC auf 100 ml Zellkulturmedium (ohne Zusätze)
DCPEG-Lösung	4 mg/ml DCPEG in Dichlormethan
Einfriermedium	90 % FKS, 10 % DMSO
Elutionspuffer	0,1 M Glycin-Puffer, pH-Wert 2,7
Formalin	3,7 % Formaldehyd in PBS
Glutaraldehyd-Lösung	2,5 % Glutaraldehyd, 0,05 M HEPES, pH-Wert 7,2
HEPES	10 mM HEPES, pH-Wert 7,4
MOPS	25 mM MOPS, pH-Wert 6,0, 7,2, 7,4, 7,6
MOPS-NaCl	25 mM MOPS, 150 mM NaCl, pH-Wert 7,4
MOPS-Tween	25 mM MOPS, 0,05 % Tween [®] 20, pH-Wert 6,0
MOPS-Urea	25 mM MOPS, pH-Wert 6,0, 3 M oder 6 M Urea
Naphthol-Blauschwarz-Lösung	1 g Naphthol-Blauschwarz, 13,6 g Natriumacetat (H ₂ O-frei), 60 ml Eisessig, ad 1 l ddH ₂ O
Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	20 % PFA, 0,5 M HEPES, pH-Wert 7,2
PBS	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 0,24 g KH ₂ PO ₄ , 0,1 g CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0,1 g MgCl ₂ ·6H ₂ O, ad 1 l ddH ₂ O, pH-Wert 7,2
PBS -/-	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 0,24 g KH ₂ PO ₄ , ad 1 l ddH ₂ O, pH-Wert 7,2
PBS-Tween	0,2 % Tween [®] 20 in PBS, pH-Wert 7,2
Phosphatpuffer	10 mM Phosphatpuffer, pH-Wert 7,4
Tris-Puffer	1 M Trizma [®] base, pH-Wert 9,0

Alle Puffer wurden vor Verwendung durch Filtration (0,2 µm) oder Autoklavieren sterilisiert.

2.1.3 Zellen, Viren und Antikörper

Tab. 6 Zelllinien

Zelllinien	Ursprung	Zellkulturmedium / Zusätze	Quelle
PS	Schwein (<i>Sus scrofa</i>), Nierenzellen	L-15 / 5 % FKS, 2 mM L-Glutamin	RKI, Berlin, DE
Vero E6	Äthiopische Grünmeerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>), Nierenepithelzellen	DMEM / 10 % FKS (für TEM: 1 %), 2 mM L-Glutamin	ATCC, CRL-1586
Hybridom D1-4G2-4-15	Maus (<i>Mus musculus</i>)	RPMI 1640 / 10 % FKS, 1 % Penicillin- Streptomycin, 2 mM L-Glutamin	RKI, Berlin, DE
Hybridom D3-2H2-9-21	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom HB47	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 3H5-1-21	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom HB49	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 1H10-6-7	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 75-2	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 1367-4	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 1418-2	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 1493-1	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 1786-3	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 6330	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE
Hybridom 6538	s. o.	s. o.	RKI, Berlin, DE

Tab. 7 Zellkulturmedien

Zellkulturmedien	Zusammensetzung	pH-Wert	Bezugsquelle
DMEM	13,3 g DMEM-Pulver, 3,7 g NaHCO ₃ , ad 1 l ddH ₂ O	7,2	RKI, haus eigene Herstellung
L-15	13,86 g L-15-Pulver, ad 1 l ddH ₂ O	7,2	RKI, haus eigene Herstellung
RPMI 1640	10,43 g RPMI 1640-Pulver, 2,0 g NaHCO ₃ , ad 1 l ddH ₂ O	7,2	RKI, haus eigene Herstellung

Tab. 8 Viren

Familie	Gattung	Spezies	Serotyp / Stamm	Abkürzung	Sicherheitsstufe	Quelle
Flaviviridae	Flavivirus	Denguevirus	Serotyp 1 / VR344	DENV ₁	3	RKI, Berlin, DE
			Serotyp 2 / VR345	DENV ₂	3	RKI, Berlin, DE
			Serotyp 3 / VR1256	DENV ₃	3	RKI, Berlin, DE
			Serotyp 4 / VR1257	DENV ₄	3	RKI, Berlin, DE
		FSME-Virus	Stamm K23	FSMEV	3	RKI, Berlin, DE
		Gelbfiebertvirus	Stamm Asibi	GFV _{Asibi}	3	RKI, Berlin, DE
Stamm 17D	GFV _{17D}		2	RKI, Berlin, DE		
Poxviridae	Ortho-pockenvirus	Vacciniavirus	Stamm NYCBH	VACV	2	RKI, Berlin, DE

Tab. 9 Antikörper

Bezeichnung	Spezifikation	Spezies	Isotyp	Zielstruktur	Bezugsquelle
α-all-Flavi mAk	Anti-Flavivirus mAk D1-4G2-4-15	Maus	IgG2a	E-Protein	eigene Herstellung
α-all-DENV mAk	Anti-DENV mAk D3-2H2-9-21	Maus	IgG2a	-	eigene Herstellung
α-DENV ₁ mAk	Anti-DENV 1 mAk HB-47	Maus	IgG1	E-Protein	eigene Herstellung
α-DENV ₂ mAk	Anti-DENV 2 mAk 3H5-1-21	Maus	IgG1	E-Protein	eigene Herstellung
α-DENV ₃ mAk	Anti-DENV 3 mAk HB-49	Maus	IgG1	NS1-Protein	eigene Herstellung
α-DENV ₄ mAk	Anti-DENV 4 mAk 1H10-6-7	Maus	IgG1	E-Protein	eigene Herstellung
α-FSMEV ₇₅ mAk	Anti-FSMEV mAk 75-2	Maus	IgG1	E-Protein	eigene Herstellung
α-FSMEV ₁₃₆₇ mAk	Anti-FSMEV mAk 1367-4	Maus	IgG2b	-	eigene Herstellung
α-FSMEV ₁₄₁₈ mAk	Anti-FSMEV mAk 1418-2	Maus	IgG1	E-Protein	eigene Herstellung
α-FSMEV ₁₄₉₃ mAk	Anti-FSMEV mAk 1493-1	Maus	IgG1	E-Protein	eigene Herstellung
α-FSMEV ₁₇₈₆ mAk	Anti-FSMEV mAk 1786-3	Maus	IgG1	E-Protein	eigene Herstellung
α-GFV ₆₃₃₀ mAk	Anti-GFV mAk 6330	Maus	IgG2a	E-Protein	eigene Herstellung
α-GFV ₆₅₃₈ mAk	Anti-GFV mAk 6538	Maus	IgG2a	E-Protein	eigene Herstellung
α-VACV _{A1} mAk	Anti-VACV mAk A1/40-1	Maus	IgG1	A27-Protein	RKI (Dr. Stern), Berlin, DE
α-VACV _{A3} mAk	Anti-VACV mAk A3/710-20	Maus	IgG2b	A27-Protein	RKI (Dr. Stern), Berlin, DE
Bezeichnung	Spezifikation / Markierung	Spezies	Isotyp	Markierung	Bezugsquelle
α-Maus-FITC Ak	Sekundäntikörper / FITC	Ziege	IgG-gesamt	FITC	Dianova, Hamburg, DE

2.1.4 Enzyme, Primer und Sonden

Tab. 10 Enzyme, Primer und Sonden

Enzyme	Bezugsquelle	
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe, DE	
Platinum Mix	Invitrogen, Karlsruhe, DE	
Platinum [®] Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, DE	
Primer und Sonden	Sequenz	Bezugsquelle
Mollicutes Sonde	FAM-CCATCCATTTgTgCAGCACC-BBQ	TIB Molbiol, Berlin, DE
Mollicutes F	gTCACTAYgCHCAYgTWgAYTg	TIB Molbiol, Berlin, DE
Mollicutes R	ATNTTWggMACHCCHACTTg	TIB Molbiol, Berlin, DE
<i>Mycoplasma Pneumonia</i> R	TCACACTTgTTTAgRAAMACTAC	TIB Molbiol, Berlin, DE
SV5 Sonde	FAM-CTTgATTATCTCCCTgCACCA-MGB	TIB Molbiol, Berlin, DE
SV5 F	gCAGgCTCCTTggTACTCg	TIB Molbiol, Berlin, DE
SV5 R	AATTCTATCTgCCACAgAgTCTgg	TIB Molbiol, Berlin, DE
All Flavi Mix: Flavi all F	TACAACATgATggggAARAgAgARAA	TIB Molbiol, Berlin, DE
Flavi all F2	TACAACATgATggggMAAACgYgARAA	TIB Molbiol, Berlin, DE
Flavi all R4	gTgTCCCAgCCNgCKgTRTCRTC	TIB Molbiol, Berlin, DE
Sonden Mix	HEX-Tg+gTWYATgT+ggYTNg+gRgC-BBQ	TIB Molbiol, Berlin, DE
	HEX-CCgTgCCATATggTATATgTggCTgggAgC-BBQ	TIB Molbiol, Berlin, DE
	HEX-TTCTggAATTTgAAgCCCTgggTTT-BBQ	TIB Molbiol, Berlin, DE
OPV F1	CTgTAGTTATAAACgTTCCgTgTg	TIB Molbiol, Berlin, DE
OPV R1	TTATCATACgCATTACCATTTCgA	TIB Molbiol, Berlin, DE
OPV Sonde	FAM-CTg TAA ACT AAg TAG AgA TTC-MGB	TIB Molbiol, Berlin, DE

F: Forward-Primer, R: Reverse-Primer, SV5: Simian Virus 5, Flavi: Flaviviren, OPV: Orthopockenviren, degenerierte Basen: K = (T/g), N = (A/g/T/C), R = (A/g), W = (A/T), Y = (C/T).

2.1.5 Software

Tab. 11 Software

Programm	Verwendung	Hersteller
EndNote X7	Literaturverwaltung	Thomson Reuters, Philadelphia, US
ImageJ 1.49	Bildverarbeitung	National Institutes of Health, Bethesda, US
MS Office 2010	Tabellenkalkulation / Textbearbeitung / Bilderstellung	Microsoft, Redmond, US
NanoDrop 1000 3.8.1	Proteinquantifizierung	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE
Prism 5.04	Datenauswertung / Statistik	GraphPad Software, San Diego, US
ZEN lite 2012 (blue edition)	Mikroskopie cLSM	Carl Zeiss, Oberkochen, DE

2.2 Methoden

Sämtliche Tätigkeiten erfolgten in den Laboren der Sicherheitsstufe 2 und 3.

2.2.1 Zytologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Vero E6-, PS- und Hybridomzellen (Tab. 6) erfolgte je nach Flaschengröße (25 cm², 75 cm², 175 cm²) in 8 ml, 20 ml oder 40 ml zellspezifischem Medium (Tab. 7) im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit (Standardbedingungen). Die adhärent wachsenden Vero E6- und PS-Zellen wurden bei einer Zellkonfluenz von 80 - 90 % passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS -/- (Tab. 5) gewaschen, durch 5-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA (Tab. 10) bei 37 °C abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und in geeigneter Verdünnung auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Im Fall der Suspensionszellen (Hybridomzellen) wurden die Zellkulturflaschen zum Passagieren für 20 min im Inkubator aufrecht stehen gelassen und der Überstand durch frisches Medium ersetzt. Die resuspendierten Zellen sind im entsprechenden Teilungsverhältnis auf neue Zellkulturflaschen verteilt worden.

Eine PCR-basierte Kontrolle der Zellkulturen hinsichtlich einer Kontamination mit Mykoplasmen sowie dem Simian Virus 5 (SV5) (2.2.7.1) fand während der Kultivierung sowie vor dem Einfrieren der Zellen statt.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese bei einer Konfluenz von ca. 75 - 90 % gewaschen, gelöst, pelletiert (300 × g, 3 min), in Einfriermedium (90 % FKS, 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryogefäßen aliquotiert. Es folgte unverzüglich die Abkühlung auf -80 °C mit einer Kühlrate von 1 °C/min und die anschließende Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Zur Reaktivierung wurde die Kryokultur im 37 °C-Wasserbad aufgetaut und unverzüglich in zellspezifischem Medium verdünnt. Nach Zentrifugation (300 × g, 3 min) wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und entsprechend 2.2.1.1 kultiviert.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:10 in zellspezifischem Medium verdünnt und 10 µl davon auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Nach Auszählung der vier Zählgitter wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Zählgitter mit 10^4 sowie dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert und somit die Zellzahl pro Milliliter berechnet.

2.2.2 Virologische Methoden

2.2.2.1 Virusanzucht und Inaktivierung

Von jedem verwendeten Virus wurde eine Virus-Stammlösung angelegt (Tab. 8). Dazu wurden trypsinierte Vero E6-Zellen, sofern der Virustiter des Inokulats bekannt war, mit einer Infektionsdosis (MOI, *multiplicity of infection*) von 0,01 bis 0,1 infiziert und unter Standardbedingungen kultiviert (2.2.1.1). Parallel zur Virusanzucht in Zellkulturflaschen wurde dieselbe Virus-Zell-Suspension auch auf Objektträgern in quadriPERM[®]-Platten (Tab. 2) kultiviert. Die Objektträger sind regelmäßig lichtmikroskopisch sowie mittels indirektem Immunfluoreszenztest (2.2.5) hinsichtlich des optimalen Zeitpunktes der Virusernte (ca. 80 % infizierte Zellen) beurteilt worden. Zur Virusernte wurden die noch adhären Zellen abgeschabt und die gesamte Zellsuspension zentrifugiert ($1800 \times g$, 5 min). Der Überstand mit den darin enthaltenen infektiösen Viruspartikeln wurde, bis auf wenige Aliquots, inaktiviert. Dies geschah durch Zugabe von β -Propiolacton (1:1000 v/v, Tab. 4) und einer Inkubation über Nacht bei 4 °C sowie anschließend bei 37 °C für 1 h. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung in Aliquots bei -80 °C. Die Aliquots mit aktiven Viruspartikeln dienten für erneute Anzuchten, Plaque-Titrationstests, die Überprüfung der Abwesenheit von Mykoplasmen und SV5, Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen bzw. der Quantifizierung der Genomäquivalente.

2.2.2.2 Plaque-Titrationstest

Zur Quantifizierung zytopathischer Viruspartikel sowie zur Bestätigung der Virusinaktivierung diente der Plaque-Titrationstest. Hiefür wurde eine modifizierte Variante des Protokolls von De Madrid und Porterfield verwendet [113]. In einer 24-Kavitäten-Platte wurden dafür je Kavität 200 µl Zellsuspension (Flaviviren: $6,0 \cdot 10^5$ PS-Zellen/ml; VACV: $1,2 \cdot 10^6$ Vero E6-Zellen/ml) ausgesät. Die infektiöse Virus-Stammlösung wurde dekadisch mit Medium verdünnt und jeweils 200 µl zu den Zellen gegeben. Die inaktivierte Virus-

Stammlösung ist in einer 1:10 und 1:100-Verdünnung eingesetzt worden. Nach einer 4 h-Inkubation im Brutschrank unter Standardbedingungen (2.2.1.1) erfolgte eine vorsichtige Überschichtung mit je 400 µl CMC-Medium je Kavität. Nach einer 96 h-Inkubation im Brutschrank (FSMEV 72 h) wurde der Überstand vorsichtig, ohne den Zellrasen zu beschädigen, abpipettiert. Die Zellen wurden für 20 min mit mindestens 1 ml 3,7 %igem Formalin je Kavität bei Raumtemperatur (RT) fixiert und inaktiviert. Anschließend wurde die Formalin-Lösung abpipettiert, die Zellen mit 200 µl Naphthol-Blauschwarz-Lösung pro Kavität für mindestens 20 min gefärbt und mit Leitungswasser gewaschen. Aufgrund des zytopathischen Effekts entstanden Löcher im Zellrasen, sogenannte Plaques. Diese wurden quantifiziert und der Virustiter [*Plaque Forming Units* (PFU)/ml] entsprechend folgender Formel berechnet [113]:

$$\text{Virustiter (PFU/ml)} = \frac{\sum \text{Plaques der 1. auswertbaren Verdünnung}}{(\text{Verdünnung} * \sum \text{Virusvolumen})}$$

2.2.2.3 Herstellung von Antigenen aus Zelllysate

Entsprechend Ansari et al. [114] sind im Zuge der Virusernte (2.2.2.1) GFV_{17D}-infizierte Zellen vom Zellkulturflaschenboden gelöst, in Medium aufgenommen und pelletiert worden (3000 × g, 10 min, 4 °C). Nach Verwurf des Überstandes wurden die Zellen 3 × gewaschen (Resuspension in 6 ml PBS, Zentrifugation s.o.). Beim 4. Waschschriff erfolgte die Zentrifugation bei 3500 × g. Das Pellet wurde erst in 900 µl PBS mit 0,1 % SDS gelöst und dann mit 100 µl PBS mit 10 % Triton X-100 versetzt. Nach Zugabe von 5 ml PBS folgte eine 1-minütige Homogenisierung in der SpeedMill Plus samt anschließender Zentrifugation (12000 × g, 3 min). Der Überstand mit den Zelllysate-Antigenen wurde mit β-Propiolacton (1:1000 v/v) inaktiviert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Selbiges ist analog auch mit nicht-infizierten Zellen durchgeführt worden.

2.2.3 Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Die Auswahl der mAk basierte auf ihrer mit anderen Methoden nachgewiesenen Eignung für die Detektion des GFV, DENV, FSMEV oder VACV (Flaviviren: α-all-Flavi [88]; GFV_{Asibi} und GFV_{17D}: α-GFV₆₃₃₀, α-GFV₆₅₃₈ [89]; DENV₁, DENV₂, DENV₃ und DENV₄: α-DENV₁, α-DENV₂, α-DENV₃, α-DENV₄, α-all-DENV [88]; FSMEV: α-FSMEV₇₅, α-FSMEV₁₃₆₇, α-FSMEV₁₄₁₈, α-FSMEV₁₄₉₃, α-FSMEV₁₇₈₆ [90]; VACV: α-VACV_{A1}, α-VACV_{A3} [91]).

2.2.3.1 *In vitro*-Produktion

Für die vorliegende Arbeit war die Produktion von hochkonzentrierten mAk-Lösungen (Tab. 9) im Labormaßstab notwendig. Dies erfolgte *in vitro* mittels Hybridomzellen (Tab. 6) in einem Bioreaktor, der sogenannten Taumelrotationskammer (Abb. 6) [115].

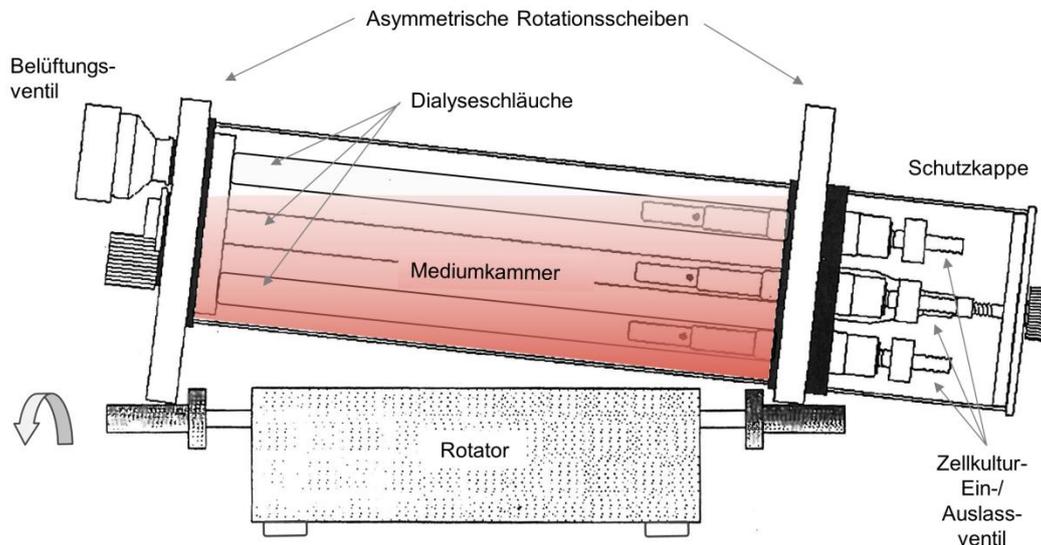


Abb. 6 Taumelrotationskammer (Bioreaktor) für die *in vitro*-Produktion von monoklonalen Antikörpern mittels Hybridomzellen. Über Einlassventile wurden die antikörperproduzierenden Hybridomzellen in Dialyseschläuche gefüllt. Die Zellen sind durch die Dialysemembran mit Nährstoffen aus der Mediumkammer versorgt worden. Das Medium wurde regelmäßig erneuert und aufgrund der rotierenden Bewegung des Bioreaktors belüftet sowie durchmischt. Eine Schutzkappe verhinderte Kontaminationen; Abbildung modifiziert nach [116].

Vorbereitung der Dialyseschläuche

Vor ihrer Verwendung im Bioreaktor wurden die Dialyseschläuche auf 40 cm zugeschnitten und gereinigt. Dazu wurden diese für jeweils 2×1 h in 50 % Ethanol, anschließend in 10 mM NaHCO_3 , dann in 1 mM EDTA und letztlich in Aqua dest. gelegt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung in 20 %igem Ethanol bei 4 °C.

Vorbereitung des Bioreaktors

Der Zusammenbau der Taumelrotationskammer erfolgte entsprechend den Herstellerangaben [116]. Beim anschließenden Autoklavieren (110 °C, 3 h) wurden die Dialyseschläuche gegen Austrocknung mit Aqua dest. befüllt. Als Dekontaminationskontrolle diente ein dreitägiger Testlauf des Bioreaktors mit Medium.

Antikörperproduktion

Zur Antikörperherstellung wurden in jeden Dialyseschlauch 90 ml Hybridomzellen ($1 \cdot 10^6$ Zellen/ml) über Einlassventile gepumpt und die Mediumkammer über die Öffnung des Belüftungsventils mit 1,5 l RPMI-Medium (1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin)

befüllt. Alle zwei bis drei Tage wurde das Zellkulturmedium in der Mediumkammer gewechselt [116]. Die Zellen sind 18 bis 21 Tage in dem Bioreaktor im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und stetiger, langsamer Rotation kultiviert worden. Die rotierende Bewegung des Bioreaktors gewährleistete eine kontinuierliche Medium-Durchmischung und somit optimale Kultivierungsverhältnisse. Im Anschluss an die Kultivierungsphase wurde der Inhalt der Dialyseschläuche zentrifugiert (3000 × g, 20 min) und der antikörperhaltige Überstand 2 × filtriert (1. 0,45 µm, 2. 0,2 µm).

2.2.3.2 Aufreinigung

Die Aufreinigung des Antikörper-Filtrats erfolgte mittels Affinitätschromatographie-Säule (HiTrap™ Protein G Säule) bei einer Flussrate von 1 ml/min. Zu Beginn wurde die Säule gespült (20 ml Ethanol (20 %), dann 15 ml Aqua bidest.), äquilibriert (30 ml Bindungspuffer, Tab. 5) und mit dem Antikörper-Filtrat beschickt. Es folgte das Waschen der Säule mit 30 ml Bindungspuffer und die Elution der Antikörper mit 15 ml Elutionspuffer (Tab. 5). Das Eluat wurde in Reagenzgläsern (mit vorgelegtem Tris-Puffer) mittels Fraktionssammler (Abb. 7) aufgefangen. Die Antikörperkonzentrationen der Eluatfraktionen wurden photometrisch bei 280 nm ermittelt (NanoDrop 1000). Die hochkonzentrierten Fraktionen wurden vereinigt, sterilfiltriert (0,2 µm), erneut quantifiziert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Reinigung der Säule fand mit 15 ml 1 M Essigsäure statt. Anschließend wurde die zuvor beschriebene Prozedur in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt (Bindungspuffer, Aqua bidest., Ethanol) und die Säule bis zu ihrer erneuten Verwendung bei 2 bis 8 °C gelagert.

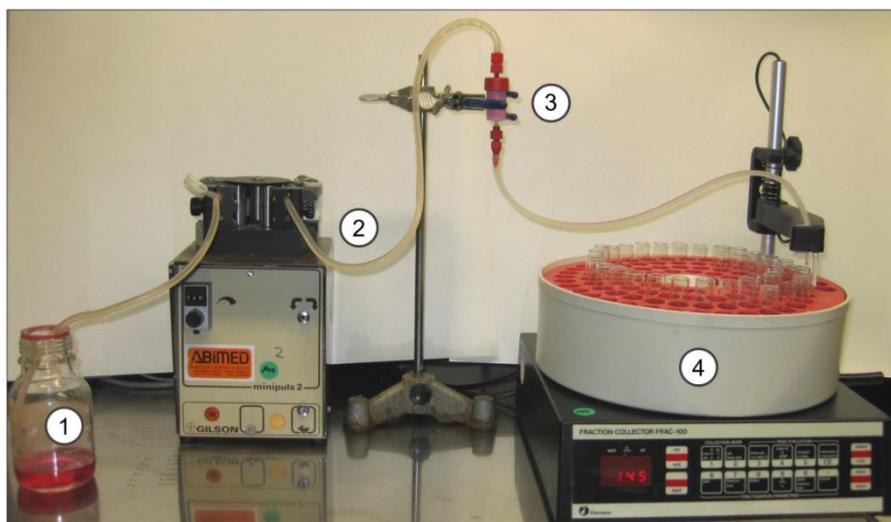


Abb. 7 Apparatur zur Aufreinigung der produzierten Antikörper. Der antikörperhaltige Zellkulturüberstand (1) wurde mittels Pumpensystem (2) über eine Affinitätschromatographie-Säule (3) aufgereinigt. Die verschiedenen Fraktionen sind im Fraktionssammler (4) aufgefangen worden.

2.2.3.3 Umpufferung und Quantifizierung

Für die Kopplung der Antikörper an die Biosensoroberfläche war es nötig, die Antikörper in MOPS-Puffer aufzunehmen. Dazu wurden Zentrifugen-Filtereinheiten (Tab. 2) verwendet. Die Antikörper wurden dabei zum Teil aufkonzentriert und anschließend sterilfiltriert (0,2 µm), bei 280 nm quantifiziert (NanoDrop1000) und in Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.2.4 Markierungsfreie Biosensor-Technologie (SCORE)

Erläuterungen zur grundlegenden Funktionsweise der SCORE-Technologie sind dem Kapitel 1.6.2 zu entnehmen. Als Trägermaterial (*Transducer*) für den Biosensor wurden Glasobjektträger (Biosensor-Chips, 75 × 25 × 1,1 mm; Tab. 2) verwendet, die eine spezifische, einseitige, optische Beschichtung (Seite 1) aufwiesen, wodurch eine optimale Reflektion des Lichtes während der Messung gewährleistet werden konnte.

2.2.4.1 Funktionalisierung der Biosensoroberfläche

Bevor die Fängerpartikel (z. B. Antikörper, Antigene, Virionen) auf dem Biosensor-Chip immobilisiert werden konnten, musste dieser in einem zweitägigen Prozess in Anlehnung an Proll et al. [112] präpariert werden.

Reinigung und Aktivierung

Die Biosensor-Chips wurden für 2 × 10 min in Aceton im Ultraschallbad gereinigt, mit Aceton gespült und mit Stickstoff 5.0 getrocknet. Mit der Seite 1 nach oben inkubierten diese für 1 h im UV-Crosslinker (120 J/cm², 254 nm). Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Silanisierung.

Silanisierung

Direkt nach Entnahme aus dem UV-Crosslinker wurden die aktivierten Oberflächen mit 150 µl GOPTS im Sandwich-Format (zwei Biosensor-Chips mit Seite 1 aufeinander, GOPTS dazwischen) für 1 h bei RT in einer Trockenkammer (mit Zellstofftuch ausgelegte Petrischale) inkubiert. Die Biosensor-Chips wurden anschließend in wasserfreiem Aceton geschwenkt, abgespült, mit Stickstoff 5.0 getrocknet. Unmittelbar im Anschluss erfolgte die Fixierung von DCPEG.

Fixierung von DCPEG

Die Chips wurden in eine Trockenkammer gelegt. Auf Seite 1 jedes Biosensor-Chips wurden 300 µl frisch hergestellte DCPEG-Lösung appliziert und nach dem Antrocknen bei RT über 24 h bei 70 °C im Laborofen inkubiert. Anschließend wurden diese mit lauwarmem Aqua bidest. gewaschen und mit Stickstoff 5.0 getrocknet. Die mit der Oberflächenchemie beschichteten Biosensoren waren nun bei 4 °C in einer trockenen Box lagerfähig.

Aktivierung der Oberflächenchemie

Je Biosensor-Sandwich wurden 100 µl Aktivierungslösung (11,52 mg NHS, 76,77 µl wasserfreies DMF, 23,23 µl DIC) appliziert (zwei Biosensoren mit Seite 1 aufeinander, Aktivierungslösung dazwischen) und in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer für 4 h bei RT inkubiert. Nachfolgend sind die Biosensoren einzeln in wasserfreiem Aceton gewaschen, gespült und mittels Stickstoff 5.0 getrocknet worden. Sofort im Anschluss erfolgte die Immobilisierung der Fängerpartikel. Erst danach wurde der nächste Biosensor bearbeitet.

Immobilisierung von Fängerpartikeln auf dem Biosensor-Chip (*Spotting*)

Als Fängerpartikel dienten mAk (Tab. 9), Zelllysate (2.2.2.3) oder Virionen (Tab. 8). Diese wurden im *Spotting*puffer (MOPS, pH-Wert 6,0, 0,005 % CHAPS) auf die entsprechende Konzentration (sofern nicht anders angegeben: Antikörper: 1 mg/ml; Viren: $1,6 \cdot 10^6$ PFU/ml oder $4,0 \cdot 10^6$ PFU/ml; Zelllysate: 1:5) verdünnt. Innerhalb des Biosensor-Messfeldes (Abb. 8) wurden manuell 0,5 µl der jeweiligen Fängerpartikellösung auf die aktivierte Seite 1 appliziert (sofern nicht anders angegeben: Antikörper: 0,5 µg/Spot; Viren: 800 PFU/Spot). Als Referenz-Spot dienen Biosensorareale, auf denen keine Fängerpartikel immobilisiert wurden (nur *Spotting*puffer). Die Biosensoren inkubierten in einer wasserdampfgesättigten Kammer für 1 h bei RT und anschließend für weitere 24 h bei 4 °C.

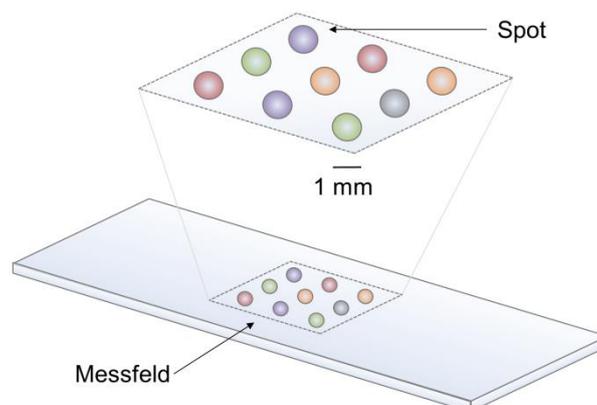


Abb. 8 Schematische Darstellung eines Biosensors für die SCORE-Technologie. Innerhalb des quadratischen Messfeldes befinden sich in Duplikaten applizierte Spots mit jeweils unterschiedlichen Fängerpartikeln (z. B. orange: α -FSEMV mAk, rot: α -GFV mAk, grün: α -DENV mAk, violett: α -VACV mAk, grau: Referenz-Spot).

2.2.4.2 SCORE-Messung mit dem Prototyp

Der Biosensor wurde beidseitig mit *Aqua dest.* gespült, die Seite 2 mit Stickstoff 5.0 getrocknet und mit dieser Seite in Richtung Kamera in die Flusszelle des Prototyps (Abb. 9) eingelegt. Die Flusszelle wurde, wenn nicht anders angegeben, mit einer Flussrate von 150 $\mu\text{l}/\text{min}$ mit Messpuffer oder Messpuffer + Probe durchströmt. Der Messpuffer wurde unmittelbar vor seiner Verwendung im Vakuumexsikkator entgast. Die Messungen fanden bei Raumtemperatur statt, sofern nicht anders angegeben. Um den Einfluss sich ändernder Lichtverhältnisse der Umgebung zu eliminieren, wurden Kamera und Flusszelle während der Messung abgedeckt.

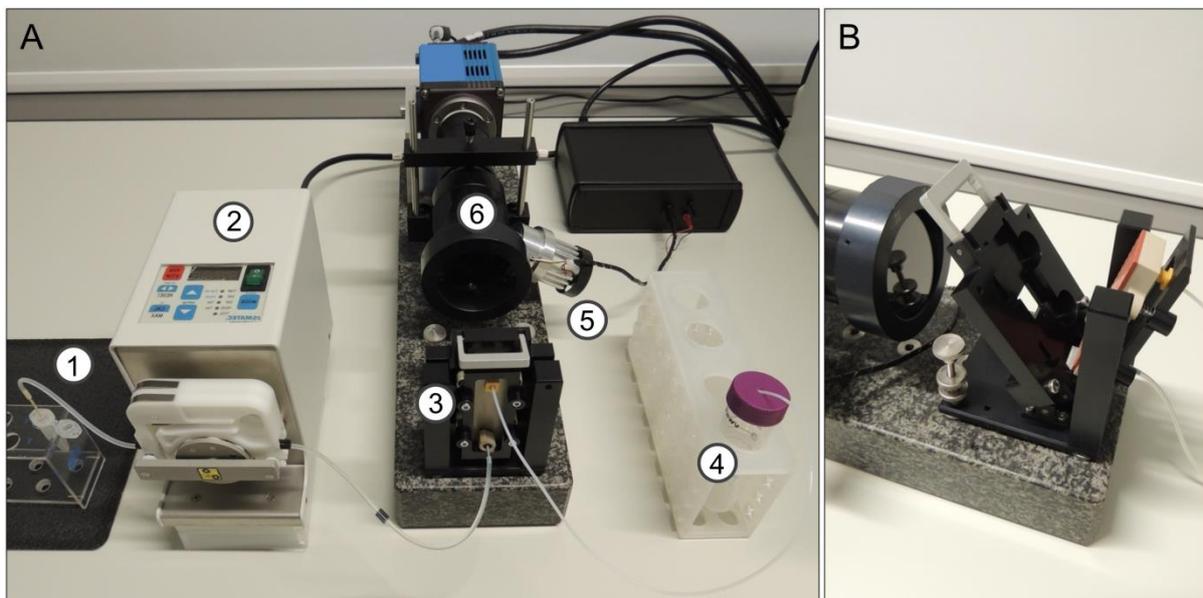


Abb. 9 *bScreen*-Prototyp. [A]: Die Probe (1) wurde mittels Pumpe (2) über den Biosensor in die Flusszelle (3) transportiert und anschließend im Abfallgefäß (4) gesammelt. Hinter der Flusszelle befand sich die LED-Lichtquelle (5), die das Licht durch eine quadratische Öffnung [B] auf die Unterseite (Seite 2) des Biosensors projizierte sowie eine hochsensitive Kamera (6), welche das vom Biosensor reflektierte Licht detektierte. [B]: In die aufgeklappte Flusszelle ist zur Messung ein Biosensor eingelegt (nicht gezeigt) und diese anschließend wieder geschlossen worden. Zwischen der mit Fängerpartikeln funktionalisierten Biosensorseite 1 und der Gummiplatte (rot) wurde der Messpuffer (oder Messpuffer + Probe) transportiert.

Unter Verwendung der mit der Kamera mitgelieferten Software war im Liveview-Modus die Lichtstärke (45000 - 60000 *Arbitrary Unit*, A.U.) sowie die Belichtungszeit (< 10 ms) anhand des Kamerabildes einzustellen. Vor der Probenmessung wurde die Spotqualität auf Beständigkeit (kein Abwaschen von Fängerpartikeln) im Messpuffer mit Hilfe der Software *ImageJ* geprüft. Sobald ein farblich konstantes Kamerabild der Spots erkennbar war (Abb. 10A), womit keine optische Schichtdickenänderung der Spots vorlag (konstante Baseline), wurde die Testmessung beendet und mit der Probenmessung begonnen.

Für die Messung wurde zuerst der Basiswert der optischen Schichtdicke (Baseline) bestimmt, indem das Messfeld mit dem jeweils verwendeten Messpuffer (MOPS, HEPES, MOPS-NaCl, MOPS-Tween, MOPS-Urea, PBS, Phosphatpuffer; Tab. 5) beschickt wurde. Anschließend folgte die Zugabe von 1 ml Probe (1:5 mit Messpuffer verdünnt) samt nachfolgendem Waschschritt mit dem in der Messung verwendeten Messpuffer. Um Luftblasen im System zu verhindern, wurde bei jedem Umsetzen des Schlauches die Pumpe gestoppt. Während der Messung wurde von der Kamera alle 1,5 Sekunden ein Bild des Messfeldes aufgenommen. Diese Bilder bildeten die Grundlage der Auswertung.

