



Hochschule für Angewandte  
Wissenschaften Hamburg  
*Hamburg University of Applied Sciences*



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences

# **Untersuchung der Infektiosität von HIV-1 Pseudotypen mit Hüllprotein Chimären humanpathogener Flaviviren**

**Masterarbeit**

im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

vorgelegt von

**Safa Ghanemi**



Hamburg, 1.1.2020

Die vorliegende Masterarbeit wurde in der Laborgruppe von Dr. Schreiber in der Abteilung Virologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)

Zweiter Gutachter: Dr. Michael Scheiber (BNITM Hamburg)

## **Danksagung**

Dr. Michael Schreiber möchte ich an dieser Stelle für das Ermöglichen dieser Arbeit, die Bereitstellung des spannenden Themas und die Aufnahme in seine Laborgruppe danken. Zusätzlich möchte ich mich für die konstruktiven Gespräche während der Betreuung und für die Freiheiten, eigene Lösungswege zu verfolgen, bedanken. Durch die Zusammenarbeit konnte ich mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich weiterentwickeln.

Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker gilt ebenfalls besonderer Dank, für die Betreuung der Masterarbeit als Erstgutachter und für das große Engagement bei der Klärung von Fragen und Problemstellungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern der Laborgruppe LG-Schreiber für die hilfsbereite Unterstützung bedanken. Bei Kerstin Krausz bedanke ich mich für die anfängliche Einarbeitung und die freundliche Hilfe bei Problemen im Labor. Daniel Hoffmann danke ich ebenso für die Unterstützung bei Problemstellungen sowie fachlichen Fragestellungen im Labor.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich während meines Studiums, bei all meinen Entscheidungen mit großem Engagement durchgängig unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben, gilt mein besonderer Dank.

Abschließend möchte ich mich bei meinen engsten Freunden bedanken, die mich während meiner gesamten Zeit ermutigt und unterstützt haben.

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>1.1</b>	<b>Pseudotypisierte Viruspartikel</b> .....	1
<b>1.2</b>	<b>Flaviviren</b> .....	6
1.2.1	Zikavirus.....	6
1.2.2	Japanische Enzephalitis-Virus.....	7
1.2.3	Usutuvirus.....	7
<b>1.3</b>	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	8
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	9
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	9
2.1.1	Geräte.....	9
2.1.2	Zellkulturmaterialien.....	10
2.1.3	Zellen.....	10
2.1.4	Plasmide.....	10
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien</b> .....	11
2.2.1	Reagenzien.....	12
2.2.2	Reagenzien-Kits.....	12
<b>2.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b> .....	13
2.3.1	Medien und Agarplatten.....	13
2.3.2	Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien.....	13
2.3.3	Herstellung chemokompetenter Bakterien.....	14
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	14
2.4.1	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> .....	14
2.4.2	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA.....	15
2.4.2.1	Minipräparation durch alkalische Lyse.....	15
2.4.2.2	CsCl-Maxipräparation.....	15
2.4.2.3	DNA-Extraktion mit Glasmilch.....	17
2.4.3	Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA.....	18
2.4.4	DNA-Sequenzierung.....	18
2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	18

<b>2.5</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b> .....	19
2.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	19
2.5.2	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotischen Zellen .....	19
2.5.2.1	SFA-Transfektion von Plasmid-DNA .....	20
2.5.2.2	PEI-Transfektion von Plasmid-DNA .....	21
2.5.3	Infektion von Zellen mit pseudotypisierten Viruspartikeln .....	21
2.5.4	Luciferase-Assay .....	22
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	23
<b>3.1</b>	<b>Aufreinigung der Vektoren</b> .....	23
<b>3.2</b>	<b>Herstellung pseudotypisierter Viruspartikel</b> .....	25
3.2.1	Herstellung von USUV, JEV und ZIKV prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln .....	27
3.2.2	Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikeln mit prM/E der USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären .....	28
3.2.3	Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV-Chimären .....	29
<b>3.3</b>	<b>Infektion von Vero-B4-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln</b> .....	30
3.3.1	Infektion von Vero-B4-Zellen mit USUV-, JEV- Virus- und ZIKV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln .....	31
3.3.2	Infektion von Vero-B4-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E-Chimären der USUV-ZIKV .....	37
3.3.3	Infektion von Vero-B4-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV Chimären .....	42
<b>3.4</b>	<b>Infektion von U87-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln</b> .....	47
3.4.1	Infektion von U87-Zellen mit Usutu-, JE- und Zika- prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln .....	48
3.4.2	Infektion von U87-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1- Partikeln mit prM/E-Chimären der USUV-ZIKV .....	50
3.4.3	Infektion von U87-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV- Chimären .....	52