2.2.4.3 Auswertung der Messung am Prototyp

Der erste Teil der Auswertung erfolgte mittels *ImageJ*-Programm. Ein Bild am Ende der Probenzugabe (Abb. 10B) wurde mit einem Baseline-Bild (Abb. 10A) ins Verhältnis gesetzt. Daraus ist die Schichtdickenänderung zwischen beiden Bildern berechnet und zur optischen Anschaulichkeit farblich kontrastiert worden (Abb. 10C). Im Weiteren wurden Bildareale, in denen sich die Fängerpartikel befanden (Spots), als *Region of Interest* (ROI) markiert und für jede ROI die Schichtdickendifferenz zwischen dem Baseline-Bild und jedem einzelnen Messbild nach Probenzugabe errechnet.

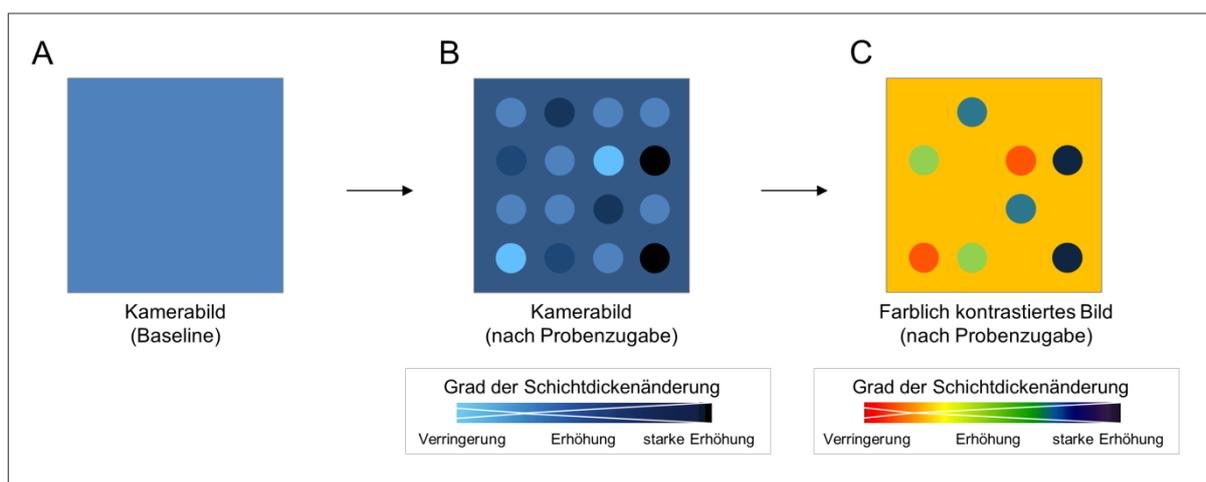


Abb. 10 Schematische Darstellung eines Messbildes während des Auswertungsprozesses. [A]: Die im Messfeld applizierten Spots sind während der Baseline-Messung nicht erkennbar. [B]: Bei Bindung der Probe an die Fängerpartikel der Spots (bzw. des Hintergrundes) erhöht sich die Schichtdicke, welches sich durch Intensivierung der Blauschwarzfärbung zeigt. Keine Bindung führt zu keiner Farbintensivierung. [C]: Zur optischen Hervorhebung der Schichtdickenänderung nach Probenzugabe erfolgte eine farbliche Kontrastierung.

Der zweite Teil der Auswertung erfolgte in Excel anhand der Schichtdickendifferenzen der ROI-Messdaten. Für jeden Zeitpunkt t (alle 1,5 s) ergab sich nach Abzug des Einflusses durch den Hintergrund (Schichtdicke $\text{ROI}_{\text{Fängerpartikel}}$ – Schichtdicke $\text{ROI}_{\text{Referenz}}$) und Eichung auf eine gemeinsame Baseline je ROI eine Bindungskurve. Diese wurde zum besseren Verständnis entlang der X-Achse gespiegelt (Bindungssignale mit -1 multipliziert). Somit führte eine Erhöhung der Schichtdicke durch Bindung von Probenbestandteilen an den Biosensor auch zu positiven Bindungssignalen. Eine Reduktion der Schichtdicke auf dem Biosensor resultierte in einer Verringerung der Bindungssignale (Abb. 11).

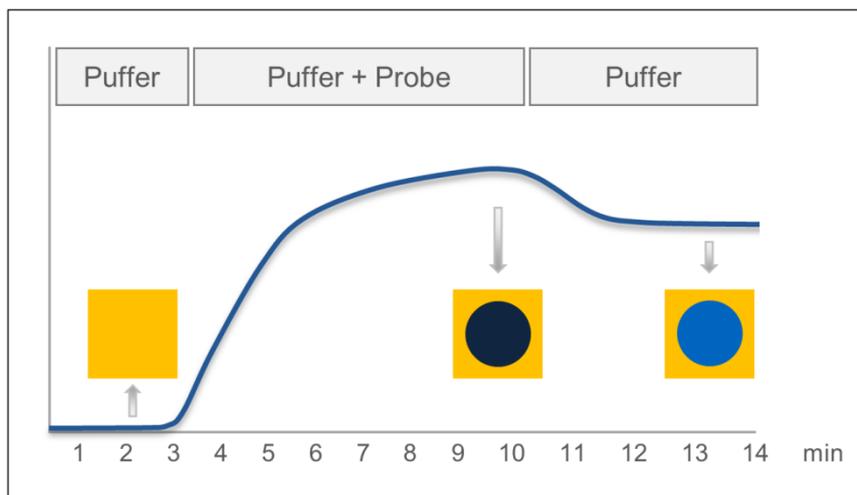


Abb. 11 Schematische Bindungskurve. Während der initialen Messpuffergabe (1. - 3. min) zu dem mit Fängerpartikeln (z. B. Antikörper) beschichteten Biosensor zeigt sich eine konstante Schichtdicke. Nach Probengabe (> 3 min) erhöht sich die Schichtdicke durch Bindung von Probenbestandteilen (z. B. Virionen) an die spezifischen Antikörper, welches sich in einer Verdunklung des ROI und einem daraus berechneten Kurvenanstieg zeigt. Durch Waschen (ab 11. min) mittels Messpuffer löst sich ein Teil der gebundenen Virionen, wodurch es zu einer Abnahme der Schichtdicke kommt. Dies führt zu einer Aufhellung des ROI und resultiert in einer Verringerung der Signalstärke der Kurve.

2.2.5 Serologische Methode: Indirekter Immunfluoreszenztest

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IIFT) diente sowohl der Ermittlung des optimalen Zeitpunktes der Virusernte als auch der Charakterisierung der mAk. Für die Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der Virusernte wurden parallel zur Virusanzucht infizierte Vero E6-Zellen auf vier Objektträgern in quadriPERM[®]-Platten im Brutschrank kultiviert (2.2.2.1) und der Infektionsstatus jeden Tag mittels IIFT geprüft. Für die Charakterisierung der mAk erfolgte die Kultivierung der infizierten Vero E6-Zellen ebenso, jedoch nur über Nacht. Am nächsten Tag wurde nach vollständiger Trocknung des Objektträgers eine 15-minütige Inaktivierung bzw. Fixierung der Zellen in eiskaltem Aceton (99,5 %) durchgeführt. Bis zur Immunfluoreszenz-Färbung konnten die Objektträger bei -20 °C lagern. Zum Teil kamen

auch kommerzielle IIFT-Kits (Tab. 3) zum Einsatz, die entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurden.

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden pro Objektträger-Reaktionsfeld 20 μ l der in PBS verdünnten Primärantikörper (α -VACV_{A1} und α -VACV_{A3}: 100 ng/ml; alle weiteren mAk: 100 μ g/ml; Tab. 9) auf eine *Titerplane* aufgetragen und der Objektträger darauf für 1 h inkubiert (feuchte Kammer, RT). Nach drei Waschschritten mit PBS-Tween (Tab. 5) erfolgte eine 45-minütige Inkubation (feuchte Kammer, RT, Dunkelheit) mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (α -Maus-FITC Ak; 6 μ g/ml; 20 μ l/Reaktionsfeld; Tab. 9). Nach erneutem dreimaligen Waschen und vollständiger Trocknung wurden die Zellen mit 8 μ l *FluoroshieldTM Mounting Medium* und Deckglas fixiert und am Fluoreszenzmikroskop bzw. für die Antikörper-Charakterisierung am hochauflösenden konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop untersucht (cLSM, 2.2.6.1).

2.2.6 Mikroskopische Methoden

2.2.6.1 Immunfluoreszenzmikroskopie am cLSM

Um die mAk zu charakterisieren, wurden Aufnahmen der IIFTs (0) am LSM 780 (Carl Zeiss) erstellt. Die Proben wurden jeweils unter identischen Mikroskop-Einstellungen (Objektiv: PlanApochromat 20 \times /0,8; Anregungswellenlänge 488 nm, Belichtungsstärke 1 %) untersucht. Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels der Software ZEN 2012 (Carl Zeiss).

2.2.6.2 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurde im Fachbereich Spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie (ZBS 4) des RKI durchgeführt. Für die Flavivirus-TEM wurde exemplarisch das GFV_{Asibi} ausgewählt. Dafür erfolgte eine erneute Virusanzucht (2.2.1.1) unter verringerter FKS-Konzentration (1 % FKS). Die bereits per Ultrazentrifugation aufgereinigten VACV waren ohne weitere Arbeitsschritte nutzbar.

Zur hochauflösenden Visualisierung der Flavi- bzw. Vaccinia-Virionen kam die Negativkontrastierung zum Einsatz. Für die Probenvorbereitung wurden 450 μ l der jeweiligen infektiösen Virussuspension mit 50 μ l Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Tab. 5) fixiert und gleichzeitig inaktiviert [117]. Hierfür wurde das Virus-PFA-Gemisch für 24 h bei RT inkubiert. Die PFA-Lösung ist zuvor für mindestens 30 min bei 70 °C depolymerisiert worden.

Darüber hinaus sind Ultradünnschnitte von GFV_{Asibi}-infizierten Vero E6-Zellen angefertigt worden. Dazu fand im Vorfeld eine 1-stündige Fixierung der infizierten Zellen mit einer Lösung aus 2,5 % Glutaraldehyd und 1 % Paraformaldehyd in 0,5 mM HEPES bei RT statt. Die weitere Probenvorbereitung sowie die Untersuchung der Proben mittels TEM erfolgten entsprechend Laue et al. [118].

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 Kontaminationskontrolle auf Mykoplasmen und Simian Virus 5

Die Kontrolle auf Mykoplasmen- bzw. Simian Virus 5 (SV5)-Kontaminationen erfolgte vor dem Einfrieren der Zellen, nach der Virusanzucht sowie regelmäßig während der Zellkultivierung.

Der uninfizierte Zellkulturüberstand sowie die infektiösen Virus-Stammlösungen inkubierten bei 95 °C für 5 min. Letztere mussten zuvor noch hitzeinaktiviert werden (60 °C für 60 min). Die Extraktion der Mykoplasmen-DNA und SV5-RNA erfolgte mittels *PureLink[®] Viral RNA/DNA Mini Kit* entsprechend der Herstellerangaben. Für die SV5-cDNA-Synthese und qPCR wurde das *AgPath-ID[™] One-Step RT-PCR Kit* genutzt. Beide qPCR-Ansätze samt Thermoprofil sind den Tab. 12 bis Tab. 15 sowie die jeweiligen Enzyme, Primer und Sonden der Tab. 10 zu entnehmen. Die Quantifizierung erfolgte im ABI 7500.

Tab. 12 Mykoplasmen-qPCR: Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen [µl]
10 × Puffer	2,50
MgCl ₂ (50 mM)	2,00
dNTPs (10 mM)	1,00
Mollicutes F (10 µM)	1,00
Mollicutes R (10 µM)	1,00
<i>Mycoplasma Pneumonia</i> R	1,00
Mollicutes Sonde (10 µM)	0,25
Platinum [®] Taq DNA-Polymerase	0,20
PCR-Wasser	11,05
Probe	3,00
	Σ 23,00

Tab. 13 Mykoplasmen-qPCR: Thermoprofil

Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklen
95	600	1
95	15	40
55	60	

Tab. 14 SV5-RT-qPCR: Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen [μ l]
RT-PCR Puffer	12,50
Enhancer	1,00
SV5 F (10 μ M)	1,00
SV5 R (10 μ M)	1,00
SV5 Sonde (10 μ M)	0,50
RT-PCR Enzym-Mix	1,00
PCR-Wasser	5,00
Probe	3,00
	Σ 25,00

Tab. 15 SV5-RT-qPCR: Thermoprofil

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Zyklen
45	900	1
95	600	1
95	15	42
55	34	

2.2.7.2 Quantifizierung viraler Genomäquivalente

Die Extraktion viraler RNA aus den jeweiligen Virus-Stammlösungen (GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, FSMEV, DENV₁₋₄) erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *QIAamp Viral RNA Mini Kit*, die Extraktion viraler DNA aus VACV mittels *QIAamp DNA Blood Mini Kit*. Die Quantifizierung der Flavivirus-Genomäquivalente erfolgte in Anlehnung an Patel et al. [103] mit Hilfe des *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Kits* im Bio-Rad CFX 96. Der dazugehörige Reaktionsansatz samt Thermoprofil ist in den Tab. 16 und Tab. 17 gezeigt. Das Protokoll zur Bestimmung der VACV-Genomäquivalente sowie das Thermoprofil ist den Tab. 18 und Tab. 19 zu entnehmen. Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve unter Verwendung eines internen Standards (quantifiziertes Plasmid mit jeweils entsprechender Sequenz (Tab. 10)) verwendet.

Tab. 16 Flavivirus-qRT-PCR: Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen [μ l]
RT-PCR Puffer	12,50
Enhancer	1,00
All Flavi Mix	1,00
RT-PCR Enzym-Mix	1,00
PCR-Wasser	4,50
Probe	5,00
	Σ 25,00

Tab. 17 Flavivirus-qRT-PCR: Thermoprofil

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Zyklen
45	900	1
95	600	1
95	15	45
60	45	

Tab. 18 Vacciniavirus-qPCR: Reaktionsansatz

Reagenz	Volumen [μ l]
Platinum Mix	12,50
MgCl ₂ (50 mM)	1,00
OPV F1(10 μ M)	0,75
OPV R1(10 μ M)	0,75
OPV Sonde(10 μ M)	0,25
PCR-Wasser	4,75
Probe	5,00
	Σ 25,00

Tab. 19 Vacciniavirus-qPCR: Thermoprofil

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Zyklen
95	300	1
95	15	40
60	30	

2.2.8 **Statistik**

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit ANOVA gefolgt vom Bonferroni Multiple Comparison Test identifiziert. Ein p-Wert $\leq 0,05$ (*) wurde als statistisch signifikant erachtet. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 5.04.

3 Ergebnisse

3.1 Hergestellte Antikörper und Viren

3.1.1 Quantifizierung der Antikörper

Die Untersuchungen erfolgten unter Verwendung der selbst produzierten mAk-Stammlösungen α -all-Flavi, α -GFV₆₃₃₀, α -GFV₆₅₃₈, α -all-DENV, α -DENV₁, α -DENV₂, α -DENV₃, α -DENV₄, α -FSMEV₇₅, α -FSMEV₁₃₆₇, α -FSMEV₁₄₁₈, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆, α -VACV_{A1} und α -VACV_{A3} (Tab. 9). Diese mAk wurden wie unter 2.2.3 beschrieben hergestellt und quantifiziert. Für die Antikörper-Stammlösungen ergaben sich Antikörperkonzentrationen zwischen 1,3 und 9,4 mg/ml in mindestens 10 ml Eluat.

3.1.2 Quantifizierung der Viren

Die Testung der markierungsfreien Biosensor-Technologie (SCORE) hinsichtlich der Machbarkeit des Nachweises von Viren erfolgte unter Verwendung der selbst produzierten Virus-Stammlösungen (GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₁₋₄ (DENV₁, DENV₂, DENV₃, DENV₄), FSMEV und VACV; Tab. 8).

Diese wurden zunächst virologisch mit Hilfe des Plaque-Titrationstests (2.2.2.2) quantifiziert. Die Virustiter lagen zwischen $8,0 \cdot 10^6$ PFU/ml (GFV_{Asibi}) und $4,0 \cdot 10^7$ PFU/ml (VACV) (Tab. A36). Für die DENV₁₋₄ konnte mittels Plaque-Titrationstest aufgrund der fehlenden Ausprägung eines zytopathischen Effektes in PS-Zellen kein Virustiter bestimmt werden. Alternativ wurde als Annäherung der mittlere Virustiter der anderen Flaviviren FSMEV, GFV_{Asibi} und GFV_{17D} zugrunde gelegt ($2,0 \cdot 10^7$ PFU/ml).

Auf Basis der Plaque-Titrationstest-Ergebnisse erfolgte für die weiteren Untersuchungen die Angleichung der verschiedenen Virustiter an die Stammlösung mit der geringsten Viruskonzentration ($8,0 \cdot 10^6$ PFU/ml). Ergänzend zur virologischen Quantifizierung wurde eine molekularbiologische Quantifizierung der Virus-Stammlösungen vorgenommen (2.2.7.2). Basierend auf dem Nachweis viraler Nukleinsäuren mittels qRT-PCR bzw. qPCR konnten in den Stammlösungen Flaviviren (FSMEV, GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₁₋₄) sowie Vacciniaviren (VACV) nachgewiesen werden. Die Konzentration der Virus-Genomäquivalente (GÄ) lag zwischen $4,4 \cdot 10^7$ GÄ/ml (DENV₃) und $3,8 \cdot 10^9$ GÄ/ml (FSMEV) (Tab. A37) und war für jeden Virustyp höher als die auf Basis der Plaque-Titrationstests ermittelten PFU/ml (Tab. A36).

3.1.3 Visualisierung der Viren

Die Visualisierung der Viren erfolgte mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM). Für die Flaviviren ist exemplarisch das GFV_{Asibi} (Abb. 12A, Abb. A36A) und für die Orthopockenviren das VACV gezeigt (Abb. 12B, Abb. A36B).

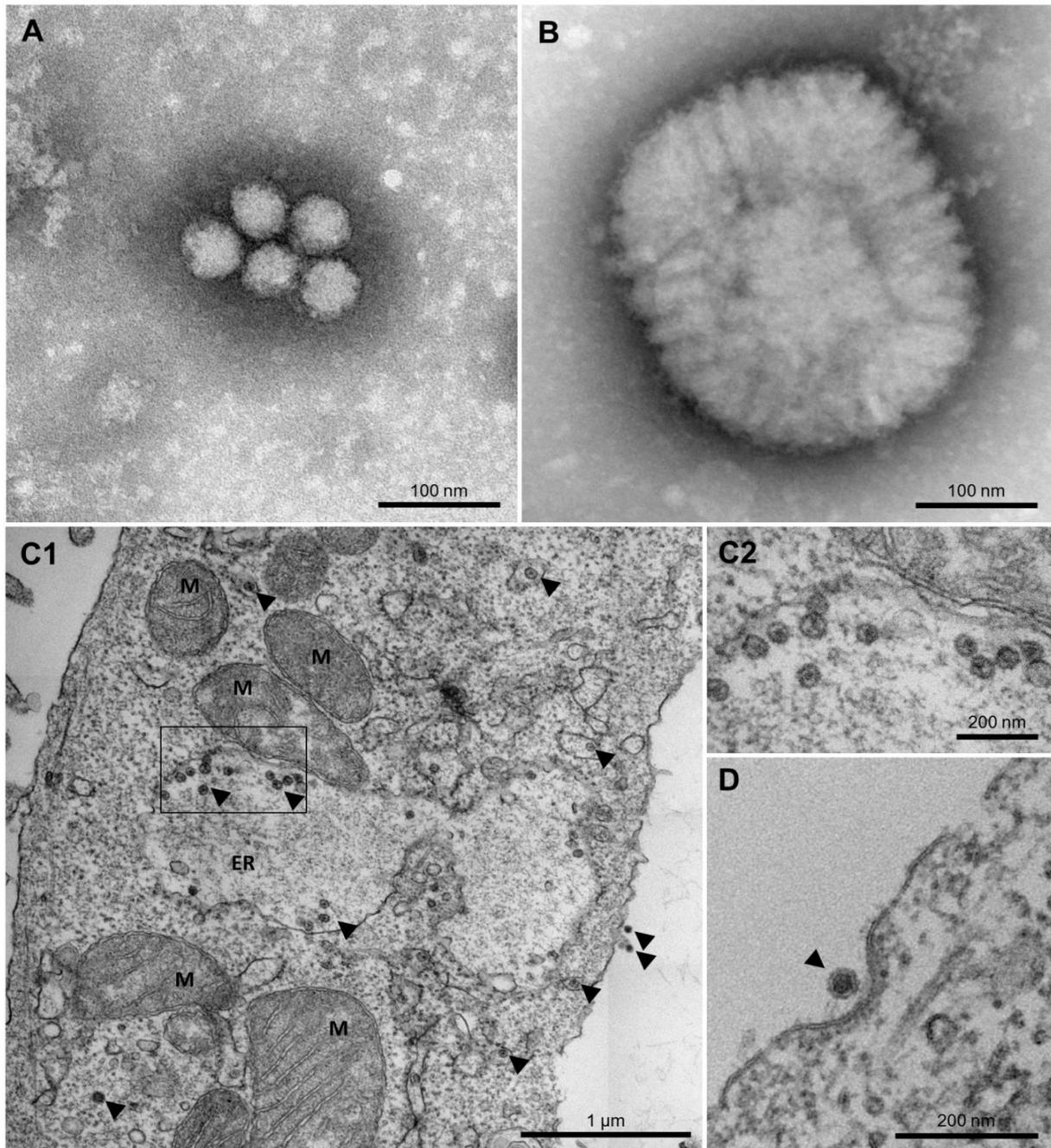


Abb. 12 Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen des GFV_{Asibi} und VACV. [A]: Fünf GFV_{Asibi}-Virionen (Negativkontrastierung). [B]: VACV-Virion (Negativkontrastierung). [C1]: GFV_{Asibi}-infizierte Vero E6-Zelle mit intrazellulären Viren im Ultradünnschnitt. Pfeil: Viren; Rechteck: siehe C2. [C2]: Detailansicht intrazellulärer Viren des GFV_{Asibi} (vgl. C1, Rechteck). [D]: Extrazelluläres GFV_{Asibi}-Virion in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran (Ultradünnschnitt). ER: Endoplasmatisches Retikulum; M: Mitochondrium.

Im Fall des GFV_{Asibi} konnten sphäroide Viruspartikel mit ca. 50 nm Durchmesser nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in ergänzenden Untersuchungen von GFV_{Asibi}-infizierten Zellen mittels Ultradünnschnitten eine intrazelluläre Anreicherung von Viren, u.a. im endoplasmatischen Retikulum, nachgewiesen (Abb. 12C). Die Viruspartikel lagen darüber hinaus auch in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran vor (Abb. 12C1+D).

Die Ergebnisse zur Visualisierung des VACV zeigen die deutlichen Größenunterschiede zwischen dem Flavivirusvertreter GFV_{Asibi} und den VACV (Abb. 12A+B). In den Untersuchungen konnte für die VACV eine Größe von ca. $315 \times 250 \times 120$ nm und eine ziegelsteinförmige bzw. abgeflachte, ellipsoide Form festgestellt werden (vgl. hierzu auch Abb. A36).

3.2 Markierungsfreie Biosensor-Technologie (SCORE)

Eine wesentliche Voraussetzung für den antikörpervermittelten Virusnachweis mittels der neuartigen SCORE-Technologie (1.6.2) ist, dass die auf dem Biosensor immobilisierten Antikörper ihr jeweiliges Virusantigen unter kontinuierlichen Flussbedingungen binden. Weiterhin sollte sich die Virusantigen-Antikörperbindung in einem Messsignal niederschlagen, welches sich deutlich von der Referenz (mit Spottingpuffer behandelte Biosensorareale ohne immobilisierte mAk) unterscheidet (2.2.4.2, 2.2.4.3). Die positive Änderung des Messsignals ist hierbei gleichzusetzen mit der Zunahme der Schichtdicke, d. h. der Bindung der Viren an die auf dem Biosensor immobilisierten Antikörper.

3.2.1 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombinationen

Zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination wurden die Antikörper zunächst mit der Viruspräparation getestet, für deren Nachweis entsprechende Literaturnachweise (auf Basis anderer Messmethoden) vorliegen. Für jeden Virustyp wurden so anhand der maximalen Messsignale Antikörper für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. In anschließenden Schritten wurden diese Antikörper auch mit anderen Virustypen getestet, um deren Spezifität zu analysieren (1.1.1). Die initialen Messbedingungen orientierten sich zunächst an den von Dähn [119] beschriebenen Konditionen.

3.2.1.1 Nachweis des Gelbfiebervirus (Stamm Asibi und 17D)

Die Ergebnisse zur Überprüfung der Eignung der α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk für den Nachweis des GFV_{Asibi} sind in Abbildung 13A dargestellt. Relativ zur Referenz resultierte die Zugabe des GFV_{Asibi} zum Biosensor in einem sehr starken Anstieg der Messsignale der beiden darauf immobilisierten α -GFV mAk. Diese zeigten sowohl in den zeitlichen Änderungen als auch hinsichtlich der maximalen Bindungssignale (Tab. 20) nahezu identische Eigenschaften. Die Ergebnisse zur Überprüfung der Eignung beider α -GFV mAk für den Nachweis des GFV_{17D} sind in Abbildung 13B dargestellt. Die Zugabe des GFV_{17D} resultierte für beide Antikörper in starken Bindungssignalen (Tab. 20). Sowohl die zeitlichen Kurvenverläufe als auch die maximalen Bindungssignale beider Antikörper waren vergleichbar.

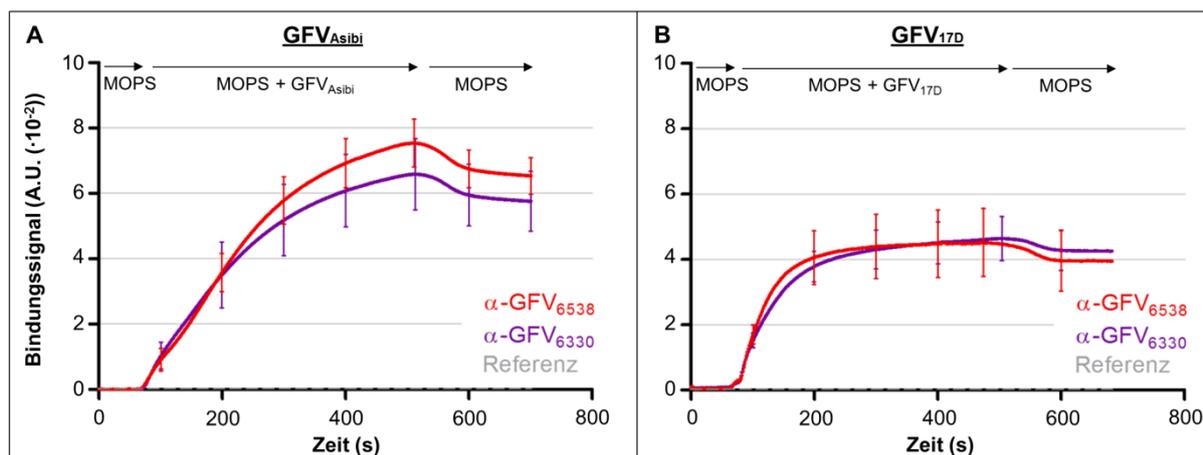


Abb. 13 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des GFV. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk wurden mit den GFV-Stämmen Asibi [A] oder 17D [B] ($1,6 \cdot 10^6$ PFU) in der Flusszelle überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 20 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0). Mittelwert \pm SD, $n \geq 6$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Tab. 20 Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des GFV.

		Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]	
mAk (Spot)		α -GFV ₆₅₃₈	α -GFV ₆₃₃₀
Virus (Probe)			
GFV _{Asibi}		$7,54 \pm 0,73$	$6,59 \pm 1,09$
GFV _{17D}		$4,51 \pm 1,04$	$4,64 \pm 0,67$

Tabelle zu Abb. 13. Mittelwert \pm SD, $n \geq 6$. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0).

Insgesamt zeigte sich, dass die α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk gleichermaßen den jeweiligen GFV-Stamm Asibi und 17D binden, wobei die maximalen Bindungssignale unter Zugabe des GFV_{17D} geringer waren als unter GFV_{Asibi}. Es wurden beide α -GFV mAk für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

3.2.1.2 Nachweis des Denguevirus (Serotyp 1 - 4)

Die Untersuchungen erfolgten mit den α -DENV₁, α -DENV₂, α -DENV₃, α -DENV₄ mAk (α -DENV₁₋₄ mAk), dem α -all-DENV mAk sowie dem α -all-Flavi mAk. Während der α -all-DENV mAk für den allgemeinen Nachweis aller DENV-Serotypen verwendet wurde, diente der α -all-Flavi mAk dem generellen Nachweis von Flaviviren.

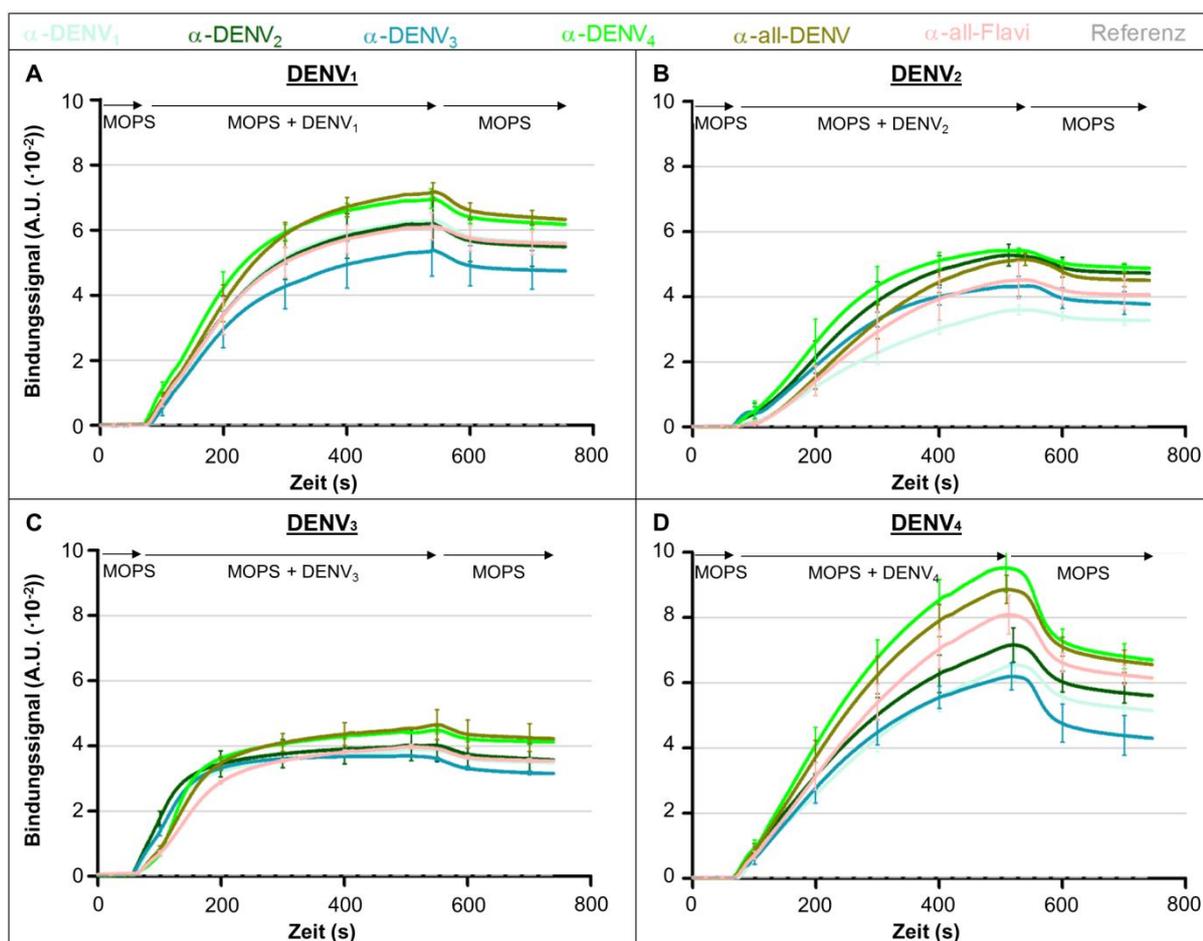


Abb. 14 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des DENV. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten α -DENV₁₋₄, α -all-DENV und α -all-Flavi mAk wurden mit den DENV-Serotypen 1 [A], 2 [B], 3 [C] oder 4 [D] in der Flusszelle überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 21 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0). Mittelwert \pm SD, $n \geq 6$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Wie in Abbildung 14A ersichtlich, konnten nach Zugabe des DENV₁ für alle untersuchten Antikörper vergleichbare positive Kurvenverläufe detektiert werden. Unterschiede zeigten sich in den Bindungssignalstärken (Tab. 21). Der α -all-DENV mAk und der α -DENV₄ mAk wiesen die stärksten Signale auf. Das schwächste Signal wurde für den α -DENV₃ mAk detektiert.

Nach Zugabe des DENV₂ zeigten sich auch hier für alle Antikörper vergleichbare positive Kurvenverläufe (Abb. 14B), wobei diese insgesamt schwächer als unter dem DENV₁ waren. Unterschiede in den maximalen Signalen der Antikörper zeigten sich wie folgt: Die höchsten Signale wiesen die α -DENV₄, α -DENV₂ und α -all-DENV mAk auf (Tab. 21). Demgegenüber lag das schwächste maximale Signal für den α -DENV₁ mAk vor (Tab. 21).

Unter den Antikörpern vergleichbare Kurvenverläufe konnten auch nach Zugabe des DENV₃ festgestellt werden (Abb. 14C). Die Bindungssignale waren insgesamt schwächer als unter den DENV₁ und DENV₂. Erneut wiesen die α -DENV₄ und α -all-DENV mAk die stärksten maximalen Signale auf (Tab. 21).

Im Vergleich zu den DENV₁₋₃ wurden unter dem DENV₄ (Abb. 14D) die insgesamt stärksten Bindungssignale detektiert. Wiederholt wiesen sowohl der α -DENV₄ mAk als auch der α -all-DENV mAk die stärksten Messsignale auf. Die weiteren getesteten Antikörper wiesen vergleichbare, aber niedrigere Kurvenverläufe auf. Nach ihren maximalen Signalstärken abnehmend zeigte sich die mAk-Reihenfolge α -all-Flavi > α -DENV₂ > α -DENV₁ bzw. α -DENV₃.

Tab. 21 Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des DENV.

mAk Virus	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]					
	α -DENV ₁	α -DENV ₂	α -DENV ₃	α -DENV ₄	α -all-DENV	α -all-Flavi
DENV ₁	6,30 \pm 0,27	6,20 \pm 0,80	5,39 \pm 0,80	6,96 \pm 0,30	7,18 \pm 0,28	6,12 \pm 0,42
DENV ₂	3,59 \pm 0,15	5,27 \pm 0,34	4,32 \pm 0,31	5,42 \pm 0,08	5,15 \pm 0,18	4,51 \pm 0,57
DENV ₃	3,89 \pm 0,24	4,02 \pm 0,48	3,70 \pm 0,04	4,48 \pm 0,10	4,65 \pm 0,46	3,97 \pm 0,07
DENV ₄	6,53 \pm 0,50	7,15 \pm 0,52	6,19 \pm 0,41	9,52 \pm 0,74	8,86 \pm 0,43	8,08 \pm 0,60

Tabelle zu Abb. 14. Mittelwert \pm SD, n \geq 6. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0).

Insgesamt zeigten somit alle getesteten Antikörper eine deutliche Bindung mit jedem der DENV₁₋₄, wobei Unterschiede in den maximalen Signalstärken der mAk vorlagen. Die Bindungssignale lagen in der Größenordnung der Messergebnisse vom GFV_{17D} und GFV_{Asibi}. Für die weiteren Untersuchungen wurde als beste DENV-Variante die Kombination aus dem α -DENV₄ mAk für den Nachweis des DENV₄ ausgewählt. Diese Kombination wies das höchste Signal auf und war die einzige Variante, bei der das höchste Signal vom spezifischen Antikörper detektiert wurde.

3.2.1.3 Nachweis des FSME-Virus

Die Untersuchungen erfolgten mit den mAk α -FSMEV₇₅, α -FSMEV₁₃₆₇, α -FSMEV₁₄₁₈, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆ sowie dem α -all-Flavi mAk. Die Zugabe des FSMEV resultierte in unterschiedlichen Bindungskurvenverläufen für die untersuchten Antikörper (Abb. 15), wobei die maximalen Bindungssignale für die α -FSMEV mAk um ca. eine Größenordnung (1:10) geringer waren als die Messergebnisse bei GFV_{17D}, GFV_{Asibi} (3.2.1.1) bzw. DENV₁₋₄ (3.2.1.2).

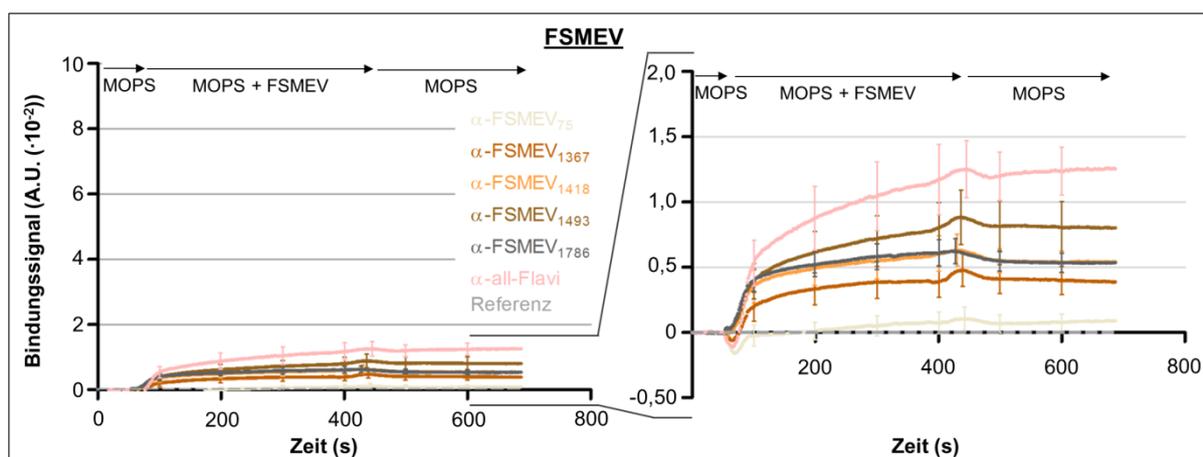


Abb. 15 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des FSMEV. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten α -FSMEV₇₅, α -FSMEV₁₃₆₇, α -FSMEV₁₄₁₈, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆ und α -all-Flavi mAk sind in der Flusszelle mit FSMEV-Viren ($1,6 \cdot 10^6$ PFU) überströmt worden. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 22 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0). Mittelwert \pm SD, $n \geq 12$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

In Bezug auf die maximalen Bindungssignale unterschieden sich alle getesteten Antikörper, mit Ausnahme des α -FSMEV₇₅ mAk, deutlich von der Referenz (Tab. 22). Der α -all-Flavi mAk zeigte hierbei das stärkste Bindungssignal, gefolgt von dem α -FSMEV₁₄₉₃ mAk. Die α -FSMEV₁₄₁₈ und α -FSMEV₁₇₈₆ mAk zeigten nachfolgend identische Signalstärken, welche sich in der Größenordnung jedoch nicht maßgeblich vom α -FSMEV₁₄₉₃ mAk unterschieden.

Insgesamt wurden auf der Grundlage der maximalen Bindungssignale die mAk α -all-Flavi sowie die α -FSMEV₁₄₉₃ und α -FSMEV₁₇₈₆ für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Tab. 22 Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des FSMEV.

		Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]					
mAk	Virus	α -FSMEV ₇₅	α -FSMEV ₁₃₆₇	α -FSMEV ₁₄₁₈	α -FSMEV ₁₄₉₃	α -FSMEV ₁₇₈₆	α -all-Flavi
	FSMEV	0,10 \pm 0,09	0,48 \pm 0,13	0,63 \pm 0,12	0,88 \pm 0,21	0,62 \pm 0,10	1,25 \pm 0,22

Tabelle zu Abb. 15. Mittelwert \pm SD, $n \geq 12$. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0).

3.2.1.4 Nachweis des Vacciniavirus

Für die α -VACV_{A1} und α -VACV_{A3} mAk zeigten sich nach der Zugabe des VACV unterschiedliche Kurvenverläufe (Abb. 16). Das maximale Bindungssignal des α -VACV_{A1} mAk lag im Verhältnis zu allen untersuchten Viren in der Größenordnung der Messergebnisse vom FSMEV (Tab. 22).

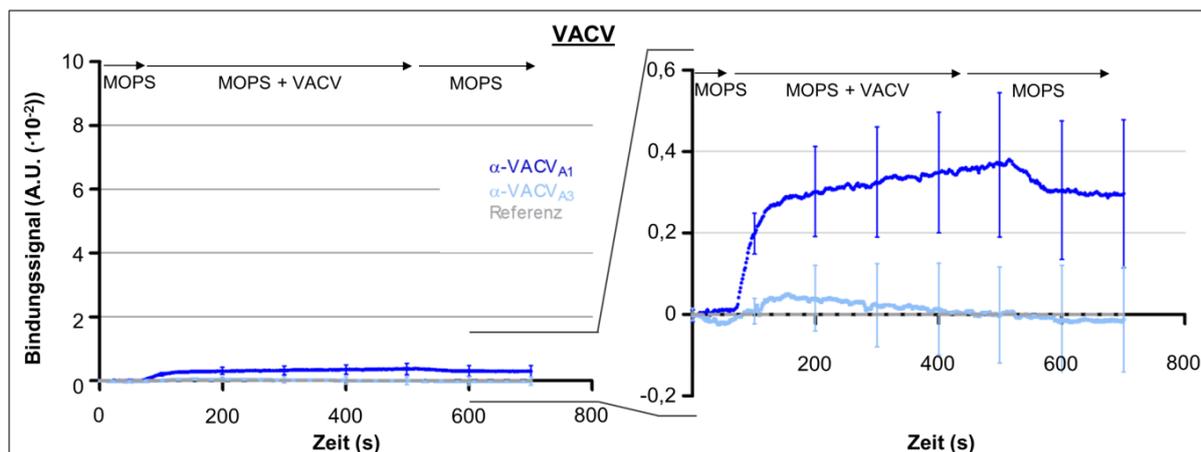


Abb. 16 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des VACV. Die α -VACV_{A1} und α -VACV_{A3} mAk wurden auf den Biosensor-Chips in separaten Arealen immobilisiert und in der Flusszelle mit Vacciniaviren (VACV; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 23 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0). Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Für den α -VACV_{A1} mAk konnte unter dem VACV ein Anstieg des Messsignals, d.h. eine Bindung des VACV detektiert werden (Tab. 23). Demgegenüber zeigte der α -VACV_{A3} mAk lediglich ein sehr schwaches Signal, welches sich nicht in relevantem Umfang von der Referenz unterschied.

Insgesamt wurde unter Berücksichtigung der maximalen Bindungssignale der α -VACV_{A1} mAk für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

Tab. 23 Maximale Bindungssignale zur Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des VACV.

		Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]	
mAk (Spot)		α -VACV _{A1}	α -VACV _{A3}
Virus (Probe)			
VACV		$0,38 \pm 0,19$	$0,05 \pm 0,06$

Tabelle zu Abb. 16. Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0).

Fazit zur Auswahl der Antikörper für den jeweiligen Virusnachweis

Für jedes untersuchte Virus konnte auf Basis der Antikörper-Virus-Bindungssignale mindestens ein Antikörper ausgewählt werden (GFV_{Asibi}/GFV_{17D}: α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ mAk; DENV₄: α -DENV₄ mAk; FSMEV: α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆ und α -all-Flavi mAk; VACV: α -VACV_{A1} mAk). Hinsichtlich der maximalen Bindungssignale nach Viruszugabe lagen insgesamt deutliche Unterschiede zwischen den Virustypen vor. Demnach waren die Messsignale der ausgewählten Antikörper unter GFV_{Asibi}, GFV_{17D} und DENV₁₋₄ um ca. eine Größenordnung (1:10) höher als unter FSMEV und VACV.

3.2.2 Spezifitätsuntersuchungen

3.2.2.1 Spezifität der Antikörper unter den initialen Messbedingungen

Zur Überprüfung, welche Virus-Spezifität die unter 3.2.1 ausgewählten mAk α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi sowie α -VACV_{A1} bei Verwendung des initialen Messpuffers (MOPS, pH-Wert 6,0) aufweisen, wurde diese Antikörper-Kombination gespottet und mit dem GFV_{Asibi}, DENV₄, FSMEV und VACV getestet.

Nachweis des Gelbfiebertivirus (Stamm Asibi)

Die Zugabe des GFV_{Asibi} resultierte in deutlichen Bindungssignalen der auf dem Biosensor immobilisierten α -GFV₆₅₃₈ mAk (Abb. 17A). Das maximale Signal entsprach in seiner Größenordnung den Ergebnissen der Voruntersuchungen (ca. 79 %; Tab. 20). Einen nahezu identischen Kurvenverlauf inkl. der maximalen Signalstärke wies auch der α -DENV₄ mAk auf (Tab. 24). Die weiteren untersuchten mAk α -all-Flavi, α -VACV_{A1} sowie α -FSMEV₁₄₉₃, zeigten gegenüber den α -GFV₆₅₃₈ und α -DENV₄ mAk schwächere, aber ebenfalls deutliche Signale. Für den α -FSMEV₁₇₈₆ wurden keine Bindungssignale hinsichtlich des GFV_{Asibi} detektiert. In Bezug auf die maximale Signalstärke unterschied sich der α -GFV₆₅₃₈ mAk statistisch signifikant von den mAk α -all-Flavi, α -VACV_{A1} sowie α -FSMEV₁₄₉₃, jedoch nicht vom α -DENV₄ mAk.

Nachweis des Denguevirus (Serotyp 4)

Nach der Zugabe des DENV₄ wurde das stärkste Bindungssignal für den α -DENV₄ mAk detektiert (Abb. 17B, Tab. 24). Wenngleich schwächer, so zeigten auch die mAk α -GFV₆₅₃₈, α -all-Flavi sowie α -VACV_{A1} deutliche Signale. Die schwächsten Signale wiesen die α -FSMEV₁₄₉₃ und α -FSMEV₁₇₈₆ mAk auf. Das maximale Bindungssignal des α -DENV₄ mAk unterschied sich statistisch signifikant von denen aller anderen untersuchten Antikörper.

Nachweis des FSME-Virus

Beim FSMEV wurde das höchste Bindungssignal für den α -GFV₆₅₃₈ mAk detektiert. Es folgten in abnehmender Reihenfolge die α -DENV₄, α -all-Flavi, α -FSMEV₁₄₉₃ und α -VACV_{A1} mAk (Tab. 24; Abb. 17C). Das geringste Signal wies der α -FSMEV₁₇₈₆ mAk auf. Im Vergleich mit den Voruntersuchungen (Tab. 22) zeigten sich ähnliche maximale Signale der mAk α -all-Flavi (ca. 104 %), α -FSMEV₁₄₉₃ (ca. 123 %) und α -FSMEV₁₇₈₆ (ca. 68 %).

Nachweis des Vacciniavirus

Unter Zugabe des VACV wiesen die mAk α -GFV₆₅₃₈ bzw. α -FSMEV₁₄₉₃ und α -DENV₄ gegenüber dem α -VACV_{A1} höhere bzw. ähnliche maximale Bindungssignale auf (Abb. 17D; Tab. 24). Die mAk α -FSMEV₁₇₈₆ und α -all-Flavi zeigten geringere, im Vergleich zum α -VACV_{A1} statistisch signifikant unterschiedliche maximale Signale. Die maximale Bindungssignalstärke des α -VACV_{A1} mAk lag in der Größenordnung der Voruntersuchung (ca. 85 %; Tab. 23).

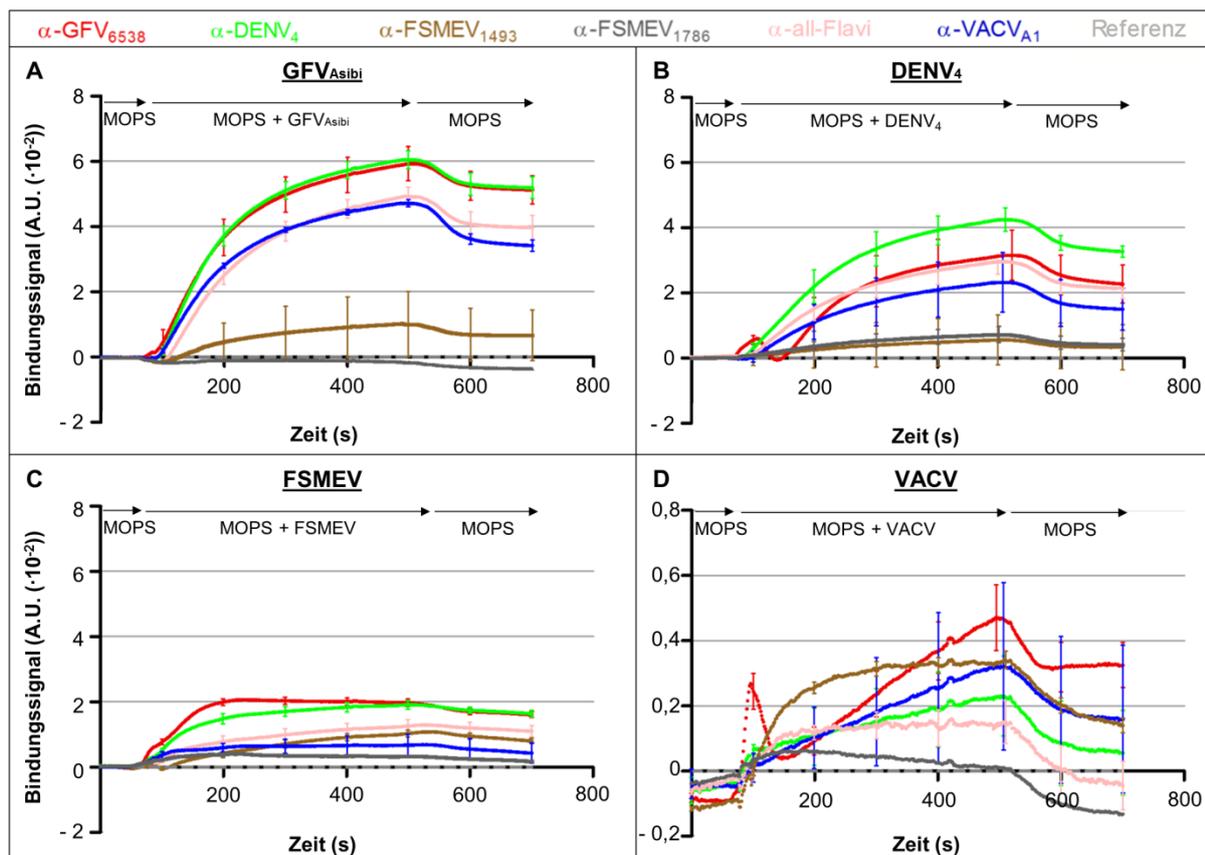


Abb. 17 Spezifität der ausgewählten Antikörper hinsichtlich der Virustypen GFV_{Asibi}, DENV₄, FSMEV und VACV unter initialen Messbedingungen. Die in 3.2.1 ausgewählten mAk α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi und α -VACV_{A1} wurden auf den Biosensor-Chips immobilisiert und mit dem [A]: Gelbfiebertypus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; $1,6 \cdot 10^6$ PFU), [B]: Denguevirus Serotyp 4 (DENV₄), [C]: FSME-Virus (FSMEV; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) oder [D]: Vacciniavirus (VACV; $1,6 \cdot 10^6$ PFU; anderer Größenmaßstab des Bindungssignals) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 24 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0). Mittelwert \pm SD, $n \geq 6$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Tab. 24 Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der ausgewählten Antikörper in Abhängigkeit der Virustypen GFV_{Asibi}, DENV₄, FSMEV und VACV unter den initialen Messbedingungen.

Virus (Probe)	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]			
	GFV _{Asibi}	DENV ₄	FSMEV	VACV
mAk (Spot)				
α-GFV₆₅₃₈	5,93 \pm 0,52	3,16 \pm 0,77 ↓ * α -DENV ₄	2,07 \pm 0,10 ↓ * α -FSMEV ₁₄₉₃	0,47 \pm 0,10 ↓ n.s. α -VACV _{A1}
α-DENV₄	6,06 \pm 0,27 ↓ n.s. α -GFV ₆₅₃₈	4,25 \pm 0,36	1,91 \pm 0,13 ↓ * α -FSMEV ₁₄₉₃	0,23 \pm 0,12 ↓ n.s. α -VACV _{A1}
α-FSMEV₁₄₉₃	1,03 \pm 1,00 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈	0,56 \pm 0,76 ↓ * α -DENV ₄	1,08 \pm 0,10	0,34 \pm 0,27 ↓ n.s. α -VACV _{A1}
α-FSMEV₁₇₈₆	< Referenz	0,72 \pm 0,96 ↓ * α -DENV ₄	0,42 \pm 0,06 ↓ * α -FSMEV ₁₄₉₃	0,06 \pm 0,01 ↓ * α -VACV _{A1}
α-all-Flavi	4,94 \pm 0,28 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈	2,96 \pm 0,39 ↓ * α -DENV ₄	1,30 \pm 0,18 ↓ n.s. α -FSMEV ₁₄₉₃	0,15 \pm 0,07 ↓ * α -VACV _{A1}
α-VACV_{A1}	4,72 \pm 0,44 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈	2,33 \pm 0,91 ↓ * α -DENV ₄	0,69 \pm 0,34 ↓ * α -FSMEV ₁₄₉₃	0,32 \pm 0,26

Tabelle zu Abb. 17. Mittelwert \pm SD, $n \geq 6$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; n. s.: nicht signifikant; ↓: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des für den Nachweis des jeweiligen Virus ausgewählten mAk (fett hervorgehoben): α -GFV₆₅₃₈ (GFV_{Asibi}), α -DENV₄ (DENV₄), α -FSMEV₁₄₉₃ (FSMEV) oder α -VACV_{A1} (VACV); < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt); Referenz: Biosensorareale ohne mAk. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0).

Einfluss des Zellkulturüberstandes

Die für die Messungen verwendeten Viruslösungen wurden aus dem Zellkulturüberstand gewonnen (2.2.2.1). Zur Kontrolle, in welchem Umfang die detektierten Bindungssignale durch Zellfragmente, Bestandteile des Zellkulturmediums bzw. der Inaktivierungsreagenz β -Propiolacton hervorgerufen wurden, sind die Antikörper mit Zellkulturüberstand nicht-infizierter Vero E6-Zellen getestet worden (Abb. 18).

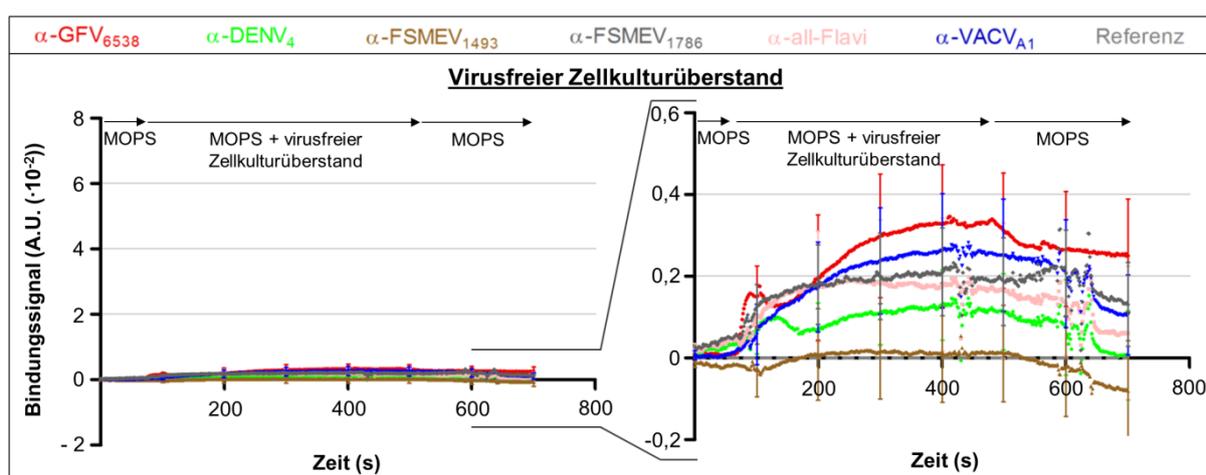


Abb. 18 Einfluss von Zellkulturüberstand auf die Bindungssignale unter initialen Bedingungen. Die in 3.2.1 ausgewählten mAk α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi und α -VACV_{A1} wurden auf den Biosensor-Chips immobilisiert und mit Zellkulturüberstand nicht-infizierter Vero E6-Zellen (inkl. 0,1 % β -Propiolacton) überströmt. Eine Bindung von Zellkulturbestandteilen an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 25 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0) + virusfreier Zellkulturüberstand (1:5). Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$. A.U.: Arbitrary Unit.

Die mAk α -GFV₆₅₃₈ (Tab. 25, ^a), α -DENV₄ (^b), α -FSMEV₁₄₉₃ (^c) und α -all-Flavi (^e) wiesen unter Zugabe von virusfreiem Zellkulturüberstand um 85 % bis 96 % verringerte maximale Bindungssignale gegenüber den mit GFV_{17D} und GFV_{Asibi}, DENV₄ bzw. FSMEV ermittelten Messsignalen auf. Die mAk α -FSMEV₁₇₈₆ (^d) und α -VACV_{A1} (^f) wiesen unter den virusfreien Bedingungen die geringste Signalreduktion auf. Die maximalen Bindungssignale waren lediglich um 45 % bzw. 13 % gegenüber den Messergebnissen, die unter der Zugabe des FSMEV bzw. VACV ermittelt wurden, reduziert.

Tab. 25 Einflusses von Zellkulturüberstand auf die maximalen Bindungssignale unter den initialen Messbedingungen.

Probe mAk	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]					
	Virusfreier Zellkultur- überstand	Virus in Zellkulturüberstand				
		GFV _{Asibi} [#] [Tab. 24]	GFV _{17D} [#] [Tab. 20]	DENV ₄ [#] [Tab. 24]	FSMEV [#] [Tab. 24]	VACV [#] [Tab. 24]
α -GFV ₆₅₃₈	0,34 \pm 0,14 ^a	5,93 \pm 0,52	4,51 \pm 1,04	-	-	-
α -DENV ₄	0,15 \pm 0,09 ^b	-	-	4,25 \pm 0,36	-	-
α -FSMEV ₁₄₉₃	0,05 \pm 0,16 ^c	-	-	-	1,08 \pm 0,10	-
α -FSMEV ₁₇₈₆	0,23 \pm 0,11 ^d	-	-	-	0,42 \pm 0,06	-
α -all-Flavi	0,19 \pm 0,16 ^e	-	-	2,96 \pm 0,39	1,30 \pm 0,18	-
α -VACV _{A1}	0,28 \pm 0,15 ^f	-	-	-	-	0,32 \pm 0,26

Tabelle zu Abb. 18. Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$. Messbedingungen: MOPS-Puffer (pH-Wert 6,0). #: Ergebnisse aus vorherigen Messungen (Tab. 20 und 24). Signalreduktion bei virusfreiem Zellkulturüberstand gegenüber ^a: GFV_{Asibi} 94 % und GFV_{17D} 92 %, ^b: DENV₄ 96 %, ^c: FSMEV 95 %, ^d: FSMEV 45 %, ^e: DENV₄ 96 % und FSMEV 85 %, ^f: VACV 13 %.

Insgesamt waren die unter den virusfreien Bedingungen (Zellkulturüberstand nicht-infizierter Vero E6-Zellen) ermittelten maximalen Bindungssignale der mAk α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃ und α -all-Flavi deutlich geringer als die jeweiligen unter Viruszugabe bestimmten Signale. Die α -FSMEV₁₇₈₆ und α -VACV_{A1} mAk zeigten gegenüber den anderen mAk vergleichbare Signalstärken unter virusfreien Bedingungen. Allerdings lagen die Bindungssignale des α -FSMEV₁₇₈₆ sowie insbesondere des α -VACV_{A1} mAk damit in der Größenordnung der Bindungssignale nach jeweiliger Viruszugabe (FSMEV sowie VACV).

Fazit zur Spezifität der Antikörper für den Virusnachweis unter den initialen Messbedingungen

Es war mit den initialen Messbedingungen nur zum Teil der spezifische antikörpervermittelte Nachweis des jeweiligen Virus möglich:

Der α -all-Flavi mAk zeigte nur unter Zugabe der Flaviviren deutliche Bindungssignale und nicht bei dem VACV. Auch der für den Nachweis des DENV₄ entwickelte α -DENV₄ mAk zeigte nach Zugabe dieses Virus das stärkste Bindungssignal. Allerdings wiesen gleichzeitig auch andere untersuchte Antikörper relevante-Signale auf, darunter auch der α -VACV_{A1} mAk. Beim GFV_{Asibi}-Nachweis zeigte neben dem α -GFV₆₅₃₈ auch der α -DENV₄ mAk vergleichbare Signale. Schwächere, aber relevante Signale wurden auch für den α -VACV_{A1} mAk detektiert. Darüber hinaus wiesen die α -GFV₆₅₃₈ und α -DENV₄ mAk auch nach Zugabe des FSMEV die stärksten Signale auf.

Unter Zugabe von virusfreiem Zellkulturüberstand waren die Bindungssignale der Flaviviren mAk, mit Ausnahme des α -FSMEV₁₇₈₆, im Verhältnis zu den Signalen nach Flaviviruszugabe vernachlässigbar gering. Demgegenüber entsprach das Bindungssignal des α -VACV_{A1} mAk unter Zugabe von virusfreiem Zellkulturüberstand im Wesentlichen den Ergebnissen nach Zugabe des VACV, womit der α -VACV_{A1} mAk-vermittelte Nachweis des VACV folglich nicht möglich war. Die Flaviviren mAk zeigten keine relevante Bindung an das VACV.

Vor dem Hintergrund der heterogenen Ergebnisse wurde in sich anschließenden Messungen der Einfluss der Messbedingungen auf die Virusspezifität der Antikörper ermittelt, um die Spezifität der mAk in dem neuartigen Messsystem zu steigern (3.2.2.2).

3.2.2.2 Optimierung der initialen Messbedingungen zur Antikörperspezifitätssteigerung

Mit dem Ziel, den Einfluss der Messbedingungen auf die Virusspezifität der Antikörper in der Biosensor-Methode zu ermitteln und darauf basierend ihre Spezifität zu steigern, wurde der Einfluss von Zusätzen (Urea, Tween 20) im Messpuffer untersucht sowie der pH-Wert des Messpuffers, die Messtemperatur, die Ionenstärke und die Pufferzusammensetzung variiert. Da mit dem GFV_{Asibi} in den initialen Spezifitätsuntersuchungen die insgesamt stärksten spezifischen (α -GFV₆₅₃₈) wie auch unspezifischen (u.a. α -VACV_{A1}) Bindungssignale detektiert wurden, erfolgte die Optimierung anhand dieses Virus. Dazu wurden die unter 3.2.1 ausgewählten mAk verwendet (α -GFV₆₅₃₈, α -GFV₆₃₃₀, α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi sowie α -VACV_{A1}).

Einfluss von Urea und Tween 20

Der Effekt verschiedener Messpuffer-Zusätze auf die Spezifität der Antikörperbindung sowie die Stärke des Bindungssignals wurde anhand von Urea und Tween 20 ermittelt.

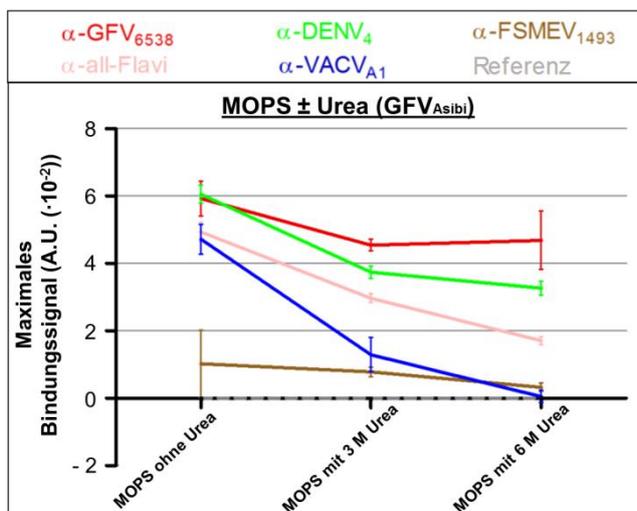


Abb. 19 Einfluss von Urea auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit dem Gelbfiebervirus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) überströmt. Eine Virusbindung an die Antikörper hat im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) eine Zunahme der Biosensor-Schichtdicke im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers zur Folge, welches sich in einer Erhöhung des Bindungssignals äußert. Eine Schichtdickenreduktion führt zur Verringerung des Signals. Dargestellt sind die maximalen Bindungssignale unter MOPS-Puffer mit 3 M oder 6 M Urea (pH-Wert 6,0). Diese sind Tab. 26 zu entnehmen. Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. A.U.: Arbitrary Unit.

Der Einfluss von 3 M und 6 M Urea auf die Detektion des GFV_{Asibi} ist in Abbildung 19 bzw. Tab. 26 dargestellt. Die Zugabe von Urea zum initialen Messpuffer (MOPS, pH-Wert 6,0) führte bei allen Antikörpern zur statistisch signifikanten Verringerung der maximalen Bindungssignale im Vergleich zu den Messergebnissen ohne Urea. Bei 6 M Urea kam es zu Signalreduktionen zwischen 21 % und 99 % gegenüber den Urea-freien Bedingungen (α -GFV₆₅₃₈: -21 %, α -DENV₄: -46 %, α -FSMEV₁₄₉₃: -68 %, α -all-Flavi: -65 %, α -VACV_{A1}: -99 %). Die geringste Signalreduktion konnte somit für den α -GFV₆₅₃₈ und die stärkste Signalreduktion für den α -VACV_{A1} festgestellt werden. Im Vergleich zu den initialen Messungen resultierte die Zugabe von Urea in einem signifikant geringeren maximalen Signal

des α -DENV₄ mAk gegenüber dem α -GFV₆₅₃₈ mAk. Damit wiesen alle Antikörper unter Urea statistisch signifikant geringere maximale Signale als der α -GFV₆₅₃₈ mAk auf. Jedoch wurde für den α -DENV₄ mAk auch unter 6 M Urea immer noch ein sehr deutliches Signal detektiert. Insgesamt bewirkten beide Urea-Konzentrationen im initialen Messpuffer daher nur eine leichte Verbesserung in Hinblick auf den α -GFV mAk-spezifischen Nachweis des GFV_{Asibi}. Darüber hinaus führte Urea zu Kristallisationen in der Flusszelle, wodurch nicht alle Bereiche des Biosensors in den Auswertungen berücksichtigt werden konnten und eine regelhafte Anwendung fraglich ist.

Tab. 26 Einfluss von Urea und NaCl auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}.

Puffer mAk (Spot)	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]		
	MOPS ohne Urea (pH 6,0) # [Tab. 24]	MOPS mit 3 M Urea (pH 6,0)	MOPS mit 6 M Urea (pH 6,0)
α -GFV ₆₅₃₈	5,93 \pm 0,52	4,55 \pm 0,17 → * α -GFV ₆₅₃₈ (ohne Urea)	4,69 \pm 0,87 → * α -GFV ₆₅₃₈ (ohne Urea)
α -DENV ₄	6,06 \pm 0,27 ↓ n. s. α -GFV ₆₅₃₈ (ohne Urea)	3,75 \pm 0,19 → * α -DENV ₄ (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (3 M Urea)	3,27 \pm 0,21 → * α -DENV ₄ (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (6 M Urea)
α -FSMEV ₁₄₉₃	1,03 \pm 1,00 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (ohne Urea)	0,79 \pm 0,15 → n. s. α -FSMEV ₁₄₉₃ (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (3 M Urea)	0,33 \pm 0,12 → * α -FSMEV ₁₄₉₃ (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (6 M Urea)
α -all-Flavi	4,94 \pm 0,28 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (ohne Urea)	2,97 \pm 0,13 → * α -all-Flavi (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (3 M Urea)	1,71 \pm 0,12 → * α -all-Flavi (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (6 M Urea)
α -VACV _{A1}	4,72 \pm 0,44 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (ohne Urea)	1,29 \pm 0,51 → * α -VACV _{A1} (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (3 M Urea)	0,05 \pm 0,18 → * α -VACV _{A1} (ohne Urea) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (6 M Urea)

Tabelle zu Abb. 19. #: Ergebnisse aus vorherigen Messungen (Tab. 24). Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; n. s.: nicht signifikant; →: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenzeile gegenüber den Messergebnissen ohne Urea; ↓: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des α -GFV₆₅₃₈ ohne Urea, 3 M Urea oder 6 M Urea im Messpuffer. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Des Weiteren wurde die Wirkung des Detergens Tween 20 auf die Spezifität der Bindung der Antikörper untersucht. Die Zugabe von Tween 20 in den Messpuffer (0,05 %) resultierte in einer massiven Anreicherung von (Mikro-)Luftblasen in der Flusszelle, wodurch keine adäquate Auswertung der Messungen unter MOPS-Tween vorgenommen werden konnte.

Einfluss des pH-Wertes

Es wurden Messungen in MOPS-Puffer mit den pH-Werten 7,2, 7,4 sowie 7,6 vorgenommen (Abb. 20A-D) und mit den Ergebnissen unter der initialen Bedingung (pH-Wert 6,0) verglichen.

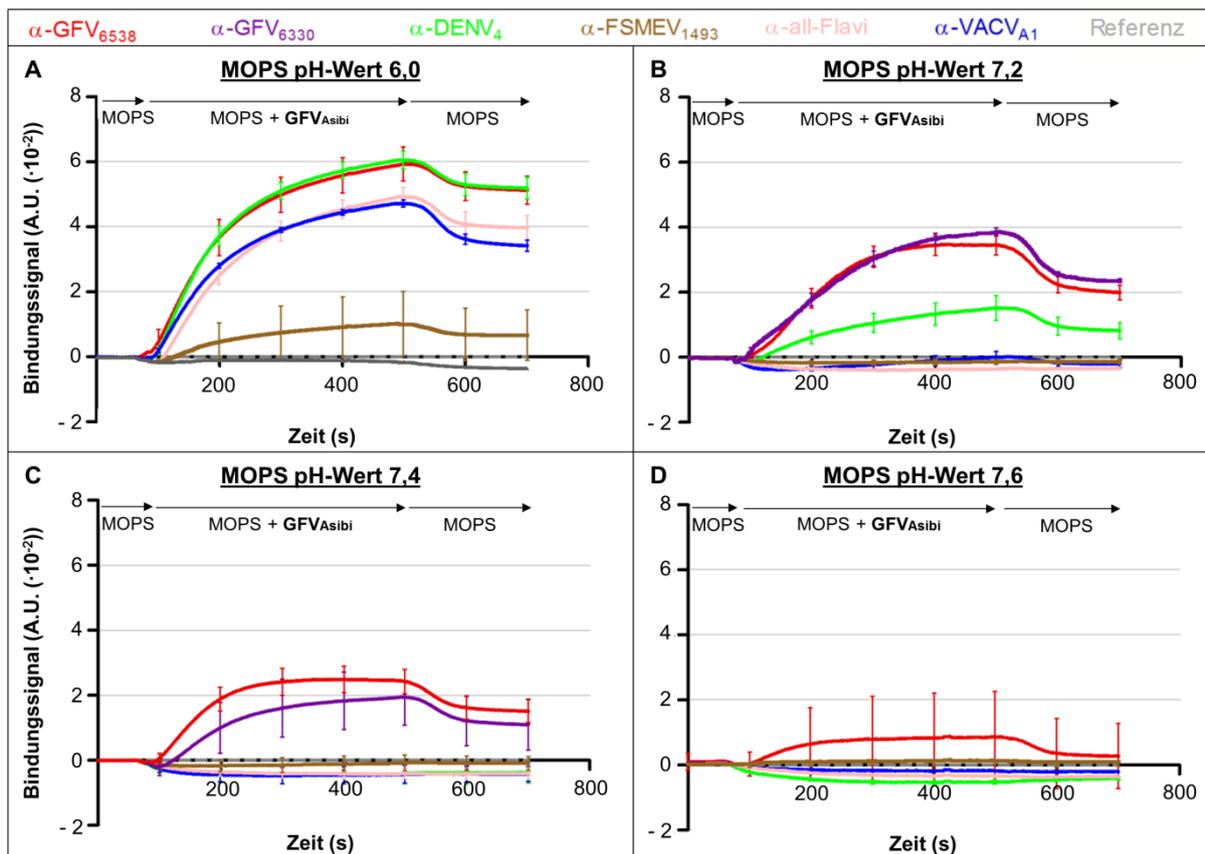


Abb. 20 Einfluss des pH-Wertes des Messpuffers auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden mit dem GFV-Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorenareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Biosensor-Schichtdicke im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Eine Schichtdickenreduktion führte zur Signalverringerng. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 27 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS-Puffer [A]: pH-Wert 6,0; [B]: 7,2; [C]: 7,4; [D]: 7,6. Mittelwert \pm SD, $n \geq 7$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Die Erhöhung des pH-Wertes führte nach Zugabe des GFV_{Asibi} zu einer statistisch signifikanten Verringerung der maximalen Bindungssignale aller untersuchten Antikörper (Tab. 27). Zwar kam es auch zu einer signifikanten Abnahme des maximalen Signals des α -GFV₆₅₃₈ mAk, jedoch war die Signalreduktion gegenüber den anderen Antikörpern insgesamt geringer. Während bei pH-Wert 7,2 noch ein Bindungssignal des α -DENV₄ detektiert werden konnte, war das GFV_{Asibi} bei pH-Wert 7,4 nur noch durch die mAk α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ zu detektieren. Unter pH-Wert 7,6 war für keinen der mAk eine (relevante) Bindung zu detektieren.

Insgesamt führte die Erhöhung des pH-Wertes des Messpuffer auf 7,4 zu einer Verbesserung hinsichtlich des spezifischen α -GFV mAk-vermittelten Nachweises des GFV_{Asibi}, da bis auf die mAk α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ keiner der weiteren untersuchten Antikörper eine Bindung des GFV_{Asibi} zeigte.

Tab. 27 Einfluss des pH-Wertes des Messpuffers auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}

mAk \ pH-Wert	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]			
	6,0 [#] [Tab. 24]	7,2	7,4	7,6
α -GFV ₆₅₃₈	5,93 \pm 0,52	3,48 \pm 0,30 →* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 6,0)	2,49 \pm 0,40 →* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 6,0)	0,88 \pm 1,38 →* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 6,0)
α -GFV ₆₃₃₀	n. b.	3,87 \pm 0,13 ↓ n. s. α -GFV ₆₅₃₈ (pH 7,2)	1,95 \pm 0,86 ↓* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 7,4)	n. b.
α -DENV ₄	6,06 \pm 0,27 ↓ n. s. α -GFV ₆₅₃₈ (pH 6,0)	1,52 \pm 0,38 →* α -DENV ₄ (pH 6,0) ↓* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 7,2)	< Referenz	< Referenz
α -FSMEV ₁₄₉₃	1,03 \pm 1,00 ↓* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 6,0)	< Referenz	< Referenz	< Referenz
α -all-Flavi	4,94 \pm 0,28 ↓* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 6,0)	< Referenz	< Referenz	< Referenz
α -VACV _{A1}	4,72 \pm 0,44 ↓* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 6,0)	0,01 \pm 0,18 →* α -VACV _{A1} (pH 6,0) ↓* α -GFV ₆₅₃₈ (pH 7,2)	< Referenz	< Referenz

Tabelle zu Abb. 20. #: Ergebnisse aus vorherigen Messungen (Tab. 24). Mittelwert \pm SD, $n \geq 7$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; n. s.: nicht signifikant; →: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenzeile gegenüber den Messergebnissen unter pH-Wert 6,0 (initiale Bedingung); ↓: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des α -GFV₆₅₃₈ unter den pH-Werten 6,0, 7,2, 7,4 oder 7,6. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt). n. b.: nicht bestimmt. Messbedingungen: MOPS-Puffer + GFV_{Asibi}. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Einfluss von Temperatur und Ionenstärke

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zum Einfluss des Messpuffer-pH-Wertes auf die Viruspezifität der Antikörper (Tab. 27, Abb. 20 C), wurden die Untersuchungen bei einem pH-Wert des MOPS-Puffers von 7,4 durchgeführt. Der Effekt einer Erhöhung der Temperatur auf 37 °C ist in Abbildung 21A dargestellt. Es zeigte sich gegenüber den Messungen bei Raumtemperatur (22 °C) eine statistisch signifikante Abnahme des maximalen Bindungssignals des α -GFV₆₅₃₈ mAk (-75 %), nicht jedoch des α -GFV₆₃₃₀ mAk (-14 %) (Tab. 28). Der α -GFV₆₃₃₀ mAk zeigte damit unter 37 °C ein höheres maximales Signal als der α -GFV₆₅₃₈ mAk. Bei 22 °C lag ein umgekehrtes Verhältnis vor. Für die weiteren untersuchten mAk α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, α -all-Flavi und α -VACV_{A1} wurden bei 37 °C keine Signale detektiert, die über der Referenz lagen.

Insgesamt resultierte die Erhöhung der Messtemperatur von 22 °C auf 37 °C in einem anderen Signalmuster der α -GFV mAk, wobei für die anderen untersuchten mAk keine Bindungssignale detektiert wurden. Der α -GFV mAk-vermittelte Nachweis des GFV_{Asibi} ist demnach auch unter 37 °C möglich. Eine Verbesserung der Messbedingungen zum Nachweis des GFV_{Asibi}, z. B. hinsichtlich einer Steigerung der Bindungssignalintensität, konnte durch die Temperaturerhöhung jedoch nicht erzielt werden.

Darüber hinaus wurde auch der Einfluss von 150 mM Natriumchlorid (NaCl) im Messpuffer untersucht. Der Effekt von 150 mM NaCl im Messpuffer MOPS (pH-Wert 7,4; 37 °C) auf die Bindungssignale der Antikörper ist Abbildung 21B zu entnehmen. Für keinen der untersuchten Antikörper konnte ein Signal detektiert werden, welches größer als die Referenz war. Gegenüber den NaCl-freien Bedingungen (Abb. 20 C, Tab. 27) kommt es somit unter MOPS-NaCl zu einer vollständigen Aufhebung der Bindung des GFV_{Asibi} an die mAk α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀. Die Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen zum Effekt von NaCl im Messpuffer bei Raumtemperatur (Abb. A37).

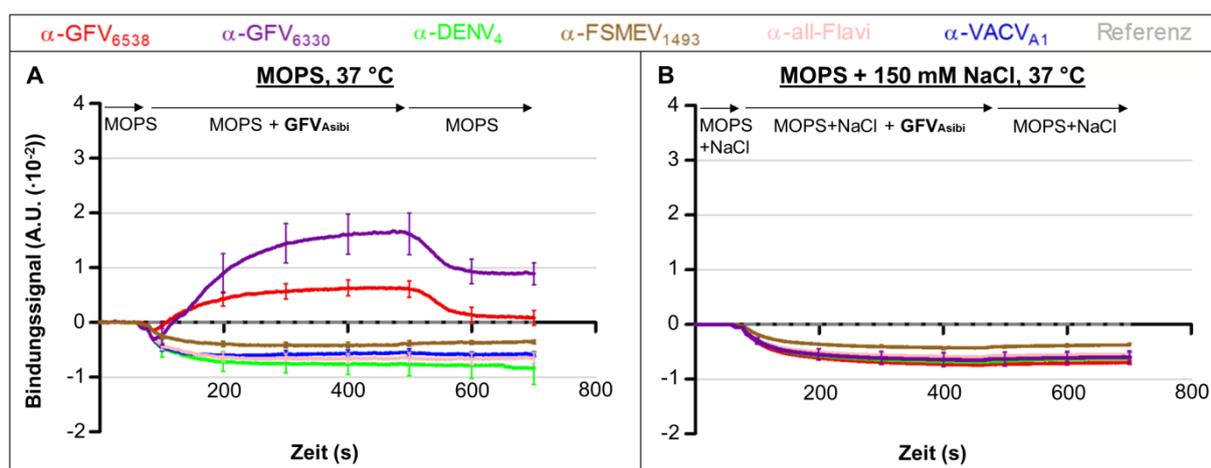


Abb. 21 Einfluss von Messtemperatur (37 °C) und Ionenstärke auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit dem GFV-Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) überströmt. Bei Virusbindung an die Antikörper erfolgt im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) eine Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, welches sich in einer Erhöhung des Bindungssignals äußert. Eine Schichtdickenreduktion führte zur Signalverringerng. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 28 zu entnehmen. Messbedingungen: [A]: MOPS-Puffer (pH-Wert 7,4), 37 °C; [B]: MOPS-Puffer (pH-Wert 7,4), 150 mM NaCl, 37 °C. Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Tab. 28 Einfluss von Messtemperatur und Ionenstärke auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}.

Temperatur mAk	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]		
	22 °C (MOPS, pH 7,4) [#] [Tab. 27]	37 °C (MOPS, pH 7,4)	37 °C (MOPS + 150 mM NaCl, pH 7,4)
α -GFV ₆₅₃₈	2,49 \pm 0,40	0,63 \pm 0,15 → * α -GFV ₆₅₃₈ (22 °C)	< Referenz
α -GFV ₆₃₃₀	1,95 \pm 0,86 ↓ * GFV ₆₅₃₈ (22 °C)	1,67 \pm 0,34 → n.s. α -GFV ₆₃₃₀ (22 °C) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (37 °C)	< Referenz
α -DENV ₄	< Referenz	< Referenz	< Referenz
α -FSMEV ₁₄₉₃	< Referenz	< Referenz	< Referenz
α -all-Flavi	< Referenz	< Referenz	< Referenz
α -VACV _{A1}	< Referenz	< Referenz	< Referenz

Tabelle zu Abb. 21. #: Ergebnisse aus vorherigen Messungen (Tab. 27). Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; n. s.: nicht signifikant; →: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenzeile gegenüber den Messergebnissen bei 22 °C; ↓: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des α -GFV₆₅₃₈ bei 22 °C oder 37 °C. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Einfluss des Messpuffers

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zum Einfluss des Messpuffer-pH-Wertes auf die Virusspezifität der Antikörper (Tab. 27) erfolgte die Testung weiterer Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 (Abb. 22).

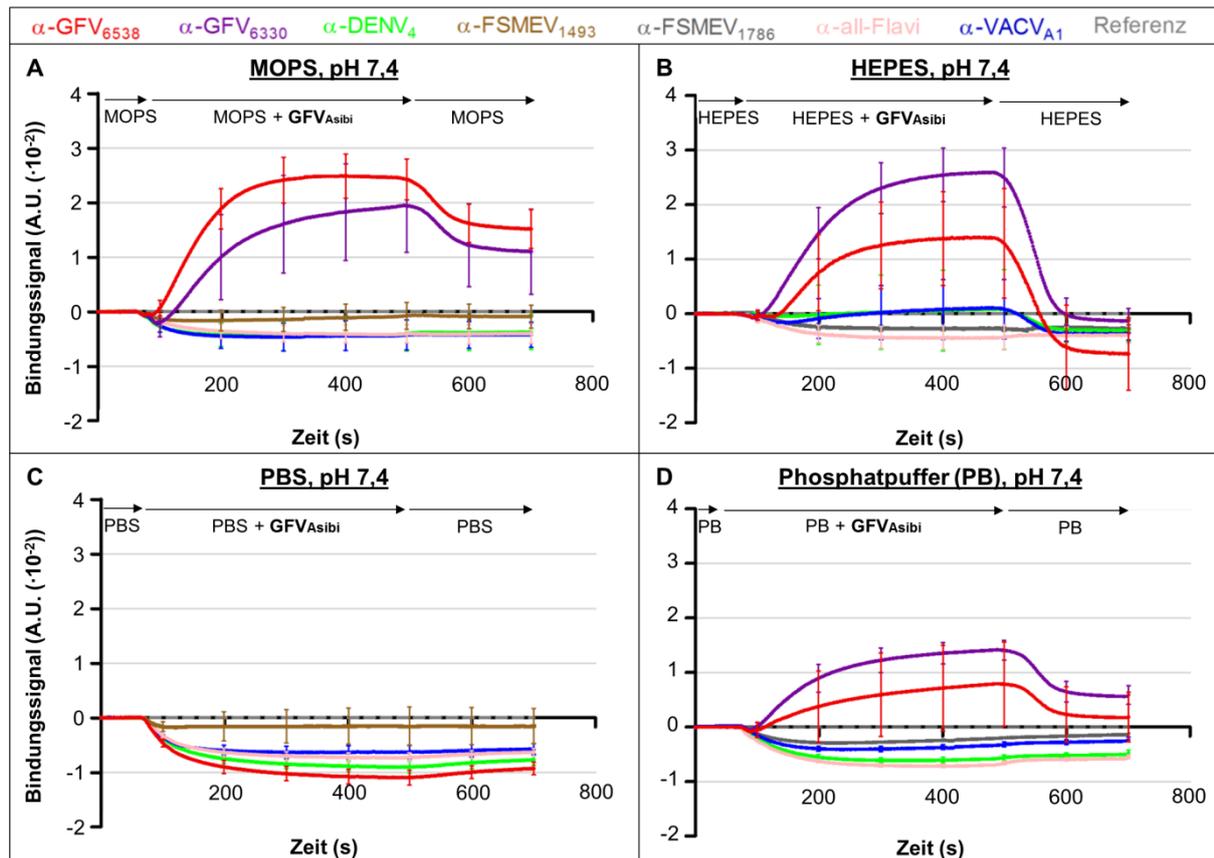


Abb. 22 Einfluss des Messpuffers auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit dem Gelbfiebertvirus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorenareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Eine Schichtdickenreduktion führte zur Signalverringering. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 29 zu entnehmen. Getestete Puffer (jeweils pH-Wert 7,4): [A]: MOPS; [B]: HEPES; [C]: Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS); [D]: Phosphatpuffer (PB). Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Die mit dem Messpuffer HEPES (pH-Wert 7,4) erzielten Ergebnisse sind im Wesentlichen mit den Ergebnissen des MOPS-Puffers (pH-Wert 7,4) vergleichbar (Tab. 29). Relevante Unterschiede zeigten sich in Hinblick auf die Signale beider α -GFV mAk. Demnach wies der α -GFV₆₅₃₈ mAk unter MOPS und der α -GFV₆₃₃₀ mAk unter HEPES das jeweils stärkste Bindungssignal auf. Des Weiteren kam es durch Spülung der Flusszelle mit MOPS, im Verhältnis zum jeweiligen maximalen Signal, zu Verringerungen der Messsignale um 39 % (α -GFV₆₅₃₈) bzw. 44 % (α -GFV₆₃₃₀). Unter HEPES kam es demgegenüber zu einer vollständigen Abwaschung der Virionen während der Spülung der Flusszelle.

Die Verwendung des Puffers PBS führte nicht zu einer Verbesserung der Messbedingungen, da die Signale aller Antikörper nach Zugabe des GFV_{Asibi} geringer als die Referenz waren und somit der Nachweis des GFV_{Asibi} nicht möglich war. Unter Phosphatpuffer (PB) konnte das GFV_{Asibi} spezifisch durch die α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ mAk nachgewiesen werden. Allerdings waren die maximalen Bindungssignale der beiden α -GFV mAk in der Gesamtschau geringer als unter MOPS oder HEPES (jeweils pH-Wert 7,4).

Tab. 29 Einfluss des Messpuffers auf die maximalen Bindungssignale der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}.

Puffer mAk	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]				
	MOPS (pH 6,0) [#] [Tab. 24]	MOPS (pH 7,4) [#] [Tab. 27]	HEPES (pH 7,4)	PBS (pH 7,4)	PB (pH 7,4)
α -GFV ₆₅₃₈	5,93 \pm 0,52	2,49 \pm 0,40	1,39 \pm 0,89 → * α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS 7,4)	< Referenz	0,79 \pm 0,78 → * α -GFV ₆₃₃₀ (MOPS 7,4)
α -GFV ₆₃₃₀	n. b.	1,95 \pm 0,86 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS 7,4)	2,59 \pm 0,50 → * α -GFV ₆₃₃₀ (MOPS 7,4) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (HEPES 7,4)	n. b.	1,42 \pm 0,18 → n. s. α -GFV ₆₃₃₀ (MOPS 7,4) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (PB 7,4)
α -DENV ₄	6,06 \pm 0,27 ↓ n.s. α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS 6,0)	< Referenz	0,09 \pm 0,75 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (HEPES 7,4) ↓ * α -GFV ₆₃₃₀ (HEPES 7,4)	< Referenz	< Referenz
α -FSMEV ₁₄₉₃	4,94 \pm 0,28 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS 6,0)	< Referenz	n. b. [§]	< Referenz	n. b. [§]
α -all-Flavi	1,03 \pm 1,00 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS 6,0)	< Referenz	< Referenz	< Referenz	< Referenz
α -VACV _{A1}	4,72 \pm 0,44 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS 6,0)	< Referenz	0,11 \pm 0,56 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (HEPES 7,4) ↓ * α -GFV ₆₃₃₀ (HEPES 7,4)	< Referenz	< Referenz

Tabelle zu Abb. 22. #: Ergebnisse aus vorherigen Messungen (Tab. 24 und 27). Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; n. s.: nicht signifikant; →: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenzeile gegenüber den Messergebnissen unter MOPS (pH-Wert 7,4); ↓: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des mAk α -GFV₆₅₃₈ bzw. α -GFV₆₃₃₀ unter MOPS (pH-Wert 6,0 oder 7,4) oder HEPES (pH-Wert 7,4). < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt). §: α -FSMEV₁₇₈₆ mAk: < Referenz. Messbedingungen: MOPS, HEPES, Phosphatpuffer (PB) oder Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) + GFV_{Asibi}. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. n. b.: nicht bestimmt; A.U.: *Arbitrary Unit*.

Der Vergleich der erzielten Ergebnisse unter HEPES (pH-Wert 7,4) mit den Ergebnissen unter den initialen Messpufferbedingungen (MOPS, pH-Wert 6,0) zeigt eine signifikante Verringerung der maximalen Bindungssignale der mAk α -DENV₄, α -all-Flavi (< Referenz) und α -VACV_{A1} nach Zugabe des GFV_{Asibi} (Tab. 29). Zwar kam es auch zu einer Signalreduktion beim α -GFV₆₅₃₈ mAk, jedoch in geringerem Umfang als bei den anderen mAk. Der ebenfalls getestete α -GFV₆₃₃₀ mAk wies unter allen getesteten Antikörpern unter HEPES (pH-Wert 7,4) das höchste Bindungssignal auf.

Insgesamt konnte mit den Messpuffern HEPES (pH-Wert 7,4) und MOPS (pH-Wert 7,4) im Vergleich zu den initialen Messbedingungen (MOPS, pH-Wert 6,0) eine Steigerung des spezifischen α -GFV mAk-vermittelten Nachweises des GFV_{Asibi} erzielt werden.

Fazit der Optimierung der initialen Messbedingungen zur Steigerung der Virusspezifität der Antikörper

Es zeigte sich, dass insbesondere durch die Erhöhung des pH-Wertes des Messpuffers MOPS auf 7,4 bzw. durch die Verwendung des Messpuffers HEPES (pH-Wert 7,4) eine signifikante Verbesserung der untersuchten mAk-Kombination in Hinblick auf den spezifischen α -GFV mAk-vermittelten Nachweis des GFV_{Asibi} erzielt werden konnte. Für die nachfolgenden Untersuchungen zur Virusspezifität der Antikörper unter den optimierten Bedingungen wurden daher die Messpuffer MOPS und HEPES (jeweils pH-Wert 7,4) ausgewählt.

Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass Veränderungen der Messbedingungen im Sinne einer Änderung des pH-Wertes des Messpuffers, der Messtemperatur oder der Pufferzusammensetzung in durch die Biosensor-Technologie detektierbaren Änderungen der Messsignale resultierten.

3.2.2.3 Spezifität der Antikörper unter den optimierten Messbedingungen

Die Spezifität der mAk α -GFV₆₅₃₈, α -GFV₆₃₃₀, α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi und α -VACV_{A1} hinsichtlich der Virustypen GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₄, FSMEV und VACV wurde, unter Berücksichtigung der Ergebnisse zum Einfluss der Messbedingungen (3.2.2.2), mit den Messpuffern MOPS bzw. HEPES (jeweils pH-Wert 7,4) untersucht.

Nachweis des Gelbfiebersvirus (Stamm Asibi)

Die Optimierung der initialen Messbedingungen zur Steigerung der Spezifität der Antikörper erfolgte anhand des GFV_{Asibi} (3.2.2.2). Der Nachweis des GFV_{Asibi} unter Verwendung der Messpuffer MOPS bzw. HEPES (jeweils pH-Wert 7,4) war somit Teil der Optimierungsuntersuchungen, weshalb diese Ergebnisse bereits in Abb. 22 bzw. Tab. 29 dargestellt sind und hier nicht wiederholt abgebildet wurden.

Nachweis des Gelbfiebersvirus (Stamm 17D)

Sowohl unter MOPS- als auch unter HEPES-Puffer zeigten die mAk α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ nach Zugabe des GFV_{17D} deutliche positive Signale (Abb. 23A), wobei Unterschiede hinsichtlich der maximalen Bindungssignalstärke zwischen beiden mAk vorlagen (Tab. 30). Der α -GFV₆₃₃₀ mAk zeigte unabhängig vom Messpuffer statistisch signifikant größere maximale Signale als der α -GFV₆₅₃₈ mAk.

Tab. 30 Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des GFV_{17D} unter den optimierten Messbedingungen.

Puffer mAk	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]	
	MOPS pH 7,4	HEPES pH 7,4
α -GFV ₆₅₃₈	0,91 \pm 0,41	0,56 \pm 0,09 → * α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS pH 7,4)
α -GFV ₆₃₃₀	2,09 \pm 0,19 ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (MOPS pH 7,4)	0,83 \pm 0,34 → * α -GFV ₆₃₃₀ (MOPS pH 7,4) ↓ * α -GFV ₆₅₃₈ (HEPES pH 7,4)
α -DENV ₄	< Referenz	< Referenz
α -FSMEV ₁₄₉₃	< Referenz	n. b.
α -FSMEV ₁₇₈₆	< Referenz	< Referenz
α -all-Flavi	< Referenz	< Referenz
α -VACV _{A1}	< Referenz	< Referenz

Tabelle zu Abb. 23. Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; →: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenzeile gegenüber den Messergebnissen unter MOPS (pH-Wert 7,4); ↓: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des α -GFV₆₅₃₈ unter MOPS oder HEPES (jeweils pH-Wert 7,4). < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt). Messbedingungen: MOPS oder HEPES-Puffer + GFV_{17D}. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. n. b.: nicht bestimmt. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Darüber hinaus waren die maximalen Messsignale unter MOPS-Puffer für beide mAk statistisch signifikant größer als unter HEPES-Puffer. Für die weiteren getesteten mAk α -DENV₄, α -all-Flavi und α -VACV_{A1} konnten nach Zugabe des GFV_{17D} keine Signale detektiert werden, welche größer als die Referenz waren.

Insgesamt war unter den Pufferbedingungen MOPS und HEPES der Nachweis des GFV_{17D} möglich und dies ausschließlich durch die mAk α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀.

Nachweis des Denguevirus (Serotyp 4)

Unter Verwendung des Messpuffers MOPS (Tab. 31, Abb. 23B) konnte das DENV₄ durch den α -DENV₄ mAk nicht detektiert werden. Lediglich die α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ mAk zeigten nach Viruszugabe Signale. Diese Ergebnisse wurden auch in weiteren Tests mit PB bestätigt (Abb. A38, Tab. A38). Demgegenüber kam es unter HEPES auch bei dem α -DENV₄ mAk zu einem deutlichen Bindungssignal. Dieses war in Bezug auf die maximale Signalstärke jedoch statistisch signifikant geringer als das des α -GFV₆₃₃₀ mAk und unterschied sich nicht vom α -GFV₆₅₃₈ mAk-Signal. Darüber hinaus konnten in HEPES auch für die mAk α -all-Flavi und α -VACV_{A1} Signale detektiert werden, welche jedoch hinsichtlich ihrer maximalen Signale statistisch signifikant geringer als die des α -DENV₄ mAk waren.

Tab. 31 Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des DENV₄ unter den optimierten Messbedingungen.

Puffer mAk	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]	
	MOPS pH 7,4	HEPES pH 7,4
α -GFV ₆₅₃₈	2,17 \pm 0,61	2,99 \pm 0,08 ↓ n.s. α -DENV ₄ (HEPES pH 7,4)
α -GFV ₆₃₃₀	2,16 \pm 0,43	3,93 \pm 1,05 ↓ * α -DENV ₄ (HEPES pH 7,4)
α -DENV ₄	< Referenz	2,95 \pm 0,99
α -FSMEV ₁₄₉₃	n. b.	n. b.
α -FSMEV ₁₇₈₆	< Referenz	< Referenz
α -all-Flavi	< Referenz	0,78 \pm 0,68 ↓ * α -DENV ₄ (HEPES pH 7,4)
α -VACV _{A1}	< Referenz	0,35 \pm 0,25 ↓ * α -DENV ₄ (HEPES pH 7,4)

Tabelle zu Abb. 23. Mittelwert \pm SD, $n \geq 10$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; n. s.: nicht signifikant; \rightarrow : Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenzeile gegenüber den Messergebnissen unter MOPS (pH-Wert 7,4); \downarrow : Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des α -DENV₄ unter HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4). < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt). Messbedingungen: MOPS oder HEPES-Puffer + DENV₄. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. n. b.: nicht bestimmt. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Insgesamt war nur unter HEPES der Nachweis des DENV₄ durch den α -DENV₄ mAk möglich. Es zeigten sich unter diesen Bedingungen jedoch auch bei anderen Antikörpern (α -GFV₆₃₃₀, α -GFV₆₅₃₈) zum Teil starke Signale.

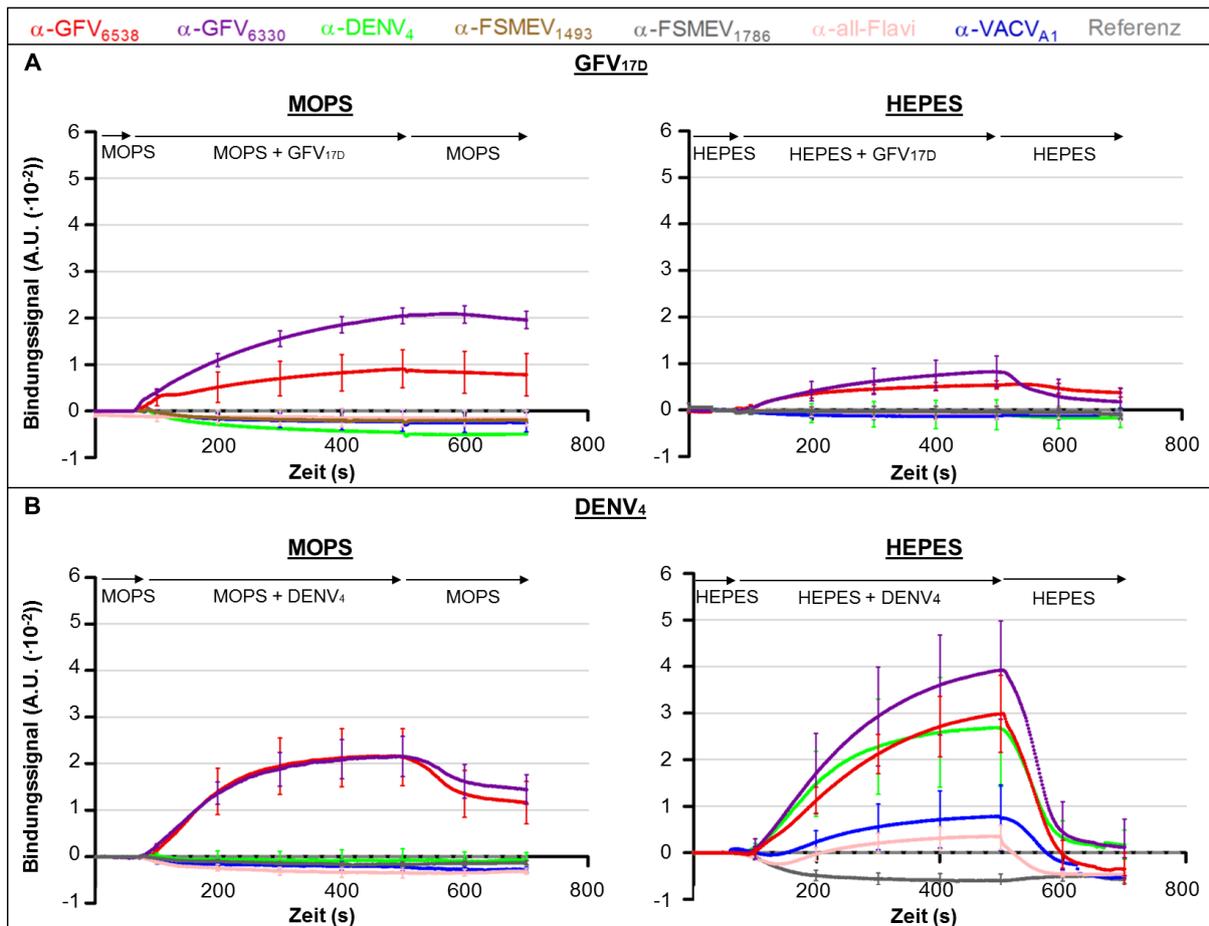


Abb. 23 Spezifität der Antikörper hinsichtlich der Virustypen GFV_{17D} und DENV₄ unter den optimierten Messbedingungen. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit dem [A]: Gelbfieberevirus Stamm 17D (GFV_{17D}; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) und [B]: Denguevirus Serotyp 4 (DENV₄) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in der Zunahme des Bindungssignals. Eine Schichtdickenreduktion führte zur Signalverringerng. Die jeweils maximalen Bindungssignale sind den Tab. 30 und 31 zu entnehmen. Messbedingungen: MOPS- und HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4). Mittelwert \pm SD, GFV_{17D}: $n \geq 8$, DENV₄: $n \geq 10$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Nachweis des FSME-Virus

Da vorangegangene Messungen bei pH-Wert 7,4 (Abb. 23B) gezeigt haben, dass der Nachweis des DENV₄ nur unter HEPES möglich war, wurde die Spezifität der Antikörper hinsichtlich des FSMEV-Nachweises mit diesem Messpuffer untersucht. Aufgrund der geringen Signalstärken der α -FSMEV mAk beim FSMEV-Nachweis unter den initialen Messbedingungen (Abb. 17C), erfolgte eine Erhöhung der Virusmenge in der Probe. Unter Verwendung der dreifachen FSMEV-Menge ($4,8 \cdot 10^6$ PFU) zeigte der α -FSMEV₁₇₈₆ mAk das stärkste Bindungssignal (Abb. 24A). Dieses unterschied sich statistisch signifikant und in relevantem Umfang von den schwächeren Bindungssignalen der anderen mAk α -DENV₄, α -VACV_{A1}, α -all-Flavi bzw. α -GFV₆₅₃₈ sowie α -GFV₆₃₃₀ (Tab. 32). Insgesamt war der FSMEV-Nachweis unter Verwendung von HEPES spezifisch über den α -FSMEV₁₇₈₆ möglich.

Nachweis des Vacciniavirus

Analog zum vorherigen FSMEV-Nachweis erfolgte die Messung des VACV bei pH-Wert 7,4 auch nur mit HEPES-Puffer (Abb. 24B). Verhältnismäßig schwache Bindungssignale des α -VACV_{A1} mAk unter den initialen Messbedingungen (Abb. 17D) erforderten auch hier die Erhöhung der applizierten Virusmenge ($4,8 \cdot 10^6$ PFU).

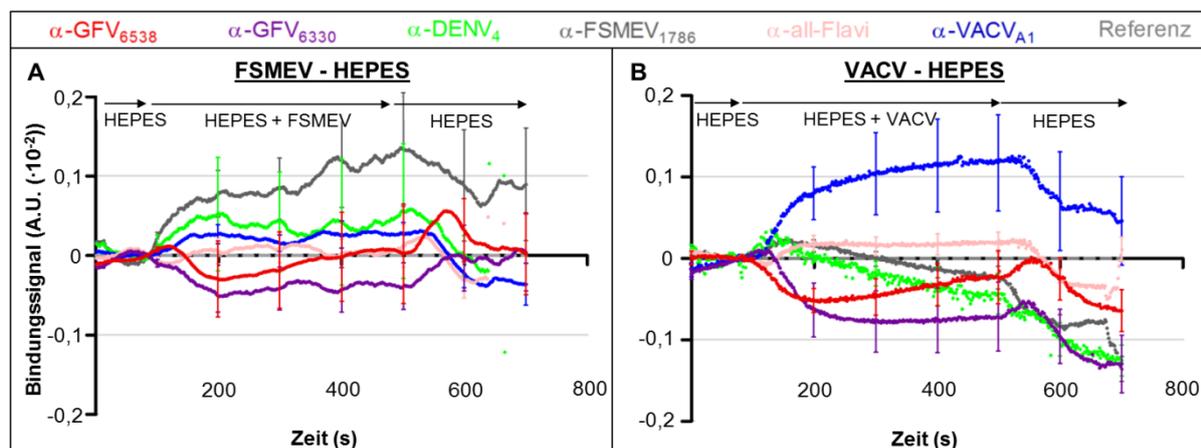


Abb. 24 Spezifität der Antikörper hinsichtlich der Virustypen FSMEV und VACV unter den optimierten Messbedingungen. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit dem [A]: FSME-Virus (FSMEV; $4,8 \cdot 10^6$ PFU) oder [B]: Vacciniavirus (VACV; $4,8 \cdot 10^6$ PFU) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in der Zunahme des Bindungssignals. Eine Schichtdickenreduktion führte zur Signalverringern. Die jeweils maximalen Bindungssignale sind der Tab. 32 zu entnehmen. Messbedingungen: HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4). Mittelwert \pm SD, FSMEV: $n \geq 6$, VACV: $n \geq 6$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Tab. 32 Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des FSMEV und VACV unter den optimierten Messbedingungen.

		Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]	
Virus		FSMEV (HEPES pH 7,4)	VACV (HEPES pH 7,4)
mAk			
	α -GFV ₆₅₃₈	0,06 \pm 0,05 \downarrow * α -FSMEV ₁₇₈₆ (HEPES pH 7,4)	< Referenz
	α -GFV ₆₃₃₀	< Referenz	< Referenz
	α -DENV ₄	0,06 \pm 0,09 \downarrow * α -FSMEV ₁₇₈₆ (HEPES pH 7,4)	0,03 \pm 0,01 \downarrow * α -VACV _{A1} (HEPES pH 7,4)
	α -FSMEV ₁₄₉₃	n. b.	n. b.
	α -FSMEV ₁₇₈₆	0,14 \pm 0,07	0,02 \pm 0,01 \downarrow * α -VACV _{A1} (HEPES pH 7,4)
	α -all-Flavi	0,02 \pm 0,03 \downarrow * α -FSMEV ₁₇₈₆ (HEPES pH 7,4)	0,02 \pm 0,01 \downarrow * α -VACV _{A1} (HEPES pH 7,4)
	α -VACV _{A1}	0,03 \pm 0,02 \downarrow * α -FSMEV ₁₇₈₆ (HEPES pH 7,4)	0,13 \pm 0,06

Tabelle zu Abb. 24. Mittelwert \pm SD, $n \geq 6$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; \downarrow : Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des α -FSMEV₁₇₈₆ bzw. des α -VACV_{A1} mAk. < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt). Messbedingungen: HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4) + FSMEV oder VACV. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. n. b.: nicht bestimmt. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Für den α -VACV_{A1} mAk konnte nach Zugabe des VACV ein statistisch signifikant von den anderen Antikörpern abgrenzbares, deutliches Bindungssignal registriert werden (Tab. 32), womit unter HEPES-Puffer der Nachweis des VACV durch den α -VACV_{A1} mAk spezifisch möglich war.

Einfluss von Zellkulturüberstand unter den optimierten Messbedingungen

Ergänzend wurde auch für die optimierten Testbedingungen (HEPES-Puffer, pH-Wert 7,4) der Einfluss durch Zellkulturbestandteile bzw. sonstige Bestandteile der Probe (z. B. β -Propiolacton) auf die Messsignale der mAk α -GFV₆₅₃₈, α -GFV₆₃₃₀, α -DENV₄, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi sowie α -VACV_{A1} ermittelt (Abb. 25). Für keinen Antikörper konnten Signale detektiert werden, welche größer als die Referenz waren.

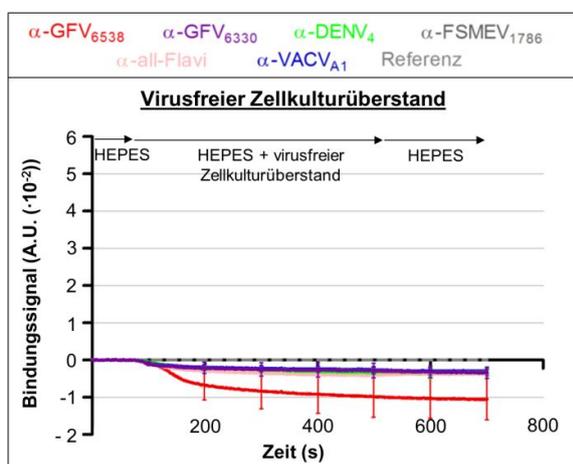


Abb. 25 Einfluss von Zellkulturüberstand auf die Bindungssignale unter den optimierten Bedingungen. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit Zellkulturüberstand nicht-infizierter Vero E6 Zellen (inkl. 0,1 % β -Propiolacton) überströmt. Eine Reduktion der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers resultiert in einer Verringerung des Bindungssignals. Messbedingungen: HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4) + virusfreier Zellkultur-überstand (1:5). Mittelwert \pm SD, $n \geq 18$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Fazit zur Spezifität der Antikörper für den Virusnachweis unter den optimierten Messbedingungen

Der Nachweis des GFV_{Asibi} und GFV_{17D} war sowohl unter den Messpuffern MOPS als auch HEPES (jeweils pH-Wert 7,4) mittels der mAk α -GFV₆₃₃₀ bzw. α -GFV₆₅₃₈ möglich, wobei die weiteren untersuchten Antikörper hierbei keine (relevanten) Signale zeigten. Der Nachweis des DENV₄ war lediglich unter Verwendung des Messpuffers HEPES über den α -DENV₄ mAk möglich, wobei die α -GFV mAk auch relevante Signale zeigten. Unter HEPES konnten sowohl das FSMEV als auch das VACV spezifisch detektiert werden. Die α -FSMEV₁₇₈₆ bzw. α -VACV_{A1} mAk wiesen hierbei jeweils das höchste Signal auf. In der Gesamtbetrachtung war ausschließlich unter der Verwendung des Messpuffers HEPES der Nachweis aller getesteten Viren möglich. Für jedes Virus zeigte sich ein spezifisches Bindungsmuster der mAk, wobei die spezifischen mAk hierbei das einzige bzw. stärkste Bindungssignal zeigten. Eine Ausnahme bildet das DENV₄.

3.2.3 Sensitivitätsuntersuchungen

3.2.3.1 Einfluss der immobilisierten Antikörpermenge auf den Virusnachweis

Welchen Einfluss die Spottingkonzentration der Antikörper auf die Signalstärke hat, wurde anhand der mAk α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ ermittelt. Diese wurden zusätzlich zur bisherigen Konzentration von 1 mg/ml (0,5 μ g/Spot) auch in den Konzentrationen 0,1 mg/ml (0,05 μ g/Spot) und 0,01 mg/ml (0,005 μ g/Spot) immobilisiert und mit dem GFV_{Asibi} überströmt (Abb. 26).

Die Untersuchungen ergaben, dass die maximalen Bindungssignale der Spots mit einer Antikörpermenge von 0,5 μ g im Mittel höher als die mit 0,05 μ g waren. Die maximale Signalstärke der Spots mit 0,005 μ g Antikörper war statistisch signifikant geringer als die der höheren Antikörpermengen (Tab. 33). Die geringste Antikörpermenge (0,005 μ g/Spot) war daher nicht für den Nachweis des Virus geeignet.

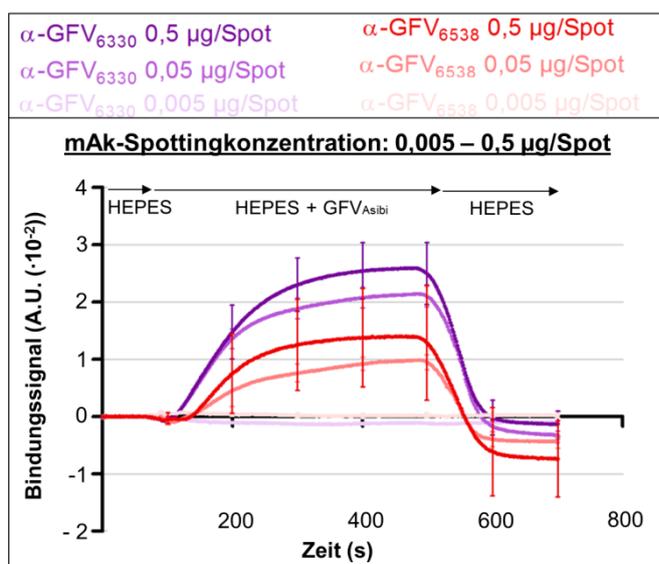


Abb. 26 Einfluss der Antikörper-Spottingkonzentration auf den Nachweis des GFV_{Asibi}. Die mAk α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ wurden in den Konzentrationen 1 mg/ml (0,5 μ g/Spot), 0,1 mg/ml (0,05 μ g/Spot) und 0,01 mg/ml (0,005 μ g/Spot) auf den Biosensor-Chips immobilisiert und mit dem Gelbfiebervirus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; 1,6 · 10⁶ PFU) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen mAk, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 33 zu entnehmen. Messbedingungen: HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4). Mittelwert \pm SD; n \geq 7. A.U.: Arbitrary Unit.

Tab. 33 Einfluss der Antikörper-Spottingkonzentration auf die maximalen Bindungssignale am Beispiel des GFV_{Asibi}.

		Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]		
Spottingmenge		0,5 μ g/Spot	0,05 μ g/Spot	0,005 μ g/Spot
mAk				
α -GFV ₆₅₃₈		1,39 \pm 0,89	0,99 \pm 0,13 → n.s. GFV ₆₅₃₈ (0,5 μ g/Spot)	0,02 \pm 0,05 → * GFV ₆₅₃₈ (0,5 μ g/Spot)
α -GFV ₆₃₃₀		2,59 \pm 0,50	2,14 \pm 0,18 → n.s. GFV ₆₃₃₀ (0,5 μ g/Spot)	< Referenz

Tabelle zu Abb. 26. Mittelwert \pm SD, n \geq 7. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test; *: p \leq 0,05; n. s.: nicht signifikant; →: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenzeile gegenüber den Messergebnissen mit 0,5 μ g/Spot. < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt). Messbedingungen: HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4) + 1,6 · 10⁶ PFU GFV_{Asibi}. A.U.: Arbitrary Unit.

3.2.3.2 Einfluss der Virusmenge auf den Nachweis – Ermittlung der Nachweisgrenze

Der Einfluss der Virusmenge auf die Stärke der Messsignale wurde untersucht, indem die auf den Biosensoren immobilisierten mAk α -GFV₆₃₃₀, α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi und α -VACV_{A1} mit steigenden GFV_{Asibi}-Virusmengen überströmt wurden ($1,0 \cdot 10^3$ PFU \rightarrow $5,0 \cdot 10^3$ PFU \rightarrow $1,0 \cdot 10^4$ PFU \rightarrow $5,0 \cdot 10^4$ PFU \rightarrow $1,0 \cdot 10^5$ PFU \rightarrow $5,0 \cdot 10^5$ PFU \rightarrow $1,0 \cdot 10^6$ PFU). Durch deren Akkumulation ergaben sich folgende über den Biosensor geströmte Virusmengen: beginnend mit $1,0 \cdot 10^3$ PFU, $6,0 \cdot 10^3$ PFU, $1,6 \cdot 10^4$ PFU, $6,6 \cdot 10^4$ PFU, $1,7 \cdot 10^5$ PFU und $6,7 \cdot 10^5$ PFU wurde die Virusmenge schließlich bis auf $1,7 \cdot 10^6$ PFU gesteigert. Die Messungen fanden mit einer verdoppelten Flussrate von $300 \mu\text{l}/\text{min}$ statt.

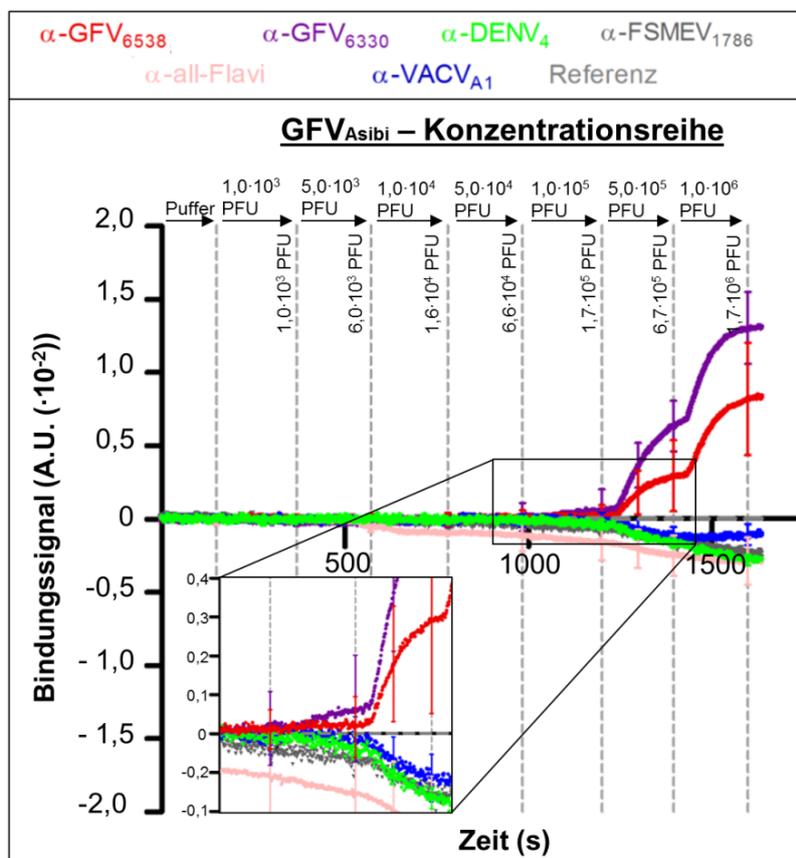


Abb. 27 Ermittlung der Nachweisgrenze. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden mit einer zunehmenden Menge ($1,0 \cdot 10^3$ PFU bis $1,7 \cdot 10^6$ PFU) des Gelbfiebervirus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}) mit einer Flussrate von $300 \mu\text{l}/\text{min}$ überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensoreale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Eine Schichtdickenreduktion führte zur Signalverringerung. Messbedingungen: HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4). Mittelwert \pm SD; $n \geq 8$. PFU: *Plaque Forming Units*, A.U.: *Arbitrary Unit*.

Ab einer GFV_{Asibi}-Virusmenge von $1,7 \cdot 10^5$ PFU zeigte sich im Mittel eine positive Korrelation zwischen insgesamt applizierter Virusmenge und Signalstärke des α -GFV₆₃₃₀ mAk. Ab einer Virusmenge von $6,7 \cdot 10^5$ PFU unterschieden sich die Messsignale beider α -GFV mAk signifikant von der Referenz. Die weitere Erhöhung der Virusmenge auf $1,7 \cdot 10^6$ PFU steigerte noch einmal deutlich die α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk-Messsignale. Für keinen der weiteren untersuchten mAk α -DENV₄, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi und

α -VACV_{A1} konnte nach Zugabe des GFV_{Asibi} ein positives Signal detektiert werden, welches sich in relevantem Umfang von der Referenz unterschied.

Insgesamt ist festzustellen, dass für die mAk α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ eine positive Korrelation zwischen der Stärke des Messsignals und der applizierten GFV_{Asibi}-Virusmenge bestand. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte eine sichere Nachweisgrenze des GFV_{Asibi} von $6,7 \cdot 10^5$ PFU ermittelt werden.

3.2.4 Nachweis von Viren in humanem Blutserum

Die Überprüfung, ob Viren mittels der SCORE-Technologie in humanem Blutserum (Serum) nachgewiesen werden können, erfolgte anhand des GFV_{Asibi}. Das verwendete Serum enthielt weder Flaviviren noch gegen Flaviviren gerichtete Antikörper. Es wurde für den Virusnachweis 1:100 (Abb. 28A) und 1:10 (Abb. 28B) mit Messpuffer (HEPES, pH-Wert 7,4) und GFV_{Asibi} ($1,6 \cdot 10^6$ PFU) versetzt. Für die Messung wurden die auf den Biosensoren immobilisierten mAk α -GFV₆₃₃₀, α -DENV₄ und α -VACV_{A1} mit dem Serum-Virus-Puffergemisch überströmt.

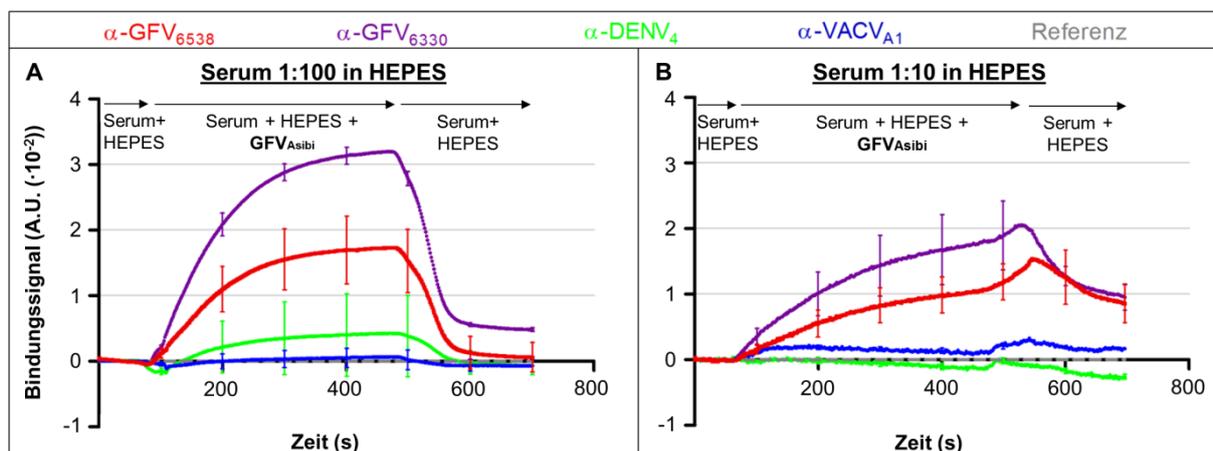


Abb. 28 Nachweis des GFV_{Asibi} in humanem Blutserum. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden mit $1,6 \cdot 10^6$ PFU des Gelbfiebertvirus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensoreareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 34 zu entnehmen. Messbedingungen: [A]: humanes Blutserum (Serum) 1:100 in HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4); [B]: Serum 1:100 in HEPES (pH-Wert 7,4). Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$. PFU: *Plaque Forming Units*, A.U.: *Arbitrary Unit*.

Sowohl in der 1:100 als auch in der 1:10 Serum-Verdünnung konnte das GFV_{Asibi} mittels der α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk nachgewiesen werden. Die maximalen Signale des α -GFV₆₃₃₀ mAk waren dabei jeweils statistisch signifikant größer als die des α -GFV₆₅₃₈ mAk. Darüber hinaus waren die Signalstärken unter dem 1:10 Serum-Puffergemisch insgesamt

geringer als unter dem 1:100 Serum-Puffergemisch (Tab. 34). Für keinen der weiteren untersuchten mAk α -DENV₄ und α -VACV_{A1} konnten Signale detektiert werden, welche sich in relevantem Umfang von der Referenz unterschieden.

Insgesamt war der Nachweis des GFV_{Asibi} in humanem Serum unter Verwendung der optimierten Testbedingungen (Messpuffer: HEPES, pH-Wert 7,4) erfolgreich.

Tab. 34 Maximale Bindungssignale der Antikörper beim Nachweis des GFV_{Asibi} in humanem Blutserum.

Probe mAk	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]	
	Serum 1:100 + GFV _{Asibi}	Serum 1:10 + GFV _{Asibi}
α -GFV ₆₃₃₀	3,20 \pm 0,14	2,06 \pm 0,53
α -GFV ₆₅₃₈	1,73 \pm 0,53 ↓ * GFV ₆₃₃₀ (Serum 1:100 + GFV _{Asibi})	1,54 \pm 0,39 ↓ * GFV ₆₃₃₀ (Serum 1:100 + GFV _{Asibi})
α -DENV ₄	0,43 \pm 0,65 ↓ * GFV ₆₃₃₀ (Serum 1:100 + GFV _{Asibi})	0,01 \pm 0,04 ↓ * GFV ₆₃₃₀ (Serum 1:100 + GFV _{Asibi})
α -VACV _{A1}	0,07 \pm 0,15 ↓ * GFV ₆₃₃₀ (Serum 1:100 + GFV _{Asibi})	0,30 \pm 0,03 ↓ * GFV ₆₃₃₀ (Serum 1:100 + GFV _{Asibi})

Tabelle zu Abb. 28. Mittelwert \pm SD, $n \geq 8$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$; ↓: Signifikanzanalyse innerhalb der entsprechenden Tabellenspalte gegenüber den Messergebnissen des α -GFV₆₃₃₀ mAk unter „Serum 1:100 + GFV_{Asibi}“ oder „Serum 1:10 + GFV_{Asibi}“. Messbedingungen: humanes Serum wurde 1:10 oder 1:100 mit HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4) verdünnt + $1,6 \cdot 10^6$ PFU GFV_{Asibi}. A.U.: Arbitrary Unit.

3.2.5 Nachweis von Antikörpern

Inwieweit mit der SCORE-Technologie der Nachweis von Antikörpern möglich ist, wurde überprüft, indem das GFV_{Asibi} sowie das Lysat GFV_{17D}-infizierter Zellen auf dem Biosensor-Chip immobilisiert und mit dem α -GFV₆₃₃₀ mAk (50 μ g, Messpuffer HEPES, pH-Wert 7,4) überströmt wurde (Abb. 29).

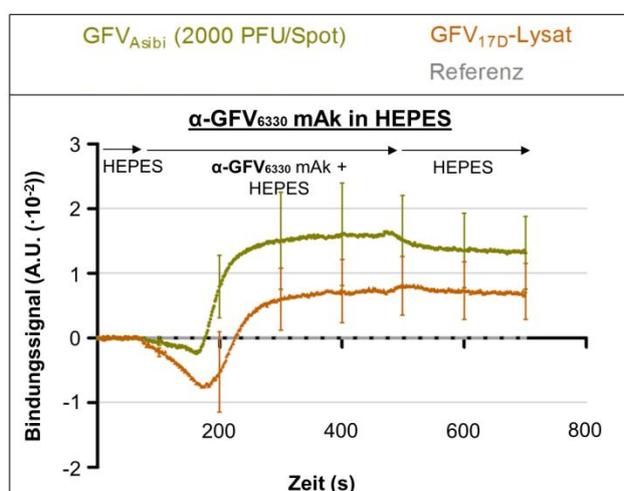


Abb. 29 Nachweis des monoklonalen Antikörpers α -GFV₆₃₃₀. Der Gelbfiebervirus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; 2000 PFU/Spot), das Lysat GFV_{17D}-infizierter Zellen (1:5 in Messpuffer) sowie das Lysat nicht-infizierter Zellen (Referenz für GFV_{17D}-Lysat) wurde auf den Biosensor-Chips immobilisiert und mit 50 μ g des α -GFV₆₃₃₀ mAk überströmt. Die mAk-Bindung an die Antigene führte zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal, dargestellt in einer Zunahme des Bindungssignals. Die maximalen Bindungssignale sind Tab. 35 zu entnehmen. Messpuffer: HEPES (pH-Wert 7,4). Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. Referenz für GFV_{Asibi}-Spot: Biosensorareale, auf denen weder GFV_{Asibi} noch Zelllysate immobilisiert wurde. PFU: Plaque Forming Units, A.U.: Arbitrary Unit.

Der Abbildung 29 ist zu entnehmen, dass mit 2000 PFU des GFV_{Asibi} pro Spot der Nachweis des α -GFV₆₃₃₀ mAk möglich ist. Das maximale Bindungssignal unterscheidet sich statistisch signifikant von der Referenz (hier: Biosensorareale ohne immobilisiertem GFV_{Asibi}) (Tab. 35). Darüber hinaus war auch der Nachweis des α -GFV₆₃₃₀ mAk auf Grundlage des immobilisierten Lysates von GFV_{17D}-infizierten Zellen möglich. Es konnte ein deutliches Signal detektiert werden, das sich statistisch signifikant von der Referenz (hier: Lysat nicht-infizierter Zellen) unterschied (Tab. 35).

Insgesamt war unter der Verwendung von Fängerpartikeln in Form von Viren sowie Virusantigen-haltigem Zelllysate der Nachweis von Antikörpern möglich.

Tab. 35 Maximale Bindungssignale im Rahmen des Nachweises des Antikörpers α -GFV₆₃₃₀.

Spot \ Probe	Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]
	α -GFV ₆₃₃₀ mAk
GFV _{Asibi} (2000 PFU/Spot)	1,65 \pm 0,79
GFV _{17D} -Zelllysate (1:5)	2,30 \pm 0,46

Tabelle zu Abb. 29. Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. Messbedingungen: HEPES-Puffer (pH-Wert 7,4). PFU: *Plaque Forming Units*; A.U.: *Arbitrary Unit*.

3.3 Indirekter Immunfluoreszenztest

Ergänzend zur Eignungsprüfung der SCORE-Technologie als neuartige Methode zum Virusnachweis wurden Untersuchungen mit einer anderen Nachweismethode (IIFT) vorgenommen. Diese diente dem Zweck, die erzielten Ergebnisse in Hinblick auf die Antikörperauswahl und den Virusnachweis zu vergleichen. Dafür sind die im Rahmen der Biosensor-Methode verwendeten Antikörper (Tab. 9) im IIFT (2.2.5) hinsichtlich des Nachweises der Viren GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₁₋₄, FSMEV und VACV überprüft worden. Wie in den Biosensor-Untersuchungen wurden neben der Identifizierung des besten Antikörpers für das jeweilige Virus außerdem die Spezifität der Antikörper hinsichtlich der verschiedenen Viren ermittelt.

3.3.1 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombinationen

Als beste Kombination galt jeweils die Virus-Antikörper-Variante, die aufgrund der spezifischen Bindung an virale Oberflächenproteine das stärkste Fluoreszenzsignal und gleichzeitig keine unspezifische Bindung an nicht-infizierte Zellen aufwies.

3.3.1.1 Nachweis des Gelbfiebervirus (Stamm Asibi und 17D)

Wie in Abbildung 30 ersichtlich, führte im IIFT der α -GFV₆₃₃₀ mAk beim Nachweis des GFV_{Asibi} (Abb. 30; 1A) mit Abstand zu den stärksten Signalen. Der α -GFV₆₅₃₈ mAk zeigte hingegen nur ein schwaches Fluoreszenzsignal (1B). Ein anderes Resultat ergab sich beim GFV_{17D}. Dieses Virus konnte durch beide GFV-mAk gut detektiert werden (2A, 2B). Der α -all-Flavi mAk zeigte bei beiden Virusstämmen schwache Signale (1C, 2C). Nach Inkubation von nicht-infizierten Zellen mit den drei Antikörpern waren keine unspezifischen Signale ersichtlich (3A-C).

Insgesamt sind bezüglich der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Virusstamm GFV_{Asibi} der α -GFV₆₃₃₀ mAk und für den Virusstamm GFV_{17D} die mAk α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ zu nennen.

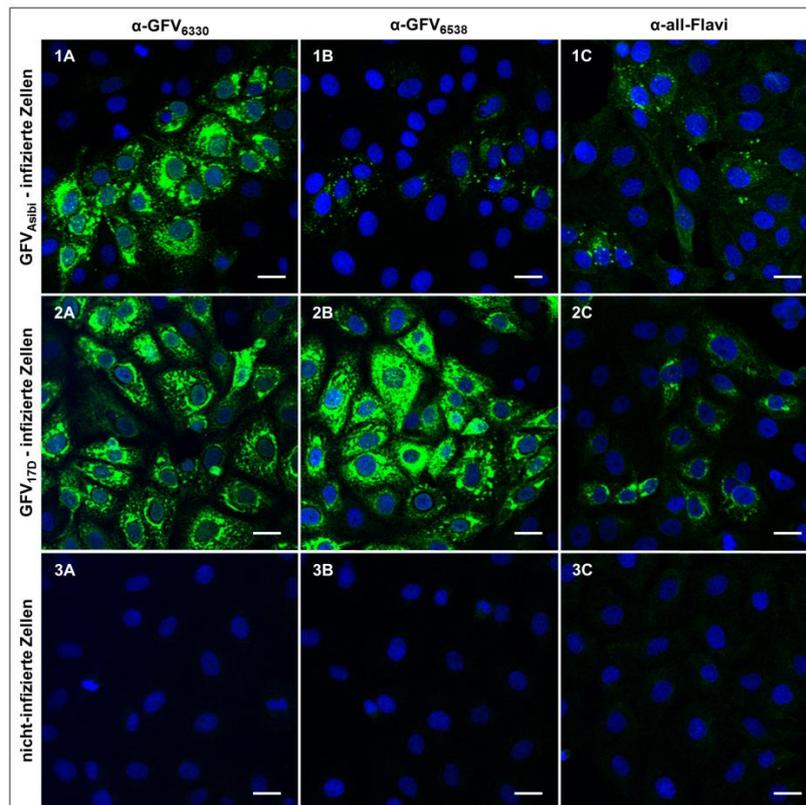


Abb. 30 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des GFV im IIFT. GFV_{17D}- (1), GFV_{Asibi}- (2) und nicht-infizierte (3) Zellen, inkubiert mit den mAk α -GFV₆₃₃₀ (A), α -GFV₆₅₃₈ (B) bzw. dem α -all-Flavi (C). Grün: Nachweis des jeweiligen Virus durch Antikörperbindung; blau: DAPI-gefärbte Zellkerne. Maßstab: 20 μ m.

3.3.1.2 Nachweis des Denguevirus (Serotyp 1 - 4)

Die Zusammenstellung der DENV-IIFT-Kombinationen (Abb. 31) zeigt, dass jeder DENV-Serotypen-Antikörper den jeweiligen DENV-Serotyp spezifisch detektieren konnte (Abb. 31; 1A, 2B, 3C, 4D). Nur bei dem α -DENV₃ mAk kam es zusätzlich noch zu einem schwachen Fluoreszenzsignal für das DENV₄ (4C). Hinsichtlich der Subtypen-Antikörper wurden für die Kombinationen DENV₂ + α -DENV₂ sowie DENV₄ + α -DENV₄ (2B, 4D) die stärksten Signale nachgewiesen. Der α -all-DENV mAk reagierte mit allen vier Subtypen in vergleichbarer Intensität (1E-4E). Auch der α -all-Flavi mAk führte bei beiden getesteten DENV-Serotypen (DENV₂ und DENV₄; 2F, 4F) zu deutlichen Signalen, die mit denen des α -all-DENV mAk vergleichbar waren. Unspezifische Bindungen der Antikörper an Zellbestandteile konnten durch Kontrolltestung mit nicht-infizierten Zellen ausgeschlossen werden (5A-5F). Insgesamt stellten, abgesehen von dem α -all-DENV mAk, der jeden der vier DENV-Serotypen detektierte, die Kombinationen DENV₄-infizierter Zellen mit dem α -DENV₄ mAk und DENV₂-infizierter Zellen mit dem α -DENV₂ mAk die besten Virus-Antikörper-Varianten dar.

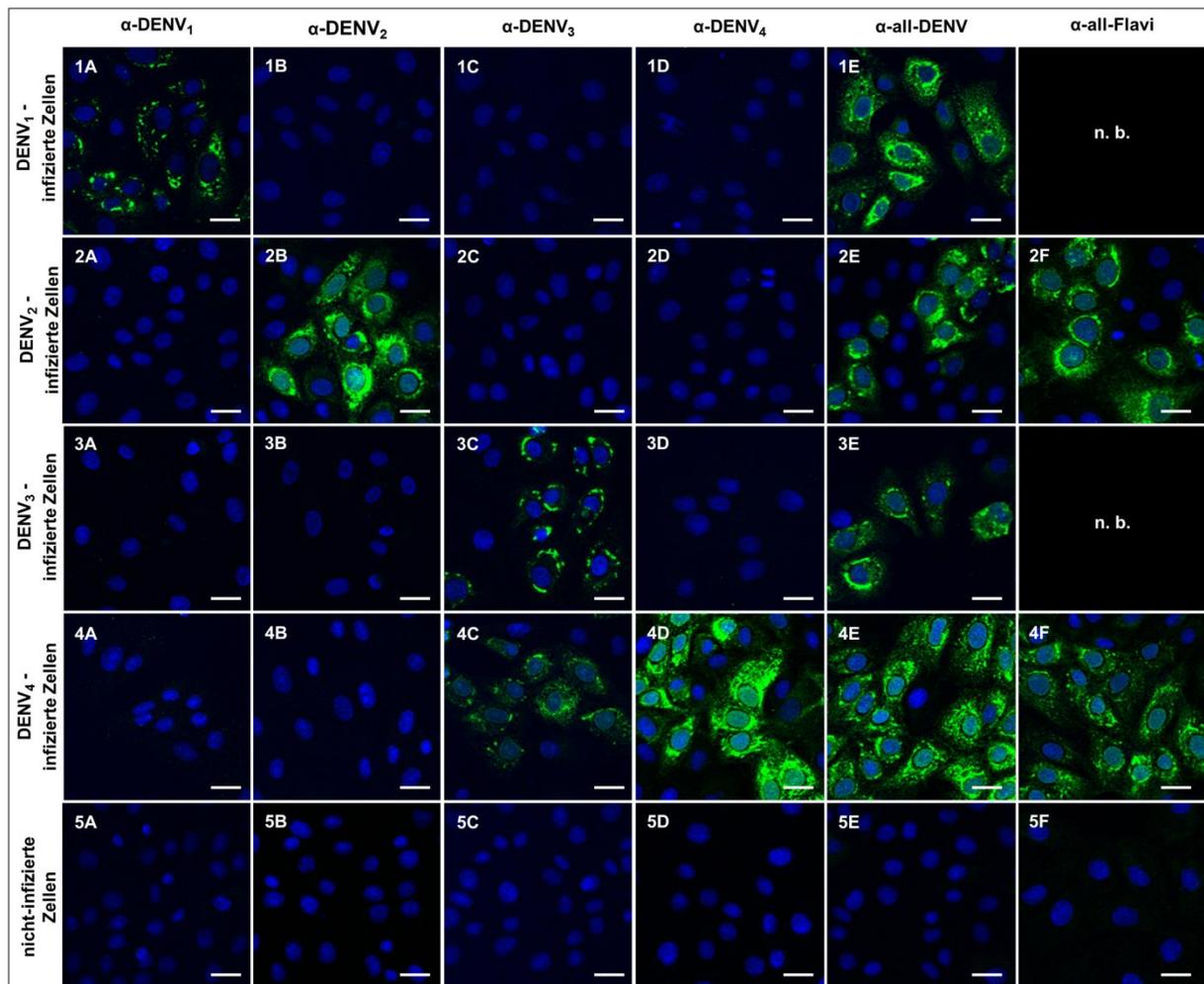


Abb. 31 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des DENV im IIFT. DENV₁- (1), DENV₂- (2), DENV₃- (3), DENV₄- (4) und nicht-infizierte Zellen (5), inkubiert mit dem jeweiligen DENV-Serotyp mAk (1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) bzw. dem zum Nachweis für alle DENV geeigneten mAk (α -all-DENV (E)) oder dem α -all-Flavi (F). Grün: Nachweis des jeweiligen Virus durch Antikörperbindung; blau: DAPI-gefärbte Zellkerne. n. b.: nicht bestimmt. Maßstab: 20 μ m.

3.3.1.3 Nachweis des FSME-Virus

Der Abbildung 32 ist zu entnehmen, dass alle untersuchten FSMEV-Antikörper (α -FSMEV₇₅ (Abb. 32; 1A), -1367 (1B), -1418 (1C), -1493 (1D) und -1786 (1E)) zu starken Fluoreszenzsignalen bei FSMEV-infizierten Zellen führten. Unspezifische Signale bei nicht-infizierten Zellen konnten für den α -FSMEV₁₄₉₃ in starker (2D), bei dem α -FSMEV₁₃₆₇ in schwächerer sowie beim α -FSMEV₁₄₁₈ (2C) in sehr schwacher Ausprägung identifiziert werden. Unter den verbliebenen im IIFT spezifisch bindenden FSMEV-mAk zeigten die α -FSMEV₇₅ und -1786 nahezu identische Signalstärken (1A, 1E). Mit dem α -all-Flavi mAk konnte das FSMEV nur sehr schwach detektiert werden (1F).

Insgesamt sind in Hinblick auf die beste Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des FSMEV die mAk α -FSMEV₇₅ und -1786 identifiziert worden.

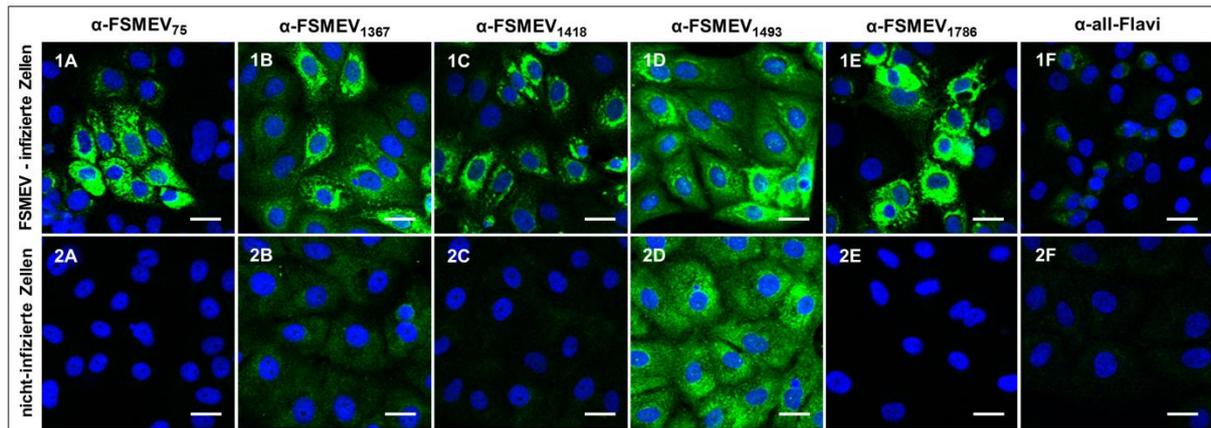


Abb. 32 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des FSMEV im IIFT. FSMEV- (1) und nicht-infizierte (2) Zellen, inkubiert mit mAk α -FSMEV₇₅ (A), α -FSMEV₁₃₆₇ (B), α -FSMEV₁₄₁₈ (C), α -FSMEV₁₄₉₃ (D) oder α -FSMEV₁₇₈₆ (E) bzw. dem α -all-Flavi (F). Grün: Virusnachweis durch Antikörperbindung; blau: DAPI-gefärbte Zellkerne. Maßstab: 20 μ m.

3.3.1.4 Nachweis des Vacciniavirus

Wie in Abbildung 33A ersichtlich, kam es bei dem α -VACV_{A1} mAk bei unveränderten Testbedingungen (mAk-Konzentration und cLSM-Einstellungen wie bei vorherigen IFTs) zu einem massiven Überstrahlen des Fluoreszenzmarkers (Abb. 33; A1). Auch nicht-infizierte Zellen zeigten eine ausgeprägte Fluoreszenz (A2). Vor diesem Hintergrund wurde eine Anpassung der eingesetzten VACV-Antikörper-Konzentration auf Grundlage einer α -VACV_{A1} mAk-Verdünnungsreihe vorgenommen (1000 ng/ml (Abb. 33; B1), 100 ng/ml (B2), 10 ng/ml (B3)). Selbiges wurde auch für den α -VACV_{A3} mAk durchgeführt (B4-B6).

Die Abbildung 33 B2 und B5 zeigt, dass 100 ng/ml für beide α -VACV mAk eine geeignete Konzentration darstellt. Bei einer stärkeren Verdünnung (10 ng/ml) kam es zu einer deutlichen Verringerung der Signalstärke (B3, B6). Höhere Konzentrationen der mAk führten zu einem Überstrahlen der Probe und unspezifischen Signalen (B1, B4).

Die Verringerung der initial verwendeten mAk-Konzentration um 1:1000 auf 100 ng/ml resultierte in den unter Abb. 34 dargestellten IIFT-Ergebnissen. Beide α -VACV mAk zeigten unter den angepassten Bedingungen keine Signale in virusfreien Zellen (Abb. 34; 2A, 2B) und wiesen spezifisch das VACV in infizierten Zellen nach (1A, 1B).

Insgesamt stellen für den Nachweis des VACV sowohl der α -VACV_{A1} als auch der α -VACV_{A3} geeignete mAk dar.

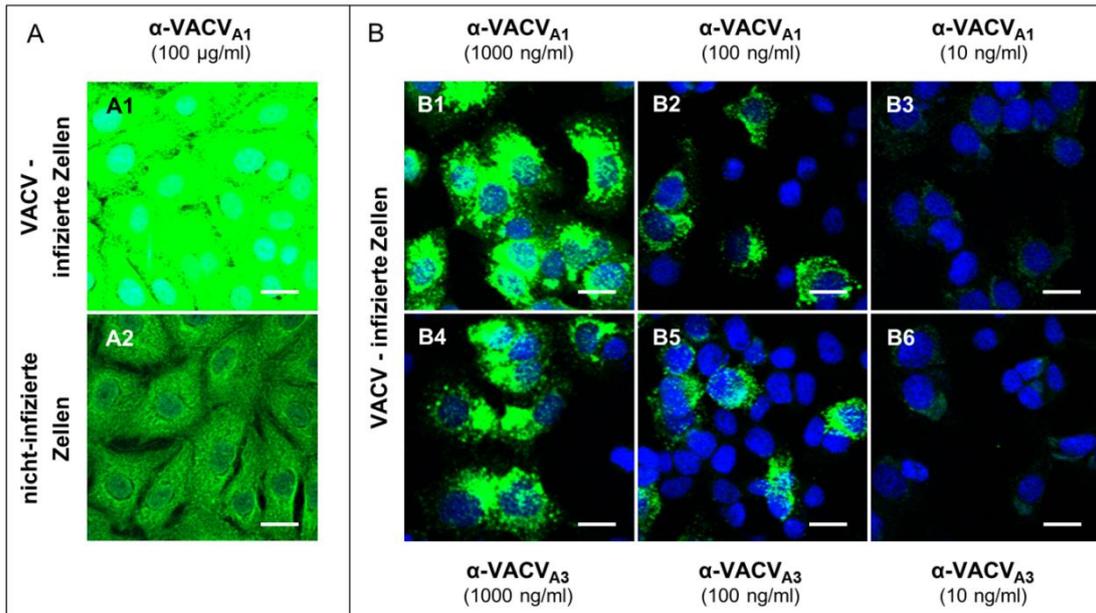


Abb. 33 Verdünnungsreihe der monoklonalen Antikörper gegen das VACV. A: α -VACV_{A1} mAk in initialer Konzentration in Kombination mit VACV- sowie nicht-infizierten Zellen. **B:** VACV-infizierte Zellen mit α -VACV_{A1} oder α -VACV_{A3} mAk in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (1000, 100 und 10 ng/ml). Grün: Nachweis des jeweiligen Virus durch Antikörperbindung; blau: DAPI-gefärbte Zellkerne. Maßstab: 20 µm.

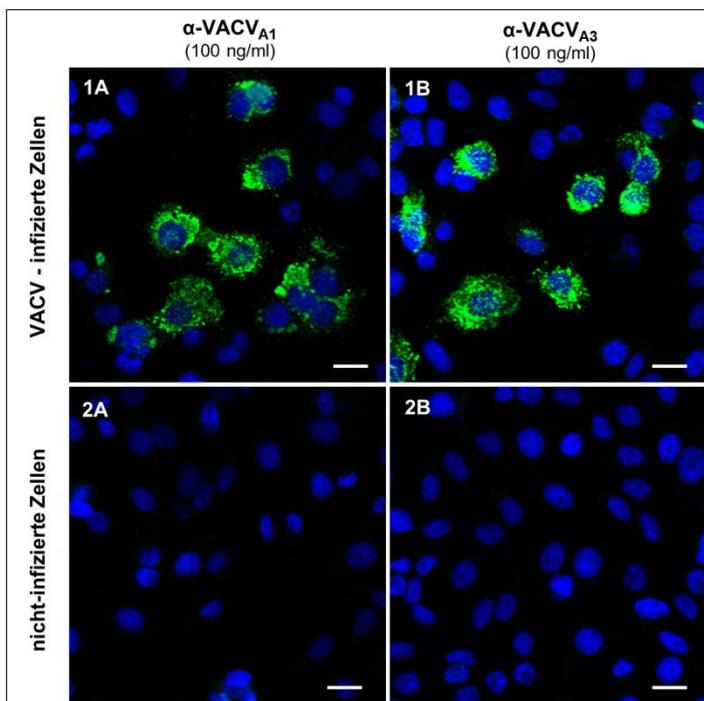


Abb. 34 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombination für den Nachweis des VACV im IIFT. VACV- (1) bzw. nicht-infizierte (2) Zellen, inkubiert mit dem mAk α -VACV_{A1} (A) und α -VACV_{A3} (B) (100 ng/ml). Grün: Nachweis des jeweiligen Virus durch Antikörperbindung; blau: DAPI-gefärbte Zellkerne. Maßstab: 20 µm.

3.3.2 Spezifitätsuntersuchungen

3.3.2.1 Spezifität der Antikörper

Die Übersicht in Abbildung 35 ermöglicht einen Vergleich der Spezifität der Antikörper im IIFT hinsichtlich der Viren GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₁₋₄, FSMEV und VACV. Die Auswahl der Antikörper sowie die Testbedingungen (mAk-Konzentration, identische cLSM-Einstellungen) beruhen auf den Ergebnissen der Untersuchungen zur jeweilig besten Virus-Antikörper-Kombination (3.3.1).

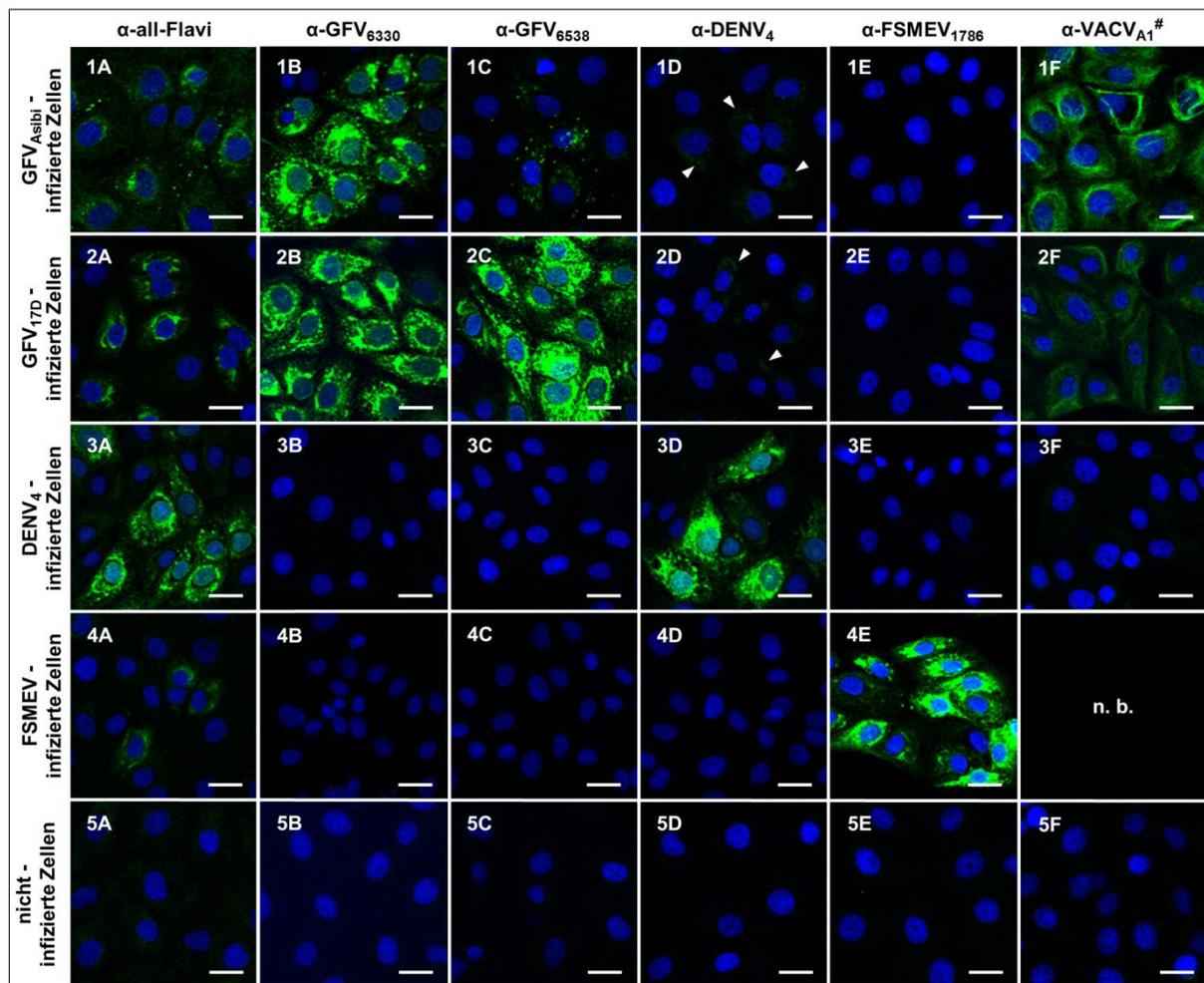


Abb. 35 Spezifität der ausgewählten Antikörper im IIFT hinsichtlich der Virustypen GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₄ und FSMEV. GFV_{Asibi}- (1), GFV_{17D}- (2), DENV₄- (3), FSMEV- (4) bzw. nicht-infizierte (5) Zellen, inkubiert mit den jeweils besten mAk (α-all-Flavi mAk (A), α-GFV₆₃₃₀ (B), α-GFV₆₅₃₈ (C), α-DENV₄ (D), α-FSMEV₁₇₈₆ (E), α-VACV_{A1} (#: 100 ng/ml; F) oder IgG Ak (G). Grün: Nachweis des jeweiligen Virus durch Antikörperbindung; blau: DAPI-gefärbte Zellkerne. n. b.: nicht bestimmt. Pfeilspitzen: schwache Fluoreszenzsignale. Maßstab: 20 μm.

Das GFV_{Asibi} (Abb. 35) konnte im IIFT mittels der mAk α -all-Flavi (1A) und α -GFV₆₅₃₈ (1C) schwach sowie vom α -GFV₆₃₃₀ mAk (1B) deutlich detektiert werden. Die Inkubation von GFV_{Asibi}-infizierten Zellen mit dem α -DENV₄ mAk (Abb. 35; 1D) resultierte in einem sehr schwachen Fluoreszenzsignal. Der α -FSMEV₁₇₈₆ (1E) reagierte nicht mit dem GFV_{Asibi}, wohingegen der α -VACV_{A1} (1F), trotz geringerer Antikörper-Konzentration (1:1000), zu deutlichen Signalen führte.

Für das GFV_{17D} zeigten der α -all-Flavi mAk (2A) schwache sowie die beiden mAk α -GFV₆₃₃₀ (2B) und α -GFV₆₅₃₈ (2C) vergleichbar starke Signale. Die Inkubation mit dem α -DENV₄ mAk (2D) resultierte auch bei diesem GFV-Stamm in sehr schwachen IIFT-Signalen.

Das DENV₄ wurde nur von dem α -all-Flavi mAk (3A) sowie dem α -DENV₄ mAk (3D; stärkstes Signal) detektiert werden.

Bei FSMEV-infizierten Zellen wurden mit dem α -FSMEV₁₇₈₆ (4E) starke sowie mit dem α -all-Flavi mAk (4A) sehr schwache IIFT-Signale detektiert.

Für keinen der untersuchten Antikörper zeigten sich in nicht-infizierten Zellen (6) Signale. Darüber hinaus konnten unspezifische Bindungen aufgrund des sekundären Antikörpers durch parallel durchgeführte Kontrolltests ausgeschlossen werden.

4 Diskussion

4.1 Hergestellte Antikörper und Viren

4.1.1 Produktion monoklonaler Antikörper

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Eignung der neuartigen SCORE-Technologie für den Nachweis humanpathogener Viren erfolgten unter Verwendung diverser mAk (Tab. 9). Diese wurden auf Grundlage ihrer mit anderen Methoden nachgewiesenen Eignung für den Virusnachweis ausgewählt [88–91] (3.1.1). Die Produktion der mAk erfolgte mittels Hybridomzellen, welche in einer Suspensionskultur in einer Taumelrotationskammer kultiviert wurden [115]. Im Rahmen dieser Arbeit sind mAk im Labormaßstab, d.h. im Milligramm-Bereich [120], hergestellt worden, wobei sich hinsichtlich der erzielten Antikörpermengen deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Hybridomzellkulturen zeigen. Dieses Phänomen wurde auch schon von Jaspert et al. beschrieben, wonach die Antikörperausbeuten in Abhängigkeit der Hybridomzellen erheblich differieren können [115]. Dennoch war für jeden der oben genannten mAk die Produktion im Milligramm-Bereich möglich, was die Verwendung aller Antikörper im Rahmen der Machbarkeitsuntersuchungen erlaubt.

4.1.2 Produktion der Virusstammlösungen

Plaque-Titrationstest und Elektronenmikroskopie

Für die Eignungstestung der Biosensor-Technologie zum Virusnachweis wurden Stammlösungen des GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₁₋₄, FSMEV und VACV hergestellt. Die Virusquantifizierung erfolgte mit Hilfe des Plaque-Titrationstests, um in den weiteren Untersuchungen vergleichbare Mengen an infektiösen Partikeln einzusetzen. Voraussetzung für den Plaque-Titrationstest ist, dass die untersuchten Viren in dem verwendeten Zellsystem klar abgrenzbare Plaques ausbilden. Für das GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, FSMEV und VACV kann in der vorliegenden Arbeit eine Plaque-basierte Quantifizierung der infektiösen Viruspartikel (PFU/ml) vorgenommen werden. Für die DENV-Serotypen 1 - 4 ist hingegen aufgrund einer fehlenden Plaquebildung keine Quantifizierung infektiöser Viruspartikel möglich. In der Literatur ist beschrieben, dass nicht jeder DENV-Stamm (abgrenzbare) Plaques bildet [121,122]. Darüber hinaus stellen auch die Kultivierungsbedingungen sowie das Testprotokoll relevante Einflussfaktoren hinsichtlich der Plaquebildung dar. In Versuchen mit C6/36-, Vero (E6)- und BHK-21 Zellen konnte Li et al. zeigen, dass für die DENV-Stämme Hawaii

(DENV₁), New Guinea-C (DENV₂), Guanxi-80-2 (DENV₃) und H241 (DENV₄) nur mit Vero E6-Zellen eine Quantifizierung der infektiösen Viruspartikel via Plaque-Titrationstest möglich ist [123]. Alvarez et al. konnte hingegen in BHK-21 Zellen für die DENV-Stämme Hawaii (DENV₁) und H241 (DENV₄) eine Quantifizierung der infektiösen Viruspartikel via Plaque-Titrationstest vornehmen [124]. Abseits der Unterschiede in den verwendeten Testprotokollen beider Arbeiten identifizierte Alvarez et al. u. a. den pH-Wert des Überschichtungsmediums als einen kritischen Parameter für die Bildung von Plaques [124].

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Plaque-Titrationstests erfolgten unter Verwendung von PS-Zellen. De Madrid und Porterfield zeigten, dass mit PS-Zellen grundsätzlich eine Virusquantifizierung via Plaque-Titrationstest für das DENV möglich ist [113]. Allerdings werden in der vorliegenden Arbeit zum Teil andere DENV-Stämme verwendet und auch eine modifizierte Version des Protokolls von De Madrid und Porterfield [113] genutzt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die ausbleibenden Plaques darstellen.

Aufgrund der fehlenden Plaquebildung bei den vier DENV-Serotypen sowie der untereinander vergleichbaren PFU-Ergebnisse der anderen Flaviviren (GFV_{Asibi}, GFV_{17D} und FSMEV) wurde als Annäherung die durchschnittliche Menge infektiöser Partikel (PFU/ml) der anderen Flaviviren für die DENV₁₋₄ zugrunde gelegt. Obwohl damit eine deutliche Unsicherheit einhergeht, wird dies für die Untersuchungen als akzeptabel eingestuft, da nicht das primäre Ziel bestand, eine Partikelquantifizierung der DENV₁₋₄-Stämme vorzunehmen. Es galt die prinzipielle Nachweisbarkeit humanpathogener Viren mit der Biosensor-Technologie zu überprüfen.

Eine elektronenmikroskopische Quantifizierung der hergestellten Virusstammlösungen konnte aufgrund einer zu hohen Konzentration an fötalem Kälberserum in den Proben nicht erfolgen.

Darüber hinaus lässt sich aufgrund der nachgewiesenen Infektiosität der Virusstammlösungen schlussfolgern, dass die Proben intakte Viruspartikel enthielten. Die Integrität der Viren ist für diese Arbeit von Relevanz, da die Virusdetektion auf der antikörpervermittelten Bindung der E-Proteine (virale Oberflächenproteine) basiert. Dieser Nachweis der Virusintegrität wird zusätzlich durch die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Lokalisation der GFV_{Asibi}-Partikel in Vero E6-Zellen auf Basis von Ultradünnschnitten bestätigt. Demnach werden Viruspartikel des GFV_{Asibi} in Zisternen des endoplasmatischen Retikulums, in intrazellulären Vesikeln sowie in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran identifiziert. Diese Lokalisationen stehen im Einklang mit der Virusreplikation: Innerhalb der Zisternen des endoplasmatischen Retikulums findet der

Zusammenbau der Flaviviruspartikel statt, welche anschließend mittels sekretorischer Vesikel zur Zellmembran transportiert und dort exozytiert bzw. während der Zellyse freigesetzt werden [14,23,35].

PCR-basierte Genomquantifizierung

Angesichts der fehlenden Plaquebildung der DENV₁₋₄ wurde zur Quantifizierung der Virusstammlösungen zusätzlich eine q(RT)-PCR-basierte Bestimmung der Genomäquivalente (GÄ) vorgenommen [103]. Aufgrund der störenden Einflüsse der Virusinaktivierungsreagenz β -Propiolacton auf die PCR-basierte Genomquantifizierung [125], wurden die Virusproben nicht wie für die Biosensor-Messungen mittels β -Propiolacton, sondern thermisch inaktiviert. Hierfür wurden nicht-inaktivierte „Rückstellproben“ der Virusanzucht genutzt. Das verwendete Inaktivierungsprotokoll wurde zuvor schon erfolgreich für Flaviviren angewendet [126–128]; eine Degradierung der viralen Nucleinsäuren in relevantem Umfang ist nicht zu erwarten [129].

Für die DENV₁₋₄ können im Zellkulturüberstand Flavivirus-GÄ nachgewiesen werden ($4,4 \cdot 10^7$ - $1,5 \cdot 10^9$ GÄ/ml). Aufgrund des fehlenden zytopathischen Effektes der DENV₁₋₄ ist nicht davon auszugehen, dass diese Genome in relevantem Umfang aus lysierten Zellen stammen [130]. Die vorliegenden qRT-PCR Ergebnisse lassen sich daher im Fall von DENV₁₋₄ kaum auf freie RNA, sondern auf intakte, infektiöse Viruspartikel zurückführen. Dies wird auch durch den IIFT bestätigt, wonach sich ein typisches perinukleäres und zytoplasmatisches Färbemuster zeigt [11,88].

Für die anderen Viren lag das Verhältnis zwischen PFU/ml und GÄ/ml bei 1:26 für das GFV_{Asibi}, bei 1:76 für GFV_{17D}, bei 1:165 für FSMEV und für VACV bei 1:2.

Die Differenz zwischen dem Anteil infektiöser Partikel (PFU oder *Focus Forming Units* (FFU)) und dem Anteil an GÄ kann auf freie Virus-Genome aus lysierten Zellen, defekten (nicht-infektiösen) Partikeln oder aggregierten Viruspartikeln zurückgeführt werden [130–132].

Das Verhältnis von FFU zu Genomäquivalenten wurde von Weidmann et al. für das GFV_{Asibi} untersucht [130]. Unter der Annahme, dass FFU und PFU analog verwendet werden können [121,132], entspricht das vorliegend ermittelte Verhältnis von PFU zu GÄ für das GFV_{Asibi} (1:26) damit der von Weidmann et al. ermittelten Größenordnung (1:83) [130]. Demgegenüber wird für das GFV_{17D} eine Spanne von 1:1000 bis 1:5000 (PFU/GÄ) beschrieben [96,133], womit sich eine deutliche Differenz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (1:76) zeigt. Auch für das VACV unterscheiden sich die Ergebnisse

dieser Arbeit (1:2) von den publizierten Daten (1:408) [131]. Für das FSMEV wird ein Spanne von ca. 1:240 bis 1:60000 (PFU/GÄ) angegeben [134], womit das vorliegende Ergebnis (1:165) in der Größenordnung der unteren Grenze liegt.

Bae et al. stellt in diesem Zusammenhang fest, dass sich selbst für eine einzige Virusstammlösung signifikante Unterschiede im Verhältnis von infektiösen Partikeln zu Genomäquivalenten ergeben können [96], was eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen den publizierten und den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Verhältnissen darstellt. Abgesehen von dem Virusstamm per se sind darüber hinaus die Zellkulturbedingungen sowie die Lagerung des Virus und der Nukleinsäure [133] weitere Faktoren, die das Verhältnis von PFU (bzw. FFU) zu GÄ beeinflussen und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschweren.

4.1.3 Visualisierung der Viren

Humanpathogene Viren weisen in Bezug auf Größe und Form eine große Vielfalt auf: So zählen die Flaviviridae (ca. 50 nm) [14,20,21] zu den kleinsten Vertretern [20]. Demgegenüber gehört die Familie der Poxviridae (ca. 240 × 300 nm) zu den größten Virusvertretern [20]. Abseits der deutlichen Größenunterschiede kann u. a. zwischen einer ikosaedrischen, helikalen und komplexen Symmetrie des Kapsids unterschieden werden [20]. Um die Vielfalt der Morphologie humanpathogener Viren in den Untersuchungen zu berücksichtigen und die Eignung der Biosensor-Technologie für den Nachweis verschiedener Virustypen in Bezug auf Größe und Form zu testen, wurden zusätzlich zu den Vertretern der Familie der Flaviviridae (ikosaedrische Symmetrie) die Poxviridae (komplexe, ziegelsteinförmige Symmetrie) [20,70] für die Untersuchungen ausgewählt. Zur Visualisierung der morphologischen Unterschiede der untersuchten Viren wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierfür wurden aus den zuvor hergestellten Virusstammlösungen Viren unter verringerter FKS-Konzentration angezüchtet, um störende Einflüsse von fötalem Kälberserum (Albumin) zu unterbinden.

Als Vertreter der Flaviviridae wurden in der vorliegenden Arbeit Flaviviren analysiert. Diese sind elektronenmikroskopisch nur bis auf die Gattungsebene differenzierbar [24,135–137], sodass der „Protoyp“ der Gattung *Flavivirus*, das GFV [14], dafür ausgewählt wurde. Die Symmetrie der GFV-Partikel wird in der Literatur als sphärisch bzw. ikosaedrisch beschrieben [24], wobei Durchmesser von 45 - 50 nm [138] genannt sind. Damit decken sich

die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Hinblick auf Form und Größe mit den Literaturangaben.

Aus der Familie der Poxviridae wurde als Vertreter der Gattung *Orthopoxvirus* das VACV untersucht. Es weist in den vorliegenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Symmetrie eines abgeflachten Ellipsoides und eine für die Negativkontrastierungs-Technik typische Oberflächenbeschaffenheit in Form von „*Surface Tubule Elements*“ (STE) auf [70]. Die Partikel haben eine Größe von ca. $315 \times 250 \times 120$ nm. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Sodeik und Krijnse-Locker diskutierten Größenangaben von ca. $300 - 310 \times 240 - 250 \times 110 - 140$ nm [71].

Die Leistungsfähigkeit der Biosensor-Technologie in der vorliegenden Arbeit wurde demzufolge anhand von Viren mit unterschiedlicher Größe und Form untersucht. Hierbei fanden sowohl die kleinsten als auch größten Vertreter humanpathogener Viren Berücksichtigung.

4.2 Markierungsfreie Biosensor-Technologie

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Untersuchungen zur Eignung der neuartigen Biosensor-Technologie für den Nachweis von humanpathogenen Viren durchzuführen. Im Gegensatz zu einer Endpunktbestimmung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, wie z. B. beim ELISA oder IIFT, ermöglicht die SCORE-Technologie eine Echtzeitmessung der Interaktion der Antikörper mit dem Analyten. Aus diesem Grund stellen bereits der Anstieg des Bindungssignals oder das maximale Bindungssignal einen Bindungsnachweis dar [139,140]. Für die vorliegenden Untersuchungen sollte sich die Virusantigen-Antikörper-Bindung in einem Messsignal niederschlagen, welches sich deutlich von der Referenz unterscheidet. Deshalb wurde als Parameter das maximale Bindungssignal verwendet. Zur Einordnung der erzielten Biosensor-Ergebnisse wurden ergänzend Untersuchungen mit einer weiteren Methode zur Virusdetektion vorgenommen. Die in den Biosensor-Messungen verwendeten Antikörper sind dafür im IIFT hinsichtlich des Nachweises der Viren GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₁₋₄, FSMEV und VACV überprüft worden. Die Ergebnisse beider Methoden (Biosensor-Messung, IIFT) werden in der Diskussion gegenübergestellt bzw. mit Literaturdaten verglichen.

4.2.1 Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Kombinationen

Zu Beginn der Eignungsprüfung der neuen Biosensor-Technologie wurden zunächst für jedes Virus diejenigen Antikörper identifiziert, welche unter den initialen Testbedingungen [119] das stärkste Bindungssignal nach Zugabe des jeweiligen Virus aufweisen.

Nachweis des Gelbfiebervirus (Stämme Asibi und 17D)

Die mAk α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ zeigen in der Biosensor-Messung vergleichbare Bindungssignale für die GFV-Stämme Asibi bzw. 17D. Im IIFT ergibt die Bestimmung der besten Virus-Antikörper-Kombination hingegen ein differenzierteres Bild. Das GFV_{Asibi} kann durch den α -GFV₆₃₃₀ mAk im Vergleich zum anderen Antikörper deutlich besser und das GFV_{17D} minimal schwächer detektiert werden.

Nachweis des Denguevirus (Serotypen 1-4)

Die mit den α -all-DENV und α -all-Flavi mAk erzielten Biosensor-Ergebnisse für den Nachweis der vier DENV-Serotypen entsprechen den IIFT-Resultaten von Henchal et al. [88] und können durch die eigenen Untersuchungen im IIFT bestätigt werden: Beide mAk detektieren die Serotypen 1 - 4.

Unterschiede zwischen den Biosensor- und IIFT-Messungen zeigen sich bezüglich der weiteren verwendeten α -DENV₁₋₄ mAk. Sowohl in den IIFT-Messungen als auch in der Arbeit von Henchal et al. [88] detektieren die α -DENV₁, α -DENV₂ und α -DENV₄ mAk serotypspezifisch nur den jeweiligen DENV-Serotyp. Der α -DENV₃ detektiert nach Henchal et al. ebenfalls nur den DENV₃, im IIFT der vorliegenden Arbeit darüber hinaus jedoch auch das DENV₄. Die beste Virus-Antikörper-Kombination stellen im IIFT α -DENV₂/DENV₂ sowie α -DENV₄/DENV₄ dar. In der Biosensor-Messung führt der α -DENV₄ mAk mit dem DENV₄ ebenfalls zum stärksten Signal. Gegenüber den IIFT-Ergebnissen weisen jedoch alle α -DENV₁₋₄ mAk deutliche Signale für jeden der vier DENV-Serotypen auf.

Nachweis des FSME-Virus

Die Ergebnisse in der Biosensor-Messung zu den fünf α -FSMEV mAk (75, 1367, 1418, 1493 und 1786) decken sich weitgehend mit den Untersuchungen von Niedrig et al. [90], wonach alle fünf mAk das FSMEV u. a. im ELISA detektieren. Auch die vorliegenden IIFT-Messungen stimmen mit diesen Befunden überein. Unterschiede zeigen sich lediglich bezüglich des α -FSMEV₇₅ mAk, der in den Biosensor-Messungen keine relevante Bindung an das FSMEV zeigt. Des Weiteren wurde auch die in der Literatur beschriebene Bindung des α -all-Flavi mAk an das FSMEV (hier: Stamm Neudoerfl, ELISA) [141] nachgewiesen. Im IIFT zeigt der α -all-Flavi für das FSMEV ein sehr schwaches Signal, wohingegen dieses in der Biosensor-Messung sehr stark ist. Die besten Antikörper zum FSMEV-Nachweis stellen in der Biosensor-Messung der α -FSMEV₁₄₉₃ und α -FSMEV₁₇₈₆ sowie im IIFT der α -FSMEV₇₅ und α -FSMEV₁₇₈₆ dar.

Nachweis des Vacciniavirus

Für das VACV zeigt sich unter den initialen Messbedingungen nur für einen der beiden untersuchten mAk (α -VACV_{A1}) ein relevantes Bindungssignal. Demgegenüber konnte Stern et al. zeigen, dass u.a. im ELISA sowohl der α -VACV_{A1} als auch der α -VACV_{A3} mAk das VACV detektieren [91]. Die Messungen von Stern et al. [91] werden im IIFT bestätigt und lassen beide mAk geeignet erscheinen.

Insgesamt können unter den initialen Messbedingungen für jedes Virus Bindungssignale in der Biosensor-Messung detektiert werden. Zum Teil unterscheiden sich die Resultate bezüglich der getesteten mAk jedoch von den IIFT-Ergebnissen bzw. von publizierten Daten. Um die Spezifität dieser Bindungssignale zu ermitteln, wurden die Virus-Antikörper-Kombinationen mit den stärksten Bindungssignalen ausgewählt und weiterführenden

Untersuchungen unterzogen. Hierbei wurde die Spezifität der Virus-Antikörper-Interaktionen in Hinblick auf andere Flaviviren, Vacciniaviren und virusfreie Bedingungen überprüft.

4.2.2 Spezifität der Antikörper unter den initialen Messbedingungen

Zur Überprüfung, inwieweit die detektierten Bindungssignale im Rahmen der Ermittlung der besten Virus-Antikörper-Variante das Resultat einer spezifischen Interaktion sind, wurden die ausgewählten mAk mit dem GFV_{Asibi}, DENV₄, FSMEV und VACV sowie unter virusfreien Bedingungen (Zellkulturüberstand + β -Propiolacton) getestet.

α -all-Flavi mAk

Der α -all-Flavi mAk zeigt in der Biosensor-Messung für das GFV_{Asibi}, DENV₄ und FSMEV jeweils ein deutliches Signal und (unter Berücksichtigung der Einflusses des Zellkulturüberstandes) keine relevante Bindung an das VACV. Bezüglich des DENV₄ und FSMEV entsprechen diese Ergebnisse den Resultaten im IIFT sowie den publizierten Daten [11,142]. Demgegenüber kann für das GFV_{Asibi} im IIFT nur ein schwaches Signal detektiert werden, was sich mit den Messungen von Henchal et al. für das GFV_{17D} deckt [88].

α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄ und α -FSMEV₁₄₉₃ mAk

Hinsichtlich der α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄ und α -FSMEV₁₄₉₃ mAk liegt auf Basis der Biosensor-Messungen ein heterogenes Ergebnis vor. Die Antikörper zeigen zwar deutliche Signale für das jeweilige „eigene“ Flavivirus. Gleichzeitig weisen sie jedoch auch bei den anderen Flaviviren deutliche und zum Teil die stärksten Bindungssignale auf. Im IIFT zeigt sich diese Beobachtung nicht: Lediglich für den α -DENV₄ mAk können neben den starken Signalen für das DENV₄ sehr schwache Signale für die beiden GFV-Stämme detektiert werden.

Ursächlich für die zum Teil beobachteten Unterschiede zwischen den Biosensor- und den IIFT-Messungen bzw. den publizierten Ergebnissen können die verschiedenen Messmethoden sein. Zwar wurden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten mAk aufgrund ihrer mit anderen Methoden nachgewiesenen Eignung für den Nachweis des GFV, DENV, FSMEV oder VACV vorausgewählt [88–91], jedoch ist hierbei zu berücksichtigen, dass die Spezifität bzw. Sensitivität der mAk maßgeblich durch die Messmethode beeinflusst werden kann. So hat Daffis et al. gezeigt, dass im Western Blot nur der α -GFV₆₃₃₀ mAk das GFV_{17D} detektiert, nicht aber der α -GFV₆₅₃₈ mAk [97]. Im IIFT und der Biosensor-Messung wird das GFV_{17D} von beiden mAk detektiert. Untersuchungen mit anderen als in der vorliegenden Arbeit verwendeten α -DENV₃ mAk zeigen, dass diese zum Teil das DENV₃ bzw. dessen E-Protein

nur im IIFT oder Western Blot erkennen [11]. Ursächlich für die unterschiedliche Spezifität bzw. Sensitivität der mAk unter verschiedenen Testbedingungen kann die Probenbehandlung und damit einhergehend Unterschiede in der Protein- bzw. Epitopkonformation oder Epitopzugänglichkeit sein [11,143,144]. Die in der Biosensor-Messung verwendeten Proben liegen im nativen Zustand vor, wohingegen die Proben z. B. im IIFT oder Western Blot teilweise oder vollständig denaturiert sind [145,146].

Darüber hinaus kann in diesem Zusammenhang die zum Teil starke Kreuzreaktivität der Flavivirus-Antikörper zum Tragen kommen [11,147–150]. Ursächlich hierfür ist der hohe Grad an Sequenz- bzw. Strukturhomologie der für die Mehrzahl der Virusantigen-Antikörper-Wechselwirkung entscheidenden E-Proteine [14,16,21,97]. Beispielsweise zeigt sich im Western Blot auch bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten α -FSMEV₁₄₉₃ mAk eine Kreuzreaktivität mit dem GFV_{17D}, nicht jedoch bei dem α -FSMEV₁₇₈₆ mAk [90], was mit den Biosensor-Ergebnissen übereinstimmt. Des Weiteren sind u. a. auch Kreuzreaktivitäten von α -DENV mAk mit einem GFV-Impfstamm beschrieben [11], was sich mit den Ergebnissen der Biosensor-Messung und des IIFT deckt.

α -VACV_{A1} mAk

Die Biosensor-Ergebnisse zum α -VACV_{A1} mAk deuten jedoch darauf hin, dass die gewählten initialen Messbedingungen entsprechend Dähn et al. [119] insgesamt nicht optimal für den spezifischen Virusnachweis sind, da der α -VACV_{A1} mAk nach Zugabe der Flaviviren Bindungssignale in ähnlicher Größenordnung wie die Flavivirus-mAk zeigt. Gleichzeitig liegt, unter Berücksichtigung des Bindungssignals des α -VACV_{A1} unter virusfreien Bedingungen, keine (relevante) Bindung des α -VACV_{A1} mAk an das VACV vor.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse zur Spezifität der mAk unter den initialen Messbedingungen ein heterogenes Ergebnis. Entsprechend der Erwartungen können zwar mit dem α -all-Flavi mAk alle untersuchten Flaviviren detektiert werden [88] und keiner der Flavivirus-mAk bindet Zellkulturbestandteile oder das VACV in relevantem Umfang, jedoch zeigen die Flavivirus-Antikörper nur zum Teil die stärksten Bindungssignale für ihr jeweiliges Virus bzw. andere Antikörper weisen ebenfalls relevante Signale auf. Auch kann das VACV vom α -VACV_{A1} mAk unter Einbeziehung der Zellkulturergebnisse bei den initialen Messbedingungen nicht detektiert werden. Ursächlich können wie oben diskutiert die Messbedingungen, eine Kreuzreaktivität der verwendeten mAk oder eine Kombination beider Faktoren sein. Unter Beachtung der IIFT-Ergebnisse und Literaturdaten lässt sich somit feststellen, dass verschiedene Messsysteme zum Teil mit unterschiedlicher Spezifität bzw.

Sensitivität der mAk einhergehen. Folglich muss die Validierung von Antikörpern für jedes Messsystem erneut vorgenommen werden bzw. sind die Ergebnisse eines Antikörpers unter einem Messsystem nicht unmittelbar übertragbar auf ein anderes Messsystem [143,144]. Vor diesem Hintergrund wurden Untersuchungen zur Optimierung der Messbedingungen vorgenommen, die das Ziel hatten, die Spezifität der mAk in den Biosensor-Messungen zu steigern.

4.2.3 Optimierung der initialen Messbedingungen zur Antikörperspezifitätssteigerung

Zur Optimierung des spezifischen Virusnachweises wurde der Einfluss der Messbedingungen auf die maximalen Bindungssignale der mAk analysiert. Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen können u. a. durch den pH-Wert, die Temperatur sowie die Ionenstärke beeinflusst werden [82]. Daneben stellen die Konzentration des Antigens und des Antikörpers weitere Einflussfaktoren dar [82,151]. Des Weiteren kann die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung durch Detergenzien wie z. B. Urea [152,153] oder Tween 20 [154–156] verändert werden.

Da unter den initialen Messbedingungen nach Zugabe des GFV_{Asibi} die insgesamt stärksten spezifischen (α -GFV₆₅₃₈) als auch unspezifischen Signale (insbesondere α -VACV_{A1}, aber auch α -DENV₄ und α -FSMEV₁₄₉₃ mAk) detektiert werden, erfolgte die Optimierung der Messbedingungen anhand des GFV_{Asibi}.

4.2.3.1 Einfluss von Urea und Tween 20

Urea stellt eine nichtionische chaotrope Detergens dar, welche mit dem Antigen und dem Antikörper u. a. durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in Wechselwirkung tritt [152,153]. In Gegenwart von Urea kann es infolgedessen zur Destabilisierung der Antigen-Antikörper-Bindung durch die Störung inter- und intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen kommen [152,153]. Das Ausmaß der Störung der Antigen-Antikörper-Interaktion ist hierbei, abgesehen von der Urea-Konzentration [157], von der Stärke abhängig, mit der die Paratope des Antikörpers an das Epitop binden (Avidität) [158]. Ist die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung durch eine hohe Avidität charakterisiert, haben chaotrope Substanzen einen geringeren Einfluss auf diese Wechselwirkung [158].

Im Verlauf einer Immunantwort nimmt die Avidität von Antikörpern aufgrund der sogenannten Affinitätsreifung („*affinity maturation*“) zu [159,74]. Selbiges wurde auch für Antikörper nachgewiesen, welche gegen Flaviviren gerichtet sind [157,160,161] und resultiert aus einer Steigerung der Spezifität der Antikörper [159,161].

Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss von Urea auf den Nachweis des GFV_{Asibi} unter den initialen Messbedingungen untersucht. Basierend auf publizierten Daten zur Wirkung von Urea auf die Avidität von Flavivirus-Antikörpern wurden für die vorliegende Arbeit 6 M Urea [157,161], sowie zusätzlich 3 M Urea, getestet. Es zeigt sich, dass die Zugabe von 6 M Urea bei dem α -GFV₆₅₃₈ mAk erwartungsgemäß die geringste Reduktion des Bindungssignals bewirkt, wohingegen es bei dem α -VACV_{A1} mAk faktisch zur Aufhebung seiner Bindung an das GFV_{Asibi} kommt. Auch die weiteren Flavivirus-mAk α -DENV₄ und α -FSMEV₁₄₉₃ zeigen unter Anwesenheit von Urea im Messpuffer signifikant geringere Signale als der α -GFV mAk. Dies ist insbesondere hinsichtlich des α -DENV₄ mAk relevant, da dieser unter den initialen Messbedingungen identische Bindungssignale wie der α -GFV₆₅₃₈ mAk zeigt. Eine geringere Urea Konzentration (hier: 3 M) beeinflusst die Messergebnisse weniger stark als 6 M Urea. Beispielsweise zeigt der α -VACV_{A1} unter 3 M Urea noch eine Bindung an das GFV_{Asibi}, nicht aber bei 6 M Urea. Diese Beobachtung stimmt mit publizierten Daten zum Effekt unterschiedlicher Urea-Konzentrationen auf die Bindungssignale überein [157].

Darüber hinaus wurde auch der Effekt von Tween 20 untersucht. Tween 20 ist eine nicht-ionische Detergens, welche nicht-spezifische Proteininteraktionen reduzieren bzw. die spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung unterstützen kann [154–156]. Die Zugabe von Tween 20 zum Messpuffer führt – mutmaßlich aufgrund der Fluidik – zu einer starken Bildung von (Miko-)Luftblasen, sodass keine verwertbaren Ergebnisse generiert werden konnten.

Insgesamt ist auf Basis der Messungen mit Urea festzustellen, dass hinsichtlich des GFV_{Asibi} die Avidität und somit die Spezifität des α -GFV₆₅₃₈ mAk höher ist als die der anderen getesteten mAk. In Gegenwart von Urea kann daher, gegenüber den initialen Messbedingungen, eine Steigerung der Spezifität des GFV_{Asibi}-Nachweises auf Basis des α -GFV₆₅₃₈ mAk erzielt werden. Trotz dieser Ergebnisse erweist sich die Zugabe von Urea jedoch nicht als optimal für eine mögliche regelhafte Anwendung, da der α -DENV₄ mAk auch unter Urea ein relevantes Signal aufweist und es zum Teil zu starken Kristallisationen in der Flusszelle kommt.

4.2.3.2 Einfluss des pH-Wertes

Der pH-Wert des Messpuffers stellt einen relevanten Einflussfaktor auf die Antigen-Antikörper-Interaktion dar. So konnte verschiedentlich gezeigt werden, dass sowohl Reaktivität als auch Spezifität von Antikörpern durch den pH-Wert beeinflusst werden können [83,162,163].

Der pH-Wert beträgt in humanem Blut unter physiologischen Bedingungen 7,35 bis 7,45 [75]. Um den Einfluss des pH-Wertes auf den Nachweis des GFV_{Asibi} zu untersuchen, erfolgten Messungen unter dem physiologischen pH-Wert 7,4 und darüber hinaus bei 7,2, und 7,6. Es zeigt sich, dass die α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk das GFV_{Asibi} bei pH-Wert 7,4 binden. Im Gegensatz dazu kann für keinen der weiteren untersuchten mAk eine Bindung an das GFV_{Asibi} bei pH-Wert 7,4 detektiert werden, womit das GFV_{Asibi} spezifisch mit den beiden α -GFV mAk nachgewiesen werden kann.

Die Signalstärken nehmen mit zunehmendem pH-Wert ab (pH-Wert 6,0 > 7,2 > 7,4). Darüber hinaus kann bei pH-Wert 7,6 für keinen der mAk ein Bindungssignal an das GFV_{Asibi} detektiert werden. Diesbezüglich ist anzunehmen, dass die Erhöhung des pH-Wertes von 6,0 auf 7,4 zu einer Verringerung unspezifischer Bindungen der mAk führt. Beispielsweise wurde auch für Chlamydien-Typen-spezifische mAk gezeigt, dass diese unter sauren pH-Bedingungen unspezifische Bindungen an andere Chlamydien-Typen aufweisen [162].

Einen möglichen Grund für die Verringerung der (unspezifischen) Bindung der mAk bei den pH-Werten 7,2 und 7,4 bzw. das Ausbleiben der mAk Bindung unter pH-Wert 7,6 stellen die spezifischen Eigenschaften der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung dar. Basis einer jeden Antigen-Antikörper-Bindung ist die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, ionischen Wechselwirkungen, hydrophoben Wechselwirkungen bzw. Van-der-Waals-Kräften zwischen Epitop und Paratop [82,83]. Abhängig von dem Anteil der genannten Wechselwirkungen an der Antigen-Antikörper-Bindung liegt eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Änderungen, z. B. des pH-Wertes oder der Ionenstärke, vor [83]. Die Erhöhung des pH-Wertes des Messpuffers führt zu Änderungen in der Ladungsdichte [164,165] des Antikörpers bzw. Antigens, was ggf. auch mit einer Änderung der Konformation der Proteine einhergeht [166]. Im Ergebnis kann dies die Ausbildung einer stabilen Antigen-Antikörper-Bindung beeinträchtigen oder sogar verhindern.

Insgesamt ermöglicht die Erhöhung des pH-Wertes des Messpuffers auf 7,4 den Nachweis des GFV_{Asibi} spezifisch über die α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk, da die weiteren untersuchten mAk α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, und α -VACV_{A1} unter den genannten Messbedingungen keine Bindung an das GFV zeigen.

4.2.3.3 Einfluss von Temperatur und Ionenstärke

Neben dem pH-Wert stellen die Ionenstärke und Temperatur weitere Faktoren dar, welche die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung beeinflussen können [82,83,163].

Beispielsweise hat Kamata et al. für mAk gegen bovines β -Lactoglobulin gezeigt, dass eine Antigen-Antikörper-Bindung in unterschiedlichem Ausmaß von der Ionenstärke beeinflusst wird [83]. So existieren sowohl Antikörper, die hochsensitiv auf Änderungen der NaCl-Konzentration im Messpuffer reagieren, als auch Antikörper, deren Bindung an das β -Lactoglobulin nahezu nicht durch eine sich ändernde NaCl-Konzentration beeinflusst wird [83]. Dies gilt in gleichem Maße für die Temperatur. Beispielsweise können beim DENV₂ Änderungen der Temperatur zu Änderungen der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung aufgrund von Konformationsänderungen des E-Proteins führen [167]. Darüber hinaus zeigen viele Flavivirus-Antikörper eine temperaturabhängige Bindung und Neutralisation [167–169]. Die genannten Beispiele illustrieren den möglichen Einfluss der Ionenstärke bzw. Temperatur auf die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Bezogen auf die vorliegenden Ergebnisse unter pH-Wert 7,4 galt es zu klären, inwieweit eine Anpassung der Temperatur bzw. Ionenkonzentration an physiologische Bedingungen (37 °C, 150 mM NaCl [75]) z. B. die Signalstärke der α -GFV mAk erhöht.

Die Ergebnisse unter 37 °C zeigen, dass auch unter erhöhten Temperaturen der Nachweis des GFV_{Asibi} via α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk möglich ist. Für keinen der weiteren untersuchten mAk (α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃, α -all-Flavi sowie α -VACV_{A1}) kann eine Bindung an das GFV detektiert werden. Allerdings ergibt sich für den α -GFV₆₅₃₈ mAk bei 37 °C eine signifikant geringere Stärke des Bindungssignals als bei 22 °C. Der α -GFV₆₃₃₀ zeigt bei 22 °C und 37 °C vergleichbare Signalstärken. Somit weisen die beiden α -GFV mAk eine unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit auf. Sowohl in Hinblick auf den Einfluss der Temperatur als auch die Ionenstärke sind – wie schon im Abschnitt „pH-Wertes des Messpuffers“ diskutiert – die spezifischen Eigenschaften der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung entscheidend: Während Wasserstoffbrückenbindungen eine höhere Stabilität bei niedrigeren Temperaturen aufweisen, nimmt die Stärke von hydrophoben Wechselwirkungen mit steigender Temperatur zu [82]. Bezogen auf die vorliegenden Ergebnisse der α -GFV mAk können folglich verschiedene Anteile der genannten Bindungen zwischen Epitop und Paratop ursächlich für die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden α -GFV mAk bei 22 °C und 37 °C sein. Der Effekt der Temperatur auf die Pufferkapazität von MOPS ist minimal und mutmaßlich nicht ursächlich für die beobachteten Effekte [170]. Darüber hinaus können auch intrinsische Effekte der SCORE-Technologie aufgrund der unterschiedlichen Messtemperaturen

vernachlässigt werden, da die für die Messung maßgebliche optische Schichtdicke ($n \times d$) nahezu nicht durch die Temperatur beeinflusst wird [105,111,112].

Der Einfluss der Ionenstärke wurde durch die Zugabe von 150 mM NaCl untersucht. Sowohl bei 22 °C als auch bei 37 °C liegt für keinen der getesteten mAk unter den vorliegenden Messbedingungen eine Bindung an das GFV vor. Eine Zugabe von NaCl zum Messpuffer resultiert in einer Interaktion der Natrium- sowie Chlorid-Ionen mit den geladenen Gruppen der Antikörpers und Antigens [171,172]. Diese Interaktionen können zu Änderungen im Hydratisierungszustand des Paratopes bzw. Epitopes aufgrund der Protein-Salz-Interaktion führen [172] und münden ggf. in einer Blockierung der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Das Ergebnis, dass die Präsenz von NaCl im Messpuffer die Bindung der α -GFV mAk an das GFV verhindert, wird durch die weiteren Untersuchungen zum Einfluss von PBS auf den GFV-Nachweis bestätigt (siehe: Einfluss des Messpuffers, 4.2.3.4). Gleichwohl überrascht dieser Befund, da NaCl in der Regel für die Adjustierung der Osmolarität von physiologischen Messpuffern verwendet wird [173] und die eingesetzte NaCl-Menge den physiologischen Bedingungen entspricht [75].

Insgesamt ist auch unter 37 °C der Nachweis des GFV_{Asibi} spezifisch über die mAk α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ möglich. Für den α -GFV₆₅₃₈ mAk zeigt sich hierbei im Vergleich zu den Ergebnissen bei 22 °C eine geringere Bindung an das GFV_{Asibi}. Darüber hinaus führt die Zugabe von NaCl zum Messpuffer zum Verlust der Bindung der α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ mAk an das GFV_{Asibi}. In der Summe resultiert die Erhöhung der Messtemperatur, die Zugabe von NaCl zum Messpuffer oder die Kombination beider Faktoren nicht zu einer Verbesserung der Messbedingungen in Hinblick auf den spezifischen α -GFV mAk-vermittelten Virusnachweis.

4.2.3.4 Einfluss des Messpuffers

Zur Untersuchung des Einflusses des Messpuffers auf den Nachweis des GFV_{Asibi} wurden neben dem Puffer MOPS die etablierten Puffer HEPES, PBS sowie Phosphatpuffer eingesetzt [173]. Die Puffer wurden aufgrund ihrer Pufferkapazität im physiologischen pH-Bereich und hinsichtlich HEPES (wie auch MOPS) aufgrund der geringen Neigung zur Wechselwirkung mit Proteinen ausgewählt [174,175].

Der Nachweis des GFV_{Asibi} mittels der α -GFV mAk ist auch in HEPES und Phosphatpuffer möglich, nicht jedoch in PBS (jeweils pH-Wert 7,4). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Resultaten zum Einfluss der Ionenstärke auf die Messergebnisse, wonach das GFV_{Asibi} in

Gegenwart von NaCl im Messpuffer nicht nachgewiesen werden kann (siehe: Einfluss von Temperatur und Ionenstärke, 4.2.3.3). Die verwendeten Puffer MOPS und HEPES enthielten kein NaCl. In dem verwendeten PBS lagen hingegen 137 mM NaCl vor. Auch der Phosphatpuffer enthält, wenn auch in geringer Stoffmengenkonzentration, Natrium-Ionen (10 mM Natrium-Phosphat) und auch hier zeigen sich für die α -GFV mAk tendenziell geringere Bindungssignale als mit MOPS bzw. HEPES. Dies kann ggf. auf Effekte der Natrium-Ionen auf die Paratop-Epitop-Wechselwirkung – wie schon im Abschnitt „Einfluss von Temperatur und Ionenstärke“ (4.2.3.3) diskutiert – zurückgeführt werden.

Des Weiteren unterscheidet sich die Stärke der Bindungssignale der α -GFV mAk zwischen den beiden strukturell verwandten Puffern MOPS und HEPES. Während unter MOPS der α -GFV₆₅₃₈ mAk das stärkste Signal zeigt, liegt unter HEPES für den α -GFV₆₃₃₀ das stärkste Signal vor. Obwohl die sogenannten „Good“-Puffer MOPS und HEPES relativ inert in Hinblick auf Wechselwirkungen mit Proteinen sind [174,175], zeigte schon Good et al., dass HEPES abseits seiner Puffereigenschaften den Zellstoffwechsel beeinflusst [174]. Diesbezüglich diskutieren Taha et al. anhand von aktueller Literatur die Eigenschaften von „Good“-Puffern hinsichtlich ihrer Interaktionen mit biologischen Molekülen. Sie stellen fest, dass z.B. derselbe Puffer auf ein Protein stabilisierend und auf ein anders Protein destabilisierend wirken kann [176]. Taha et al. demonstriert weiterhin, dass MOPS mit dem Peptidrückgrat von bovinem Serumalbumin interagiert und das Protein stabilisiert [176]. Darüber hinaus zeigt Roberts et al. u. a. am Beispiel von Phosphatpuffer, dass Antikörperbindungen aufgrund spezifischer Puffereffekte beeinflusst werden können, insbesondere bei niedrigen Ionenstärken [171]. Ursächlich hierfür sind u. a. elektrostatische Interaktionen zwischen dem Puffer und dem Protein.

Vor diesem Hintergrund scheint es wahrscheinlich, dass die beobachteten Unterschiede in den Signalstärken der α -GFV mAk unter MOPS und HEPES auf Wechselwirkungen der Puffer mit den Antikörpern bzw. Antigenen zurückzuführen sind. Im Fall von Phosphatpuffer und PBS stellen vermutlich zusätzliche Wechselwirkungen der Natrium- bzw. Chlorid-Ionen mit den Antikörpern bzw. Antigenen relevante Einflussfaktoren dar.

Abseits der Bindungssignalstärke der mAk zeigen sich die Effekte von MOPS und HEPES auf die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung auch in der Dissoziation der Virionen von den Antikörpern. Demnach führt die Spülung der Flusszelle mit MOPS bei den α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ mAk zur Bindungssignalreduktion von ca. 39 - 44 %. Demgegenüber resultiert die Spülung mit HEPES in einer raschen Signalreduktion zurück auf *Baseline*-Niveau. Da die SCORE-Technologie im Gegensatz zu einer Endpunktbestimmung (z. B. IIFT, ELISA) die

Echtzeitmessung der Interaktion der Antikörper mit dem Analyten ermöglicht, stellt die schnelle Dissoziation des GFV_{Asibi} nach Spülung mit HEPES keinen Hinderungsgrund für die Verwendung von HEPES dar. Umfassende Informationen zu der Bindungskinetik sind für den Nachweis des Virus nicht erforderlich. Aufgrund der zeitaufgelösten Bindungsergebnisse ermöglicht die SCORE-Messung im Vergleich zur Endpunktbestimmung auch die Detektion schwacher Bindungen.

Insgesamt ist neben dem Puffer MOPS auch mit HEPES und Phosphatpuffer der Nachweis des GFV_{Asibi} durch die mAk α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ möglich. Unter Berücksichtigung der erzielten maximalen Bindungssignale, welche in Phosphatpuffer insgesamt geringer als unter MOPS und HEPES sind, stellt lediglich HEPES eine Alternative zum Messpuffer MOPS dar.

Fazit zur Optimierung der Messbedingungen

In der Gesamtbetrachtung der Optimierungsuntersuchungen zeigt sich, dass mit den Messpuffern MOPS und HEPES bei pH-Wert 7,4 der Nachweis des GFV_{Asibi} durch die α -GFV₆₅₃₈ und α -GFV₆₃₃₀ mAk möglich ist. Für die weiteren getesteten mAk liegt keine (relevante) Bindung an das GFV_{Asibi} vor. Darüber hinaus führt weder eine Erhöhung der Messtemperatur auf 37 °C noch eine Veränderung der Ionenstärke zur Verbesserung der Messergebnisse, z. B. in Hinblick auf die Signalstärke.

Im Vergleich zu den Ergebnissen unter den initialen Messbedingungen, wo neben dem α -GFV₆₅₃₈ mAk u. a. auch der α -DENV₄ mAk und der α -VACV_{A1} eine Bindung des GFV_{Asibi} in vergleichbarer Größenordnung zeigen, stellen die optimierten Messbedingungen damit eine maximale Verbesserung dar.

Gegenüber den IIFT-Resultaten mit dem GFV_{Asibi} zeigen sich insbesondere bezüglich des α -all-Flavi und α -VACV_{A1} mAk Unterschiede, da diese im IIFT Bindungssignale zeigen. Darüber hinaus ist das Signal für den α -GFV₆₅₃₈ im IIFT sehr schwach.

Abseits der spezifischen mAk-Bindungsmuster zeigen die Optimierungsuntersuchungen, dass mit der SCORE-Technologie Änderungen in den Messsignalen aufgrund von unterschiedlichen Messbedingungen detektierbar sind. Dies erlaubt die Optimierung von Messbedingungen, z. B. für den antikörpervermittelten Virusnachweis, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt.

4.2.4 Spezifität der Antikörper unter den optimierten Messbedingungen

Die Ergebnisse zur Optimierung der initialen Messbedingungen zum Virusnachweis zeigen, dass das GFV_{Asibi} in den Messpuffern MOPS und HEPES (jeweils pH-Wert 7,4) spezifisch mit den α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk nachgewiesen werden kann.

Basierend auf diesen Resultaten wurde in den Untersuchungen zur Spezifität der Antikörper unter den optimalen Bedingungen überprüft, inwieweit auch die weiteren Viren (GFV_{17D}, DENV₄, FSMEV, VACV) ausschließlich über ihre jeweiligen mAk detektiert werden.

4.2.4.1 Nachweis des Gelbfiebervirus (Stamm 17D)

Auch das GFV_{17D} kann sowohl unter MOPS als auch unter HEPES mit den α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk nachgewiesen werden. Keiner der weiteren getesteten mAk (α -DENV₄, α -FSMEV₁₄₉₃ bzw. α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi und α -VACV_{A1}) zeigt ein Signal. Gegenüber dem GFV_{Asibi}-Nachweis liegen für das GFV_{17D} jedoch insgesamt geringere Bindungssignale der beiden α -GFV mAk vor. Der Asibi- und der 17D-Stamm unterscheiden sich in einer Reihe von Aminosäuresubstitutionen [177,178], u. a. im E-Protein, welches von den α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk gebunden wird [97,179]. Unterschiede in der Aminosäuresequenz des E-Proteins und damit einhergehende Effekte auf die Bindung der α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk, bzw. Einflüsse des Messpuffers auf das Epitop (siehe: Einfluss des Messpuffers, 4.2.3.4), stellen folglich mögliche Gründe für diese Unterschiede zwischen den beiden GFV-Stämmen dar. Bei den IIFT-Resultaten zeigen sich im Vergleich dazu bezüglich des α -all-Flavi und α -VACV_{A1} mAk Unterschiede, da diese im IIFT Bindungssignale zeigen.

4.2.4.2 Nachweis des Denguevirus (Serotyp 4)

Der Nachweis des DENV₄ mit dem α -DENV₄ mAk ist nur in HEPES-Puffer möglich, jedoch weisen z. B. die α -GFV mAk ebenfalls eine vergleichbare Bindung auf. In MOPS-Puffer zeigen nach Zugabe des DENV₄ ausschließlich die α -GFV mAk eine Bindung. Aufgrund der ausbleibenden Signale des α -DENV₄ mAk in MOPS-Puffer wurde der in den Optimierungstests ebenfalls identifizierte Phosphatpuffer getestet. Die Ergebnisse entsprechen den Messungen in MOPS-Puffer. Ausgehend von diesen Resultaten stellen MOPS- und Phosphatpuffer keinen geeigneten Messpuffer für das getestete Antikörper-DENV-Panel dar. Da sowohl beide α -GFV mAk als auch der α -DENV₄ mAk das E-Protein binden [179,92], ist eine Kreuzreaktivität aufgrund der starken Sequenz- bzw. Strukturhomologie der E-Proteine von Flaviviren [14,16,21,97] wahrscheinlich. Darüber hinaus werden die im Abschnitt

„Einfluss des Messpuffers“ (4.2.3.4) diskutierten Ergebnisse bestätigt, wonach der verwendete Messpuffer einen signifikanten Einfluss auf die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung hat.

Im Vergleich zu den initialen Messbedingungen, wo neben dem α -DENV₄ mAk u. a. auch der α -GFV₆₅₃₈ und der α -VACV_{A1} mAk eine relevante Bindung an das DENV₄ zeigen, stellen die optimierten Messbedingungen folglich lediglich eine leichte Verbesserung dar. Gegenüber den IIFT-Resultaten zeigen sich z. B. bezüglich der α -GFV mAk Unterschiede, da diese im IIFT keine Bindung zeigen.

4.2.4.3 Nachweis des FSME-Virus und des Vacciniavirus

Für den Nachweis des FSMEV und des VACV wurde aufgrund der Ergebnisse zum DENV₄-Nachweis der Messpuffer HEPES verwendet. Für das FSMEV und VACV werden unter den optimierten Messbedingungen jeweils die stärksten Bindungssignale für den α -FSMEV₁₇₈₆ bzw. α -VACV_{A1} detektiert. Die weiteren mAk zeigen keine oder eine relevant geringere Bindung.

Für den VACV-Nachweis ergibt sich im Vergleich zu den initialen Messbedingungen somit eine sehr starke Verbesserung, da initial für das VACV unter Berücksichtigung der Zellkultur-Messergebnisse keine Bindung detektiert werden konnte. Darüber hinaus zeigen die Messungen, dass mit der SCORE-Technologie auch der Nachweis von sehr großen humanpathogenen Viren möglich ist (siehe: Visualisierung der Viren, 3.1.3).

Für das FSMEV liegen bei den initialen Messbedingungen für den α -GFV₆₅₃₈, α -DENV₄ und α -VACV_{A1} mAk (deutlich) stärkere Bindungssignale als für den α -FSMEV₁₇₈₆ mAk vor. Da die optimierten Messbedingungen das stärkste Bindungssignal für den α -FSMEV₁₇₈₆ mAk und deutlich geringere Signale für die anderen mAk bewirken, liegt für den FSMEV-Nachweis eine starke Verbesserung vor. Im Vergleich zu den IIFT-Resultaten zeigt sich in der Biosensor-Messung ein wesentlich schwächeres Bindungssignal für den α -FSMEV₁₇₈₆ mAk.

Sowohl für das FSMEV als auch das VACV werden in der Biosensor-Messung gegenüber den GFV_{Asibi}, GFV_{17D} und DENV₄ deutlich geringere Signalstärken detektiert. Aufgrund der in allen Fällen gleichen mAk-Menge pro Spot auf dem Biosensor könnte hierfür theoretisch eine geringere Anzahl an nicht-infektiösen Partikeln in den Proben verantwortlich sein (siehe: Produktion der Virusstammlösungen, 4.1.2). Allerdings wurden für die FSMEV- und VACV-Messungen unter den optimierten Bedingungen 4-fach höhere PFU-Mengen eingesetzt, sodass eine geringere Zahl an Viruspartikeln eher unwahrscheinlich erscheint. Somit

ermöglichen die optimierten Messbedingungen zwar den spezifischen Nachweis von FSMEV und VACV, gleichzeitig finden jedoch nur eine begrenzte Zahl an Bindungsereignissen statt.

Fazit zur Spezifität der Antikörper unter den optimierten Messbedingungen

Der Messpuffer HEPES (pH-Wert 7,4) erlaubt den spezifischen Nachweis des GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, FSMEV und VACV durch die jeweiligen mAk α -GFV₆₃₃₀/ α -GFV₆₅₃₈, α -FSMEV₁₇₈₆ und α -VACV_{A1}. Es zeigt sich ein spezifisches Bindungsmuster für jedes Virus, wobei die genannten mAk hierbei für das jeweilige Virus als einzige mAk eine Bindung oder ein in relevantem Umfang stärkeres Signal als die weiteren mAk aufweisen. Im Vergleich zu den initialen Messbedingungen liegt somit eine starke Verbesserung hinsichtlich des spezifischen Virusnachweises vor. Für das DENV₄ ergibt sich eine leichte Verbesserung, da neben dem α -DENV₄ mAk nach wie vor auch die α -GFV mAk deutliche Bindungen zeigen, nicht jedoch der α -VACV_{A1} mAk. Die Verbesserung der Messbedingungen spiegelt sich darüber hinaus auch in der nochmals deutlichen Reduktion unspezifischer Bindungen des Zellkulturüberstandes wider. In der Gesamtbetrachtung ist unter Berücksichtigung der mAk-Bindungsmuster der spezifische Nachweis von Viren mittels Multianalyt-Biosensor möglich.

4.2.5 Sensitivitätsuntersuchungen

Auf der Grundlage der Ergebnisse zur Optimierung der Messbedingungen wurden die Sensitivitätsuntersuchungen in HEPES (pH-Wert 7,4; 22 °C) mit dem GFV_{Asibi} durchgeführt.

4.2.5.1 Einfluss der immobilisierten Antikörpermenge auf den Virusnachweis

Die Messungen zum Einfluss der Antikörperkonzentration der Spottinglösung auf das Bindungssignal zeigen, dass eine höhere Antikörperkonzentration auch zu einem stärkeren Bindungssignal führt. So kann für den α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk mit 0,005 μ g mAk/Spot (nahezu) keine Bindung an das GFV_{Asibi} detektiert werden. Die Erhöhung der Antikörpermenge in der Spottinglösung um den Faktor 10 (0,05 μ g/Spot) führt hingegen zu einem deutlichen Bindungssignal. Eine Erhöhung der Antikörpermenge um den Faktor 100 (0,5 μ g/Spot) bewirkt eine weitere Erhöhung des Signals. Die Beobachtung, dass eine höhere Antikörpermenge zu einem stärkeren Bindungssignal führt, deckt sich mit publizierten Daten zur Untersuchung von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen [180,139]. Im Umkehrschluss führt eine höhere Antikörperdichte pro Spot zu einer höheren Sensitivität.

4.2.5.2 Einfluss der Virusmenge auf den Nachweis – Ermittlung der Nachweisgrenze

Aufgrund der Anzahl der zu prüfenden Virusmengen ($1,0 \cdot 10^3$ PFU, $6,0 \cdot 10^3$ PFU, $1,6 \cdot 10^4$ PFU, $6,6 \cdot 10^4$ PFU, $1,7 \cdot 10^5$ PFU und $6,7 \cdot 10^5$ PFU) für die Bestimmung der GFV_{Asibi}-Nachweisgrenze fanden die Messungen mit einer verdoppelten Flussrate statt (300 μ l/min). Ab einer Virusmenge von $6,7 \cdot 10^5$ PFU kann das GFV_{Asibi} mit den α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk sicher detektiert werden, wobei sich ab einer Virusmenge von $1,7 \cdot 10^5$ PFU im Mittel eine positive Korrelation zwischen Virusmenge und Bindungssignal zeigt. Für den α -GFV₆₃₃₀ mAk liegt das stärkste Signal vor und keiner der anderen getesteten mAk (α -DENV₄, α -FSMEV₁₇₈₆, α -all-Flavi sowie α -VACV_{A1}) zeigt ein Bindungssignal. In Hinblick auf die mAk-Spezifität sowie das mAk-Bindungsmuster werden die Ergebnisse zur Optimierung der Messbedingungen somit auch mit der verdoppelten Flussrate (halbierte Messzeit) bestätigt.

Von Domingo et al. werden für Patienten mit einer GFV-Infektion oder unerwünschten GFV-Impfnebenwirkungen in der virämischen Phase Virustiter von bis zu 10^8 PFU/ml diskutiert [45]. Die Nachweisgrenze für das GFV_{Asibi} liegt mit den optimierten Messbedingungen damit deutlich unterhalb des diskutierten virämischen Virustiters, was die Detektion einer akuten GFV-Infektion oder akuten Impfnebenwirkung möglich macht. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zum Einfluss der Antikörpermenge erscheint es darüber hinaus möglich, eine weitere Steigerung der Nachweisgrenze durch eine Erhöhung der Antikörperdichte pro Spot zu erzielen.

4.2.6 Nachweis von Viren in humanem Blutserum

Um eine etwaige Neutralisation des nachzuweisenden GFV_{Asibi} durch Serumantikörper zu unterbinden und eine Aussage allein auf Basis des GFV_{Asibi} treffen zu können, enthielt das verwendete humane Blutserum weder Flaviviren noch gegen Flaviviren gerichtete Antikörper. Das Serum wurde 1:10 und 1:100 mit Messpuffer inklusive $1,6 \cdot 10^6$ PFU des GFV_{Asibi} verdünnt. In beiden Fällen kann das GFV_{Asibi} über die α -GFV₆₃₃₀ und α -GFV₆₅₃₈ mAk mit starken Signalen nach weniger als 3 min detektiert werden, wobei der α -GFV₆₃₃₀ mAk jeweils das stärkere Bindungssignal aufweist. Für keinen der weiteren getesteten mAk α -DENV₄ sowie α -VACV_{A1} zeigen sich (relevante) Bindungssignale. Damit werden die Voruntersuchungen eindrucksvoll sowohl hinsichtlich der Spezifität als auch des Bindungsmusters der mAk in einer komplexen Probenmatrix bestätigt.

Ein markierungsfreier Virusnachweis in Messpuffer wurde von Schwarz et al. auch für das H1N1-Virus mit der RIfS-Methode mit Hilfe eines Antikörpers gezeigt [139]. Demgegenüber

kann mit den vorliegenden Ergebnissen der GFV_{Asibi}-Nachweis in Gegenwart von humanem Serum (d. h. im Beisein von Albumin, Immunglobulinen und weiteren Serumbestandteilen [75]) gezeigt werden. Darüber hinaus erfolgt der Virusnachweis spezifisch mittels Multianalyt-Biosensor, d. h. in Gegenwart von weiteren gegen andere Viren gerichteten mAk, welche keine (relevanten) Bindungssignale zeigen. Letzteres ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse der initialen Messbedingung, wo neben den α -GFV mAk u. a. auch der α -DENV₄ sowie α -VACV_{A1} mAk relevante Signale zeigen, hervorzuheben. Zwar kommt es mit einem höheren Anteil an Serum in der Probe zu einer Verringerung der α -GFV mAk Signale. Dies könnte jedoch ggf. durch eine höhere mAk-Spottingmenge kompensiert werden.

4.2.7 Nachweis von Antikörpern

Neben den genannten humanpathogenen Viren wurde ergänzend auch der Nachweis von Antikörpern der Klasse IgG untersucht. Die Fragestellung, ob unter den optimierten Messbedingungen neben Viren auch Antikörper nachgewiesen werden können, wurde anhand des GFV mit dem α -GFV₆₃₃₀ mAk beantwortet. Mit 2000 PFU des GFV_{Asibi} pro Spot kann der α -GFV₆₃₃₀ mAk in der Probe nachgewiesen werden. Die Spezifität des α -GFV₆₃₃₀ mAk-Nachweises wird darüber hinaus durch Messungen mit immobilisiertem Zelllysate bestätigt, wonach mit dem Zelllysate von GFV_{17D}-infizierten Zellen der Nachweis des α -GFV₆₃₃₀ mAk möglich ist.

Auffällig ist, dass sich das Bindungssignal des α -GFV₆₃₃₀ mAk auch während des Waschvorgangs (HEPES ohne Antikörper) nicht in relevantem Umfang reduziert. Dieser Befund unterscheidet sich von der Situation, in der die mAk immobilisiert und mit Viren überströmt werden. Hier kommt es mit HEPES zur starken Reduktion des Bindungssignals während des Waschvorgangs. Die Bindung des α -GFV₆₃₃₀ mAk an das immobilisierte GFV ist in HEPES folglich ausreichend stark, sodass der mAk unter Flussbedingungen nicht in relevantem Umfang vom GFV abgewaschen wird. Umgekehrt ist die Bindung des GFV an die immobilisierten α -GFV₆₃₃₀ mAk jedoch nicht von derartiger Stärke.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass die neuartige markierungsfreie Echtzeit-Methode auf Basis eines multianalytfähigen Biosensors für den spezifischen Nachweis von Viren und Antikörpern geeignet ist. Demnach werden das GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, FSMEV und VACV durch die jeweiligen mAk α -GFV₆₃₃₀/ α -GFV₆₅₃₈, α -FSMEV₁₇₈₆ bzw. α -VACV_{A1} spezifisch detektiert. Die genannten mAk zeigen hierbei für das entsprechende Virus als einzige eine Bindung oder weisen ein relevant stärkeres Signal als die anderen getesteten mAk auf. Eine Unterscheidung der Viren auf Basis der spezifischen mAk-Bindungsmuster ist damit unter Einbeziehung der Probenvorbereitung in weniger als 10 min möglich, und dies sowohl bei 22 °C als auch 37 °C.

Die Nachweisgrenze für das GFV_{Asibi} liegt mit den in dieser Arbeit etablierten Messbedingungen deutlich unterhalb des möglichen virämischen Virustiters einer GFV-Infektion. Darüber hinaus können die Ergebnisse zur Spezifität inklusive des spezifischen Bindungsmusters des Virusnachweises auch in komplexen Proben (humanes Blutserum) bestätigt werden. Die Leistungsfähigkeit der SCORE-Technologie wird auch hinsichtlich der unterschiedlichen Morphologie der getesteten Viren gezeigt. So gehören die untersuchten Flaviviren zu den kleinsten und die VACV zu den größten Vertretern humanpathogener Viren. Darüber hinaus können mittels der SCORE-Technologie auch Antikörper nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit der SCORE-Technologie eine schnelle, robuste, sensitive und spezifische Messplattform zur Verfügung steht, welche grundsätzlich zum Virusnachweis geeignet ist. In Hinblick auf den möglichen zukünftigen Einsatz dieser neuartigen Methode für die Diagnostik von Virusinfektionen sollten weitere Studien die Untersuchung klinischer Proben zum Gegenstand haben. Hierbei sollte die Spezifität und die Sensitivität sowohl des Virus- als auch des Antikörpernachweises anhand einer größeren Zahl an Proben mit unterschiedlichen Virus- bzw. Antikörpertitern validiert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit können für die Biosensor-Messung u. a. der pH-Wert, die Ionenstärke, das Puffersystem sowie die Konzentration der Antikörper und des Virus als relevante Faktoren für den Flavivirus-Nachweis identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wird gezeigt, dass die Spezifität bzw. Funktionalität der Antikörper von den Messbedingungen abhängig ist und sich zwischen den verwendeten Antikörpern unterscheiden kann. Auf Basis der optimierten Messbedingungen ergibt sich für das DENV₄ nur eine leichte Verbesserung hinsichtlich des spezifischen Nachweises, da neben dem α -DENV₄ mAk auch weitere Antikörper eine relevante Bindung an das DENV₄ zeigen.

Basierend auf den Ergebnissen zum DENV-Nachweis sollten nachfolgende Untersuchungen daher die Eignung weiterer Antikörper für den DENV-Nachweis prüfen und darüber hinaus andere als die in der Arbeit untersuchten Messpuffer testen.

Erstmalig wird im Rahmen dieser Arbeit die Spezifität der mAk mit der SCORE-Methode für die humanpathogenen Viren GFV_{Asibi}, GFV_{17D}, DENV₄, FSMEV und VACV bestimmt. Darüber hinausgehend wird auch erstmalig in diesem Umfang eine Charakterisierung der Spezifität der Antikörper im IIFT für die genannten Viren vergleichend analysiert. Hierbei ist festzustellen, dass die Bindungseigenschaften eines Antikörpers in einem Messsystem nicht unmittelbar übertragbar auf ein anderes Messsystem sind und für jedes System eine Überprüfung der Spezifität/Funktionalität der Antikörper vorgenommen werden muss. Hierbei zeigen sich je nach Messmethode für die untersuchten Viren unterschiedliche Antikörper-Bindungsmuster.

Die Biosensor-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf Messungen mit einem Prototypen. Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden vom Kooperationspartner Biometrics GmbH kommerziell verfügbare Messgeräte („b-screen“, „b-portable“) entwickelt, die auf der SCORE-Technologie basieren. Neben einer verbesserten Benutzeroberfläche werden u. a. die Probennahme, die Messung, die Datenerfassung sowie deren Auswertung über eine Software automatisiert ausgeführt, womit sich wesentliche Verbesserungen zu dem in dieser Arbeit verwendeten Prototypen hinsichtlich des Probenhandhabung, der Bedienung und der Ergebniserzeugung ergeben. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, des markierungsfreien und temperaturunempfindlichen Echtzeit-Messprinzips, der einfachen Probenvorbereitung, der kurzen Messdauer und des kostengünstigen Biosensorchips ist die SCORE-Technologie damit prinzipiell als *Point-of-Care*-Diagnostik für Virusinfektionen geeignet. Weitere Studien müssten in diesem Zusammenhang die Lagerungsfähigkeit der mit Antikörpern beschichteten Biosensoren untersuchen sowie weitere Antikörper für den Nachweis anderer humanpathogener Viren testen. Über den Virusnachweis hinausgehend stellt die neue markierungsfreie Echtzeit-Biosensor-Technologie aufgrund ihrer Charakteristika eine Methodenplattform dar, die in vielfältigen Bereichen Anwendung finden kann. Beispielsweise sind neben Proteinen auch Peptide, Nukleinsäuren, Zellen oder kleine Moleküle als Analyte denkbar. Abgesehen vom Nachweis anderer Pathogene wie z. B. Bakterien, sind daher als mögliche Einsatzfelder u. a. die Wirkstoffentwicklung, Biotechnologie, Lebensmittelindustrie und Umweltüberwachung zu nennen.

6 Literaturverzeichnis

1. Taubenberger JK, Morens DM (2006) 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerging infectious diseases* 12 (1): 15–22.
2. Johnson NP, Mueller J (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the history of medicine* 76 (1): 105–115.
3. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430 (6996): 242–249.
4. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD (2004) Diagnostics for the developing world. *Nature reviews. Microbiology* 2 (3): 231–240.
5. Cassini A, Colzani E, Pini A, Mangen M-JJ, Plass D et al. (2018) Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. *Euro surveillance* 23 (16).
6. Aurelie KK, Guy MM, Fuamba Bona N, Charles KM, Mawupemor AP, Li Shixue (2017) A Historical Review of Ebola Outbreaks: IntechOpen. Available: <https://www.intechopen.com/citation-pdf-url/58406>.
7. Holbrook MR (2017) Historical Perspectives on Flavivirus Research. *Viruses* 9 (5).
8. Ferreira-de-Brito A, Ribeiro IP, Miranda RM de, Fernandes RS, Campos SS et al. (2016) First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 111 (10): 655–658.
9. Plourde AR, Bloch EM (2016) A Literature Review of Zika Virus. *Emerging infectious diseases* 22 (7): 1185–1192.
10. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW et al. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496 (7446): 504–507.
11. Zanluca C, Mazzarotto GACA, Bordignon J, Duarte Dos Santos CN (2014) Development, characterization and application of monoclonal antibodies against Brazilian Dengue virus isolates. *PloS one* 9 (11): e110620.
12. Bell DM (2004) Public Health Interventions and SARS Spread, 2003. *Emerging infectious diseases* 10 (11): 1900–1906.

13. Saker L, Lee K, Cannito B, Gilmore A, Campbell-Lendrum D (2004) Globalization and infectious diseases: a review of the linkages.
14. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors (2017) Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition). Chapter 29, Flaviviridae. Boston: Academic Press.
15. Zanotto PM, Gould EA, Gao GF, Harvey PH, Holmes EC (1996) Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (2): 548–553.
16. Holbrook MR, Shope RE, Barrett ADT (2004) Use of Recombinant E Protein Domain III-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Differentiation of Tick-Borne Encephalitis Serocomplex Flaviviruses from Mosquito-Borne Flaviviruses. *Journal of clinical microbiology* 42 (9): 4101–4110.
17. Kuno G, Chang G-JJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB (1998) Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology* 72 (1): 73–83.
18. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS et al. (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *The Journal of general virology* 70 (Pt 1): 37–43.
19. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG (2005) A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature reviews. Microbiology* 3 (1): 13–22.
20. Baron S, editor (1996) *Medical Microbiology*. Chapter 41, Structure and Classification of Viruses. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston.
21. Heinz FX, Stiasny K (2012) Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 30 (29): 4301–4306.
22. Best SM (2016) Flaviviruses. *Current Biology* 26 (24): R1258-R1260. Available: <http://www.cell.com/article/S0960982216310806/fulltext>.
23. Knipe DM, Howley PM, editors (2007) *Fields Virology*. Chapter 33, Flaviviridae: The viruses and their replication. Philadelphia: Lippincott-Rave Publishers. 1101 p.
24. Zhang Y, Corver J, Chipman PR, Zhang W, Pletnev S v. et al. (2003) Structures of immature flavivirus particles. *The EMBO Journal* 22 (11): 2604–2613.
25. Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW, Kunz C et al. (1995) Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH. *Journal of Virology* 69 (2): 695–700.

26. Stiasny K, Heinz FX (2006) Flavivirus membrane fusion. *The Journal of general virology* 87 (Pt 10): 2755–2766.
27. Roehrig JT (2003) Antigenic structure of flavivirus proteins. *Advances in virus research* 59: 141–175.
28. Chávez JH, Silva JR, Amarilla AA, Moraes Figueiredo LT (2010) Domain III peptides from flavivirus envelope protein are useful antigens for serologic diagnosis and targets for immunization. *Biologicals* 38 (6): 613–618.
29. Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375 (6529): 291–298.
30. Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2003) A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (12): 6986–6991.
31. Kanai R, Kar K, Anthony K, Gould LH, Ledizet M et al. (2006) Crystal Structure of West Nile Virus Envelope Glycoprotein Reveals Viral Surface Epitopes. *Journal of Virology* 80 (22): 11000–11008.
32. Waggoner JJ, Rojas A, Pinsky BA (2018) Yellow Fever Virus: Diagnostics for a Persistent Arboviral Threat. *Journal of clinical microbiology* 56 (10).
33. Falgout B, Markoff L (1995) Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology* 69 (11): 7232–7243.
34. Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA et al. (1999) Dengue Virus Type 1 Nonstructural Glycoprotein NS1 Is Secreted from Mammalian Cells as a Soluble Hexamer in a Glycosylation-Dependent Fashion. *Journal of Virology* 73 (7): 6104–6110.
35. Sampath A, Padmanabhan R (2008) Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral research* 81 (1): 6–15.
36. Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX (1997) Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *Journal of Virology* 71 (11): 8475–8481.
37. Simmons CP, Farrar JJ, van Nguyen VC, Wills B (2012) Dengue. *The New England journal of medicine* 366 (15): 1423–1432.

38. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Ted Pierson The flavivirus lifecycle. Available: <https://www.niaid.nih.gov/research/ted-c-pierson-phd>. Accessed 30 May 2019.
39. Centers for Disease Control and Prevention Yellow Fever: History, Epidemiology, and Vaccination Information. History Timeline. Available: <https://www.cdc.gov/travel-training/local/HistoryEpidemiologyandVaccination/HistoryTimelineTranscript.pdf>. Accessed 8 June 2019.
40. Kiehl W, editor (2011) Steckbriefe seltener und importierter Infektionskrankheiten. Berlin: Robert Koch-Institut. 185 p.
41. Monath TP (2005) Yellow fever vaccine. Expert review of vaccines 4 (4): 553–574.
42. Johansson MA, Vasconcelos PFC, Staples JE (2014) The whole iceberg: estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 108 (8): 482–487.
43. World health organization (WHO) Yellow fever. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>. Accessed 7 June 2019.
44. Reusken CBEM, Knoester M, GeurtsvanKessel C, Koopmans M, Knapen DG et al. (2017) Urine as Sample Type for Molecular Diagnosis of Natural Yellow Fever Virus Infections. Journal of clinical microbiology 55 (11): 3294–3296.
45. Escadafal C, Faye O, Sall AA, Faye O, Weidmann M et al. (2014) Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. PLoS neglected tropical diseases 8 (3): e2730.
46. Johansson MA, Arana-Vizcarrondo N, Biggerstaff BJ, Staples JE (2010) Incubation periods of Yellow fever virus. The American journal of tropical medicine and hygiene 83 (1): 183–188.
47. Maeda A, Maeda J (2012) Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. Veterinary journal (London, England : 1997) 195 (1): 33–40.
48. Theiler M, Smith HH (1937) The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. The Journal of experimental medicine 65 (6): 787–800.

-
49. Barrett ADT, Teuwen DE (2009) Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place. *Current opinion in immunology* 21 (3): 308–313.
 50. (2013) Vaccines and vaccination against yellow fever. WHO position paper - June 2013. *Releve epidemiologique hebdomadaire* 88 (27): 269–283.
 51. Pepper OHP (1941) A note on David Blyon and dengue. *Ann. Med. Hist.* 3.
 52. World health organization (WHO) (2009) *Dengue. Guidelines for Diagnosis Treatment Prevention and Control*. Geneva: World Health Organization. 158 p.
 53. Kyle JL, Harris E (2008) Global spread and persistence of dengue. *Annual review of microbiology* 62: 71–92.
 54. World health organization (WHO) *Dengue and severe dengue*. Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Accessed 30 May 2019.
 55. Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX (1999) Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *The Journal of general virology* 80 (Pt 1): 179–185.
 56. Zilber LA (1939) Spring-summer tick-borne encephalitis. *Arkhiv Biol Nauk* (56): 255–261.
 57. Dumpis U, Crook D, Oksi J (1999) Tick-Borne Encephalitis. *Clin Infect Dis* 28 (4): 882–890. Available: <https://academic.oup.com/cid/article-pdf/28/4/882/1123943/28-4-882.pdf>.
 58. Lindquist L, Vapalahti O (2008) Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 371 (9627): 1861–1871.
 59. Satz N (2006) *Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)*. Bern: Huber. 353 p.
 60. (2011) Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper. *Releve epidemiologique hebdomadaire* 86 (24): 241–256.
 61. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA (2003) Tick-borne encephalitis. *Antiviral research* 57 (1-2): 129–146.
 62. Süss J (2005) Zunehmende Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Europa. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 130 (22): 1397–1400.

-
63. Süss J (2008) Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Eurosurveillance* 13 (26): 18916.
 64. Hellenbrand W, Kreusch T, Böhmer MM, Wagner-Wiening C, Dobler G et al. (2019) Epidemiology of Tick-Borne Encephalitis (TBE) in Germany, 2001-2018. *Pathogens* 8 (2).
 65. Kunz C (1992) Tick-borne encephalitis in Europe. *Acta Leidensia* 60 (2): 1–14.
 66. Modrow S (2010) *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
 67. Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR et al. (2009) Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *The Journal of general virology* 90 (Pt 8): 1781–1794.
 68. Mandl CW (2005) Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* 111 (2): 161–174.
 69. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H (2010) Zoonotic poxviruses. *Veterinary microbiology* 140 (3-4): 229–236.
 70. Condit RC, Moussatche N, Traktman P (2006) In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Advances in virus research* 66: 31–124.
 71. Sodeik B, Krijnse-Locker J (2002) Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host. *Trends in microbiology* 10 (1): 15–24.
 72. Moss B (2011) Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunological reviews* 239 (1): 8–26.
 73. Forthal DN (2014) Functions of Antibodies. *Microbiology spectrum* 2 (4): 1–17.
 74. Mak TW, Saunders ME (2006) 9 - The Humoral Response: B Cell Development and Activation. In: Mak TW, Saunders ME, editors. *The immune response. Basic and clinical principles*. Amsterdam, Boston: Elsevier/Academic. pp. 209–245.
 75. Barrett KE, Ganong WF (2010) *Ganong's review of medical physiology*. New York: McGraw-Hill Medical. 800 p.
 76. Schroeder HW, Cavacini L (2010) Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (202): S41–S52.
 77. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G (2015) B Cells, Antibodies, and More. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 11 (1): 137–154.

78. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T (2014) IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology* 5 (520).
79. Tan YH, Liu M, Nolting B, Go JG, Gervay-Hague J et al. (2008) A Nanoengineering Approach for Investigation and Regulation of Protein Immobilization. *ACS nano* 2 (11): 2374–2384.
80. San Paulo A, García R (2000) High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophysical Journal* 78 (3): 1599–1605.
81. Saber R, Sarkar S, Gill P, Nazari B, Faridani F (2011) High resolution imaging of IgG and IgM molecules by scanning tunneling microscopy in air condition. *Scientia Iranica* 18 (6): 1643–1646.
82. Reverberi R, Reverberi L (2007) Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfusion* 5 (4): 227–240.
83. Kamata N, Enomoto A, Ishida S, Nakamura K, Kurisaki J et al. (1996) Comparison of pH and ionic strength dependence of interactions between monoclonal antibodies and bovine beta-lactoglobulin. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 60 (1): 25–29.
84. Siddiqui MZ (2010) Monoclonal Antibodies as Diagnostics; an Appraisal. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 72 (1): 12–17.
85. Mahmuda A, Bande F, Abdulhaleem N, Al-Zihiry KJK, Majid RA et al. (2017) Monoclonal antibodies in immunodiagnostic assays: a review of recent applications. *Sokoto journal of veterinary sciences* 15 (1): 1–10.
86. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517): 495–497.
87. Köhler G, Milstein C (1976) Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European journal of immunology* 6 (7): 511–519.
88. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE (1982) Dengue virus-specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 31 (4): 830–836.
89. Gelderblom HR, Kocks C, L'Age-Stehr J, Reupke H (1985) Comparative immunoelectron microscopy with monoclonal antibodies on yellow fever virus-infected

- cells: pre-embedding labelling versus immunocyoultramicrotomy. *Journal of virological methods* 10 (3): 225–239.
90. Niedrig M, Klockmann U, Lang W, Roeder J, Burk S et al. (1994) Monoclonal antibodies directed against tick-borne encephalitis virus with neutralizing activity in vivo. *Acta virologica* 38 (3): 141–149.
91. Stern D, Pauly D, Zydek M, Miller L, Piesker J et al. (2016) Development of a Genus-Specific Antigen Capture ELISA for Orthopoxviruses - Target Selection and Optimized Screening. *PloS one* 11 (3): e0150110.
92. Hsieh S-C, Tsai W-Y, Nerurkar VR, Wang W-K (2014) Characterization of the ectodomain of the envelope protein of dengue virus type 4: expression, membrane association, secretion and particle formation in the absence of precursor membrane protein. *PloS one* 9 (6): e100641.
93. Yao ZJ, Kao MC, Loh KC, Chung MC (1995) A serotype-specific epitope of dengue virus 1 identified by phage displayed random peptide library. *FEMS microbiology letters* 127 (1-2): 93–98.
94. Hiramatsu K, Tadano M, Men R, Lai C-J (1996) Mutational Analysis of a Neutralization Epitope on the Dengue Type 2 Virus (DEN2) Envelope Protein: Monoclonal Antibody Resistant DEN2/DEN4 Chimeras Exhibit Reduced Mouse Neurovirulence. *Virology* 224 (2): 437–445.
95. Parameswaran P, Wang C, Trivedi SB, Eswarappa M, Montoya M et al. (2017) Intrahost Selection Pressures Drive Rapid Dengue Virus Microevolution in Acute Human Infections. *Cell host & microbe* 22 (3): 400-410.e5.
96. Bae H-G, Nitsche A, Teichmann A, Biel SS, Niedrig M (2003) Detection of yellow fever virus: a comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *Journal of virological methods* 110 (2): 185–191.
97. Daffis S, Kontermann RE, Korimbocus J, Zeller H, Klenk H-D et al. (2005) Antibody responses against wild-type yellow fever virus and the 17D vaccine strain: characterization with human monoclonal antibody fragments and neutralization escape variants. *Virology* 337 (2): 262–272.
98. Sysmex Deutschland GmbH, Hitado GmbH (2012) Schneller Weg zur direkten Diagnostik – Point-of-Care-Testing voll vernetzt. Available:

-
- https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Xtra/Themenblaetter/16.1.03_Direkte_Diagnostik_POCT.pdf. Accessed 10 June 2019.
99. Storch GA (2000) Diagnostic virology. *Clinical infectious diseases* 31 (3): 739–751.
 100. Biel SS, Gelderblom HR (1999) Diagnostic electron microscopy is still a timely and rewarding method. *Journal of clinical virology* 13 (1-2): 105–119.
 101. Sin MLY, Mach KE, Wong PK, Liao JC (2014) Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert review of molecular diagnostics* 14 (2): 225–244.
 102. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors (2017) *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Chapter 5, Laboratory Diagnosis of Viral Infections. Boston: Academic Press.
 103. Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T et al. (2013) Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virology journal* 10: 58.
 104. Damborský P, Švitel J, Katrlík J (2016) Optical biosensors. *Essays in biochemistry* 60 (1): 91–100.
 105. M. Ewald, A. Le Blanc, V. Frimmer, G. Gauglitz, editors (2011) *Eine neue Biosensor Plattform für den Einsatz in der Tierdiagnostik*.
 106. Ewald M, Le AB, Gauglitz G, Proll G (2013) A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera. *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (20): 6461–6469.
 107. Zybin A, Kuritsyn YA, Gurevich EL, Temchura VV, Überla K et al. (2010) Real-time Detection of Single Immobilized Nanoparticles by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Plasmonics* 5 (1): 31–35.
 108. Wang S, Shan X, Patel U, Huang X, Lu J et al. (2010) Label-free imaging, detection, and mass measurement of single viruses by surface plasmon resonance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (37): 16028–16032.
 109. Victoria S (2012) Application of Surface Plasmon Resonance (SPR) for the Detection of Single Viruses and Single Biological Nano-objects. *Journal of bacteriology and parasitology* 3 (7): 1–3.

110. Riedel T, Rodriguez-Emmenegger C, de los Santos Pereira, Andres, Bědajánková A, Jinoch P et al. (2014) Diagnosis of Epstein–Barr virus infection in clinical serum samples by an SPR biosensor assay. *Biosensors and Bioelectronics* 55: 278–284.
111. Burger J, Rath C, Woehrle J, Meyer PA, Ben Ammar N et al. (2017) Low-Volume Label-Free Detection of Molecule-Protein Interactions on Microarrays by Imaging Reflectometric Interferometry. *SLAS technology* 22 (4): 437–446.
112. Proll G, Markovic G, Fechner P, Proell F, Gauglitz G Reflectometric Interference Spectroscopy. Rasooly, Prickril (Ed.) 2017 – *Biosensors and Biodetection*. pp. 207–220.
113. Madrid AT de, Porterfield JS (1969) A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization* 40 (1): 113–121.
114. Ansari MZ, Shope RE, Malik S (1993) Evaluation of vero cell lysate antigen for the ELISA of flaviviruses. *Journal of clinical laboratory analysis* 7 (4): 230–237.
115. Jaspert R, Geske T, Teichmann A, Kaßner Y-M, Kretzschmar K et al. (1995) Laboratory scale production of monoclonal antibodies in a tumbling chamber. *Journal of Immunological Methods* 178 (1): 77–87.
116. Geske T, Kretzschmar K-G Bedienungsanleitung Taumelrotationskammer.
117. Möller L, Schünadel L, Nitsche A, Schwebke I, Hanisch M et al. (2015) Evaluation of virus inactivation by formaldehyde to enhance biosafety of diagnostic electron microscopy. *Viruses* 7 (2): 666–679.
118. Laue M (2010) Electron microscopy of viruses. *Methods in cell biology* 96: 1–20.
119. Dähn O (2015) Establishment of an RfS biosensor assay for the label-free detection of viral infection, Master thesis. Berlin.
120. Kuhlmann I, Kurth W, Ruhdel I (1989) Monoklonale Antikörper: In vivo- und in vitro-Produktion im Labormassstab unter Berücksichtigung tierschutzrechtlicher Aspekte. *ALTEX* 6 (2): 12–26.
121. Borges MB, Marchevsky RS, Mendes YS, Mendes LG, Duarte AC et al. (2018) Characterization of recent and minimally passaged Brazilian dengue viruses inducing robust infection in rhesus macaques. *PloS one* 13 (4): e0196311.
122. Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, Silva AM de (2005) Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *Journal of clinical microbiology* 43 (7): 3267–3272.

-
123. Li J, Hu D-m, Ding X-x, Chen Y, Pan Y-x et al. (2011) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-Format Tissue Culture Infectious Dose-50 Test for Titrating Dengue Virus. *PloS one* 6 (7).
124. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L (2005) Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bulletin, World Health Organization* (29): 49–57.
125. Perrin P, Morgeaux S (1995) Inactivation of DNA by beta-propiolactone. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 23 (3): 207–211.
126. Mahy BWJ, van Regenmortel MHV, editors (2010) Desk encyclopedia of human and medical virology. Amsterdam: Elsevier. 642 p.
127. Fang Y, Brault AC, Reisen WK (2009) Comparative thermostability of West Nile, St. Louis encephalitis, and western equine encephalomyelitis viruses during heat inactivation for serologic diagnostics. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 80 (5): 862–863.
128. Idris F, Muharram SH, Zaini Z, Diah S (2018) Effectiveness of physical inactivation methods of dengue virus: heat-versus UV-inactivation. Accessed 30 May 2019.
129. Tuladhar E, Bouwknecht M, Zwietering MH, Koopmans M, Duizer E (2012) Thermal stability of structurally different viruses with proven or potential relevance to food safety. *Journal of applied microbiology* 112 (5): 1050–1057.
130. Weidmann M, Sall AA, Manuguerra J-C, Koivogui L, Adjami A et al. (2011) Quantitative analysis of particles, genomes and infectious particles in supernatants of haemorrhagic fever virus cell cultures. *Virology journal* 8: 81.
131. Baker JL, Ward BM (2014) Development and comparison of a quantitative TaqMan-MGB real-time PCR assay to three other methods of quantifying vaccinia virions. *Journal of virological methods* 196: 126–132.
132. Klasse PJ (2014) Molecular Determinants of the Ratio of Inert to Infectious Virus Particles. *Progress in molecular biology and translational science* 129: 285–326.
133. Chao D-Y, Davis BS, Chang G-JJ (2006) Development of Multiplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays for Detecting Eight Medically Important Flaviviruses in Mosquitoes. *Journal of clinical microbiology* 45 (2): 584–589.

-
134. Gäumann R, Ružek D, Mühlemann K, Strasser M, Beuret CM (2011) Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis virus field isolates from Switzerland. *Journal of medical virology* 83 (5): 853–863.
135. Ishak R, Tovey DG, Howard CR (1988) Morphogenesis of yellow fever virus 17D in infected cell cultures. *The Journal of general virology* 69 (Pt 2): 325–335.
136. Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G et al. (2013) Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nature structural & molecular biology* 20 (1): 105–110.
137. Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC et al. (2016) The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science* 352 (6284): 467–470.
138. Ohyama A, Ito T, Tanimura E, Huang SC, Hsue J (1977) Electron microscopic observation of the budding maturation of group B arboviruses. *Microbiology and immunology* 21 (9): 535–538.
139. Schwarz B, Schweizer N, Pörl F, Proll G, Gauglitz G (2010) Label-free detection of H1N1 virus for point of care testing. *Procedia Engineering* 5: 906–909.
140. Proll G, Hartjes A, Sinclair A, Markovic G, Pröll F et al. (2014) Optical biosensor system for the quick and reliable detection of virus infections: VIROSENS. In: Burgess D, Owen G, Rana H, Zamboni R, Kajzar F et al., editors. *Optics and Photonics for Counterterrorism, Crime Fighting, and Defence X; and Optical Materials and Biomaterials in Security and Defence Systems Technology XI*: SPIE. 92530S.
141. Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H, Heinz FX (2006) Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *Journal of Virology* 80 (19): 9557–9568.
142. Stiasny K, Allison SL, Marchler-Bauer A, Kunz C, Heinz FX (1996) Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Virology* 70 (11): 8142–8147.
143. Bordeaux J, Welsh AW, Agarwal S, Killiam E, Baquero MT et al. (2010) Antibody validation. *BioTechniques* 48 (3): 197–209.
144. Uhlen M, Bandrowski A, Carr S, Edwards A, Ellenberg J et al. (2016) A proposal for validation of antibodies. *Nature methods* 13 (10): 823–827.
145. Mahmood T, Yang P-C (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 4 (9): 429–434.
-

146. Eltoun I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE (2001) Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *Journal of Histotechnology* 24 (3): 173–190.
147. Koraka P, Zeller H, Niedrig M, Osterhaus ADME, Groen J (2002) Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes and infection* 4 (12): 1209–1215.
148. Niedrig M, Vaisviliene D, Teichmann A, Klockmann U, Biel SS (2001) Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *Journal of clinical virology* 20 (3): 179–182.
149. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett ADT et al. (2011) Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *The Journal of general virology* 92 (Pt 12): 2821–2829.
150. Bollweg BC, Silva-Flannery L, Spivey P, Hale GL (2018) Optimization of commercially available Zika virus antibodies for use in a laboratory-developed immunohistochemical assay. *The journal of pathology. Clinical research* 4 (1): 19–25.
151. Hadzhieva M, Pashov AD, Kaveri S, Lacroix-Desmazes S, Mouquet H et al. Impact of Antigen Density on the Binding Mechanism of IgG Antibodies. *Scientific Reports* 7 (1): 3767.
152. Bennion BJ, Daggett V (2003) The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9): 5142–5147.
153. Lim WK, Rösgen J, Englander SW (2009) Urea, but not guanidinium, destabilizes proteins by forming hydrogen bonds to the peptide group. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (8): 2595–2600.
154. Engvall E, Perlmann P (1972) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Elisa: III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme-Labeled Anti-Immunoglobulin in Antigen-Coated Tubes. *The Journal of Immunology* 109 (1): 129–135.
155. Hwee Ming C, Sook-Fan Y (1988) Enhancement of anti-phospholipid antibody activity by Tween 20. *Journal of Immunological Methods* 109 (2): 253–255.
156. Tovey ER, Ford SA, Baldo BA (1989) Enhanced immunodetection of blotted house dust mite protein allergens on nitrocellulose following blocking with Tween 20. *Electrophoresis* 10 (4): 243–249.

157. Gassmann C, Bauer G (1997) Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections. *Journal of medical virology* 51 (3): 242–251.
158. Klasse PJ (2016) How to assess the binding strength of antibodies elicited by vaccination against HIV and other viruses. *Expert review of vaccines* 15 (3): 295–311.
159. Papavasiliou FN, Schatz DG (2002) Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity. *Cell* 109 Suppl: S35-44.
160. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J et al. (2005) Discrimination between Primary and Secondary Dengue Virus Infection by an Immunoglobulin G Avidity Test Using a Single Acute-Phase Serum Sample. *Journal of clinical microbiology* 43 (6): 2793–2797.
161. Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F, Shead S, Niedrig M et al. (2005) Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *Journal of clinical microbiology* 43 (12): 5873–5875.
162. Matikainen MT (1984) Effect of pH on reactivity of monoclonal antibodies to Chlamydia. *Journal of Immunological Methods* 75 (2): 211–216.
163. Dejaegere A, Choulier L, Lafont V, Genst E de, Altschuh D (2005) Variations in antigen-antibody association kinetics as a function of pH and salt concentration: a QSAR and molecular modeling study. *Biochemistry* 44 (44): 14409–14418.
164. Lošdorfer Božič A, Podgornik R (2017) pH Dependence of Charge Multipole Moments in Proteins. *Biophysical Journal* 113 (7): 1454–1465.
165. Sivasankar S, Subramaniam S, d. Leckband (1998) Direct molecular level measurements of the electrostatic properties of a protein surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (22): 12961–12966.
166. O'Brien EP, Brooks BR, d. Thirumalai (2011) Effects of pH on proteins: Predictions for ensemble and single molecule pulling experiments. *Journal of the American Chemical Society* 134 (2): 979–987.
167. Lim X-X, Chandramohan A, Lim X-YE, Crowe JE, Lok S-M et al. (2017) Epitope and Paratope Mapping Reveals Temperature-Dependent Alterations in the Dengue-Antibody Interface. *Structure* 25 (9): 1391-1402.e3.

-
168. Austin SK, Dowd KA, Shrestha B, Nelson CA, Edeling MA et al. (2012) Structural basis of differential neutralization of DENV-1 genotypes by an antibody that recognizes a cryptic epitope. *PLoS pathogens* 8 (10): e1002930.
169. Dowd KA, Mukherjee S, Kuhn RJ, Pierson TC (2014) Combined effects of the structural heterogeneity and dynamics of flaviviruses on antibody recognition. *Journal of Virology* 88 (20): 11726–11737.
170. interchim Good's buffers (biological buffers). Available: <http://www.interchim.fr/ft/0/062000.pdf>. Accessed 30 May 2019.
171. Roberts D, Keeling R, Tracka M, van der Walle CF, Uddin S et al. (2015) Specific ion and buffer effects on protein-protein interactions of a monoclonal antibody. *Molecular pharmaceutics* 12 (1): 179–193.
172. Janc T, Vlachy V, Lukšič M (2018) Calorimetric studies of interactions between low molecular weight salts and bovine serum albumin in water at pH values below and above the isoionic point. *Journal of molecular liquids* 270: 74–80.
173. Gagné F (2014) Chapter 2 - Tissue Preparation and Subcellular Fractionation Techniques. In: Gagné F, André C, Auclair J, Lacaze E, Quinn B, editors. *Biochemical ecotoxicology. Principles and methods*. Oxford: Academic Press. pp. 21–31.
174. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S et al. (1966) Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry* 5 (2): 467–477.
175. Ferguson WJ, Braunschweiger KI, Braunschweiger WR, Smith JR, McCormick JJ et al. (1980) Hydrogen ion buffers for biological research. *Analytical Biochemistry* 104 (2): 300–310.
176. Taha M, Gupta BS, Khoiroh I, Lee M-J (2011) Interactions of Biological Buffers with Macromolecules: The Ubiquitous “Smart” Polymer PNIPAM and the Biological Buffers MES, MOPS, and MOPSO. *Macromolecules* 44 (21): 8575–8589.
177. Hahn CS, Dalrymple JM, Strauss JH, Rice CM (1987) Comparison of the virulent Asibi strain of yellow fever virus with the 17D vaccine strain derived from it. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (7): 2019–2023.
178. Galler R, Freire MS, Jabor AV, Mann GF (1997) The yellow fever 17D vaccine virus: molecular basis of viral attenuation and its use as an expression vector. *Brazilian journal of medical and biological research* 30 (2): 157–168.
-

179. Bae H-G (2006) Analyse der Immunantwort nach Infektion mit Gelbfiebertviren.
Dissertation. Available: https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/fub188/2411/1/0_bae.pdf.
Accessed 30 May 2019.
180. Yang D, Singh A, Wu H, Kroe-Barrett R (2017) Determination of High-affinity
Antibody-antigen Binding Kinetics Using Four Biosensor Platforms. *Journal of
visualized experiments* (122).

7 Anhang

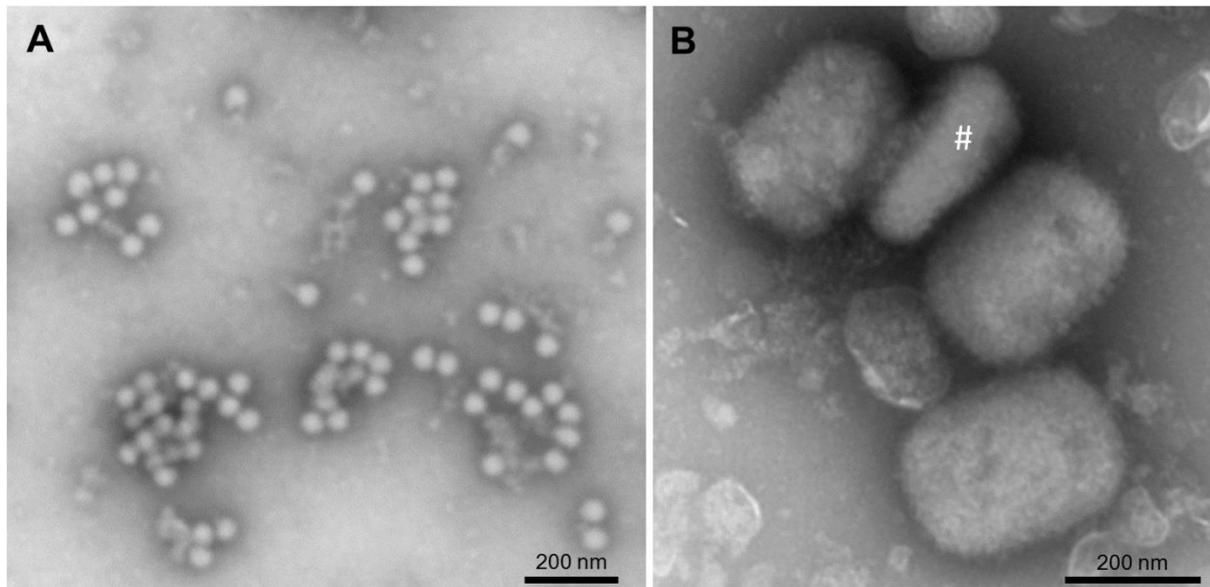


Abb. A36 Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahmen des GFV_{Asibi} und VACV. [A]: GFV_{Asibi}-Virionen (Negativkontrastierung). [B]: Vier VACV-Virionen (Negativkontrastierung), zum Teil in Querlage (#).

Tab. A36 Quantifizierung der Virus-Stammlösungen auf Basis zytopathischer Viruspartikel. Die Bestimmung des Virus-Titers (*Plaque Forming Units/ml*) erfolgte mittels Plaque-Titrationstest. #: Für die DENV₁₋₄ konnte mittels Plaque-Titrationstest kein Virustiter bestimmt werden.

Virus	GFV _{17D}	GFV _{Asibi}	DENV ₁	DENV ₂	DENV ₃	DENV ₄	FSMEV	VACV
Titer								
PFU/ml	$2,9 \cdot 10^7$	$8,0 \cdot 10^6$	-#	-#	-#	-#	$2,3 \cdot 10^7$	$4,0 \cdot 10^7$

Tab. A37 Quantifizierung der Virus-Stammlösungen auf Basis viraler Nukleinsäuren. Die quantitative Bestimmung der Genomäquivalente (GÄ/ml) erfolgte mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

Virus	GFV _{17D}	GFV _{Asibi}	DENV ₁	DENV ₂	DENV ₃	DENV ₄	FSMEV	VACV
GÄ/ml	$2,2 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^8$	$5,6 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^9$	$4,4 \cdot 10^7$	$5,6 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^9$	$7,2 \cdot 10^7$

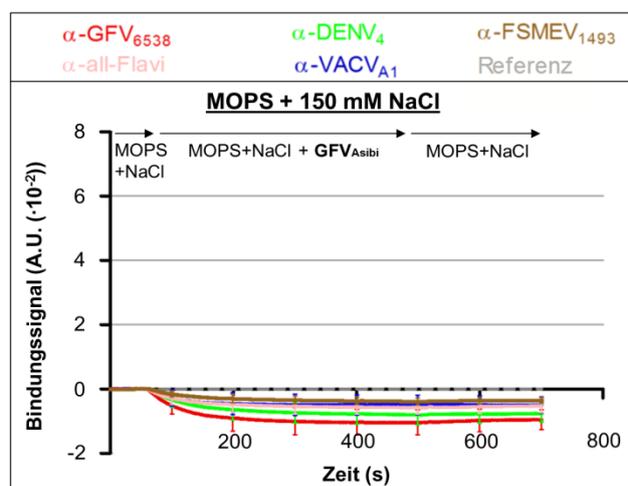


Abb. A37 Einfluss von NaCl auf die Spezifität der Antikörper am Beispiel des GFV_{Asibi}. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit dem Gelbfiebervirus Stamm Asibi (GFV_{Asibi}; $1,6 \cdot 10^6$ PFU) überströmt. Dargestellt sind Bindungskurven unter MOPS-Puffer mit 150 mM NaCl (pH-Wert 7,4) bei Raumtemperatur. Bei Virusbindung an die Antikörper erfolgt im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) eine Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, welches sich in einer Erhöhung des Bindungssignals äußert. Eine Schichtdickenreduktion führt zur Signalverringering. Mittelwert \pm SD, $n \geq 9$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

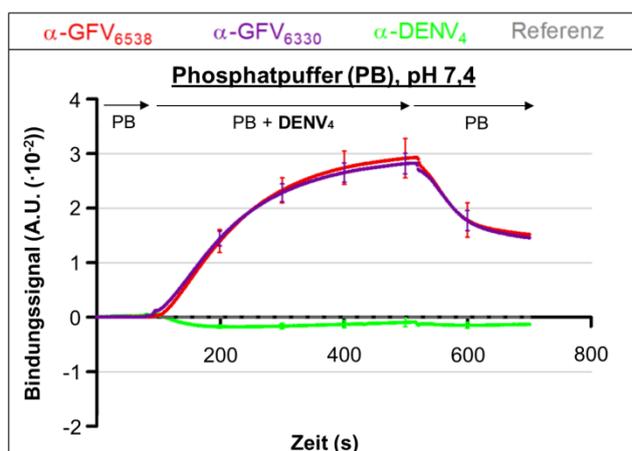


Abb. A38 Spezifität der Antikörper hinsichtlich des DENV₄ in Phosphatpuffer. Die auf den Biosensor-Chips immobilisierten Antikörper wurden in der Flusszelle mit dem DENV-Serotyp 4 (DENV₄) überströmt. Die Virusbindung an die Antikörper führte im Verhältnis zur Referenz (Biosensorareale ohne mAk) zu einer Zunahme der Schichtdicke der Biosensoren im Spottingareal des jeweiligen Antikörpers, dargestellt in der Zunahme des Bindungssignals. Eine Schichtdickenreduktion führte zur Signalverringerng. Die jeweils maximalen Bindungssignale sind Tab. A38 zu entnehmen. Messbedingungen: Phosphatpuffer (PB, pH-Wert 7,4). Mittelwert \pm SD, DENV₄: $n \geq 7$. A.U.: *Arbitrary Unit*.

Tab. A38 Maximale Bindungssignale der Spezifitätsprüfung der Antikörper zum Nachweis des DENV₄ in Phosphatpuffer.

		Maximales Bindungssignal [A.U. ($\cdot 10^{-2}$) \pm SD ($\cdot 10^{-2}$)]
Puffer		Phosphatpuffer (PB) pH 7,4
mAk		
α -GFV ₆₅₃₈		2,73 \pm 0,37
α -GFV ₆₃₃₀		2,69 \pm 0,20
α -DENV ₄		< Referenz

Tabelle zu Abb. A38. Mittelwert \pm SD, $n \geq 7$. ANOVA gefolgt von Bonferroni's Multiple Comparison Test. *: $p \leq 0,05$. < Referenz: Messwerte geringer als die Referenz (nicht dargestellt). Messbedingungen: Phosphatpuffer + DENV₄. Referenz: Biosensorareale ohne mAk. A.U.: *Arbitrary Unit*.

8 Eigene ausgewählte Veröffentlichungen

- 03/2017: Microbiology and Infection, 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM, Würzburg
Poster: Virus detection by use of a novel label-free biosensor technology
- 11/2016: Next Generation Microarrays Tour, Potsdam
Mitwirkung zum Vortrag von Hr. Prof. Dr. Matthias Niedrig: Viral Threats Worldwide
- 04/2016: 15th Medical Biodefense Conference, München
Poster: Rapid detection of viral infections by use of a novel optical biosensor technology
- 04/2016: 26th Annual Meeting of the Society for Virology, Münster
Poster: Development of a rapid detection method for viral infections by use of an optical biosensor technology

9 Eidesstattliche Erklärung

Mit meiner Unterzeichnung erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den von mir im Verzeichnis aufgeführten Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, 20.06.2019