<b>3.5</b>	<b>Infektion von Hg39-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln</b> .....	54
3.5.1	Infektion von Hg39-Zellen mit USUV-, JEV- und ZIKV- prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln .....	55
3.5.2	Infektion von Hg39-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E-Chimären der USUV-ZIKV .....	57
3.5.3	Infektion von Hg39-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV-Chimären .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	61
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	68
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	69
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	70
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	77
<b>8.1</b>	<b>Sequenzen der Flavivirus M und E Proteine</b> .....	77
8.1.1	pHA-USU-BH65 .....	77
8.1.2	pHA-USU-BH65.....	77
8.1.3	pHA-JE-NAK.....	78
8.1.4	pHA-JE-NAK.....	79
8.1.5	pHA-Z41519 .....	79
8.1.6	pHA-Z41519 .....	80
8.1.7	pHA-U12Z3.....	81
8.1.8	pHA-U12Z3.....	81
8.1.9	pHA-Z12U3.....	82
8.1.10	pHA-Z12U3.....	83
8.1.11	pHA-J12Z3.....	83
8.1.12	pHA-J12Z3.....	84
8.1.13	pHA-Z12J3.....	85
<b>8.2</b>	<b>Expressionsvektor</b> .....	86
8.2.1	Flavivirus prM/E-Expressionsvektor .....	86
8.2.2	HIV-1- $\Delta$ env-Virusvektor .....	87
<b>9</b>	<b>Eidesstaatliche Erklärung</b> .....	88

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aufbau des Humanen-Immundefizienz-Virus Typ-1 .....	1
Abb. 2:	Aufbau und Struktur der Flaviren .....	2
Abb. 3:	Struktur des Flavivirus E-Protein Dimers .....	3
Abb. 4:	Struktur eines pseudotypisierten HIV-1-Viruspartikels mit den Flavivirus prM/E Hüllproteinen.....	4
Abb. 5:	Aufgereinigte Plasmid DNA der Pseudotyp Vektoren. ....	24
Abb. 6:	Vektoren für die Herstellung von Flavivirus prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln. ....	26
Abb. 7:	Infektion mit Usutu, JE und Zika-Pseudotypen.....	36
Abb. 8:	Infektion mit Usutu-Zika-Chimären-HIV-1-Pseudotypen.....	41
Abb. 9:	Infektion mit Japanische-Enzephalitis -Zika-Pseudotypen.....	46

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Luciferase-Aktivitäten mittels pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK und pHA-Z41519 transfizierter HEK293T-Zellen. ....	27
Tab. 2:	Luciferase-Aktivitäten mittels pHA-U12Z3 und pHA-Z12U3 transfizierter HEK293T-Zellen.....	28
Tab. 3:	Luciferase-Aktivitäten (RLU) mittels pHA-J12Z3 und pHA- Z12J3 transfizierter HEK293T-Zellen.....	29
Tab. 4:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika- prM/E Pseudotypen infizierten Vero-B4-Zellen.....	32
Tab. 5:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika- prM/E Pseudotypen infizierten Vero-B4-Zellen.....	33
Tab. 6:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika- prM/E Pseudotypen infizierten Vero-B4-Zellen.....	34
Tab. 7:	Luciferase-Aktivitäten des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM in Vero-B4-Zellen.....	35
Tab. 8:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein- Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.....	38
Tab. 9:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein- Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.....	39

Tab. 10:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.....	40
Tab. 11:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit prM/E der JE-Zika-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen. ....	43
Tab. 12:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit prM/E der JE-Zika-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen. ....	44
Tab. 13:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit prM/E der JE-Zika-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen. ....	45
Tab. 14:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika-prM/E Pseudotypen infizierten U87-Zellen.....	49
Tab. 15:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten U87-Zellen.....	51
Tab. 16:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit JEV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten U87-Zellen.....	53
Tab. 17:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika-prM/E Pseudotypen infizierten Hg39-Zellen.....	56
Tab. 18:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Hg39-Zellen.....	58
Tab. 19:	Luciferase-Aktivitäten mittels der mit JEV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Hg39-Zellen.....	60



## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
β-Gal	β Galactosidase
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Bp	Basenpaar
C-Protein	Kapsidprotein ( <i>capsid protein</i> )
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DENV	Denguevirus
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
<i>Env</i>	<i>Envelope</i>
E-Protein	Hüllprotein ( <i>envelope protein</i> )
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Rinderserum ( <i>fetale bovine serum</i> )
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GFP	grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
HIV-1	Humanes-Immundefizienz-Virus-Typ-1
JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
Kb	Kilobasenpaar
LG	Laborgruppe
Luc	Luciferase
MLV	Murines Leukämie-Virus
MVEV	Murray Valley Enzephalitis-Virus
MW	Mittelwert
M-Protein	Membranprotein ( <i>membrane protein</i> )
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte

ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
prM-Protein	Vorläufer des M-Proteins ( <i>precursor membrane protein</i> )
RLU	Relative Lichteinheiten ( <i>relative light units</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SU	äußere Hüllprotein ( <i>surface</i> )
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus ( <i>tick-borne encephalitis virus</i> )
TM	Transmembranprotein
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
USUV	Usutuivirus
VLP	Virus-ähnliche-Partikel ( <i>virus-like-particle</i> )
VSV	Vesikuläre Stomatitis Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNV	Westnil-Virus
YFV	Gelbfiebertvirus ( <i>yellow fever virus</i> )
ZIKV	Zikavirus
ZKP	Zellkulturplatte
ZKÜ	Zellkulturüberstand

## Nukleobasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

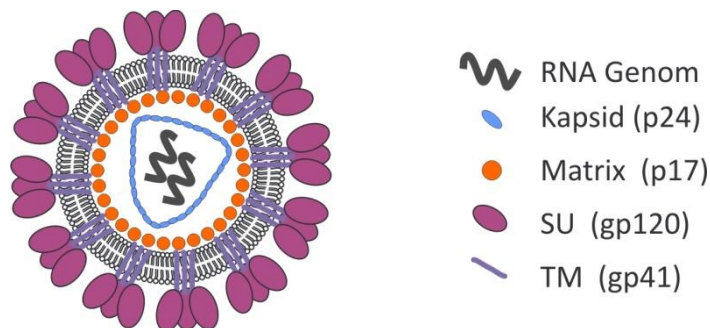
## Aminosäuren

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

## 1 Einleitung

### 1.1 Pseudotypisierte Viruspartikel

Für die Herstellung pseudotypisierter Viruspartikel werden vorzugsweise lentivirale Vektoren benutzt [1,2]. Eine Möglichkeit ist die Verwendung des Genoms des Humanen-Immundefizienz-Virus Typ-1 (HIV-1) [3]. Mit einem Vektorsystem das auf HIV-1 basiert können verschiedenste pseudotypisierte Partikel hergestellt werden, wenn deren Hüllproteine in die Zellmembran der Wirtszelle eingelagert werden. In Abbildung 1 ist die Struktur des HIV-1 dargestellt.



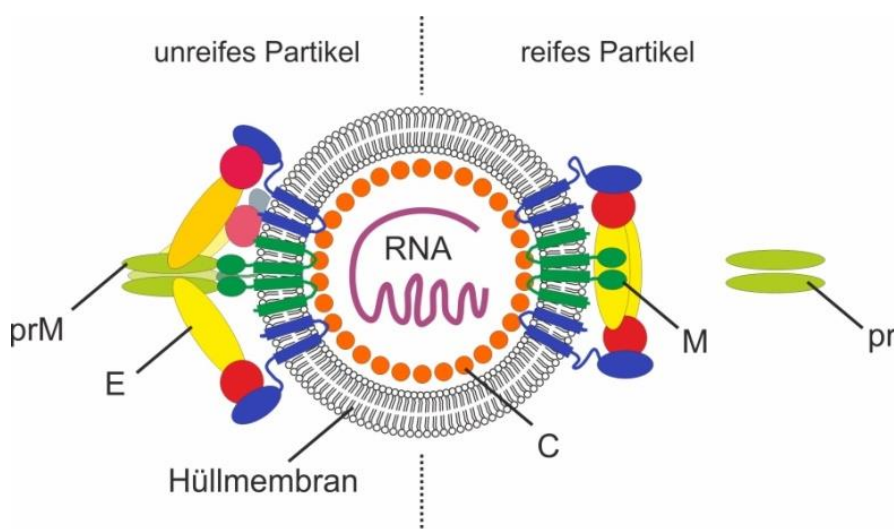
**Abb. 1: Aufbau des Humanen-Immundefizienz-Virus Typ-1**

In die Membran des Humanen-Immundefizienz-Virus Typ-1 (HIV-1) ist das Transmembranprotein (TM) gp41 eingelagert. An diesem ist das äußere Hüllprotein (SU) gp120 gebunden. Beide Hüllproteine bilden ein Trimer. Die innere Struktur besteht aus dem Matrixprotein p17 und dem Kapsidprotein p24. Im p24 Kapsid befinden sich zwei identische Kopien des Genoms. Für die Herstellung von Virus-Pseudotypen werden die beiden Hüllproteine, gp41 und gp120, durch Hüllproteine anderer Viren ersetzt.

Durch die Herstellung von HIV-1-Pseudotypen können verschiedenste Eigenschaften, wie z. B. der Zelleintritt, ein veränderter Tropismus gegenüber Wirtszellen oder eine erhöhte oder verminderte Infektiosität untersucht werden. Eine Besonderheit der pseudotypisierten HIV-1-Partikeln, ist das sie aufgrund der Deletion des Hüllprotein-Gens ( $\Delta env$ ), nicht die vollständigen genetischen Informationen für eine Vermehrung bzw. Replikation besitzen. Pseudotypen, die ein solches  $\Delta env$  Genom besitzen sind in der Lage in die Zellen einzudringen, können jedoch nach dem

Zelleintritt keine neuen infektiösen Partikel bilden, da sie keine Hüllproteine exprimieren können. Dieser Replikationsvorgang wird auch als *single-round-infection* bezeichnet. Wird in dem Pseudotyp-Plasmid das Hüllprotein durch Reportergene, wie beispielsweise Luciferase [4],  $\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -Gal) [5] oder GFP (grün fluoreszierendes Protein) [6] ersetzt, erhält man ein  $\Delta env$  Genom das anstelle des env-Gens ein solches Reportergen trägt. Durch die Übertragung des Reportergens auf die Wirtszelle kann der Zelleintritt eines Pseudotypen leicht anhand der Enzymaktivität, z. B der Luciferase, detektiert und quantifiziert werden [7].

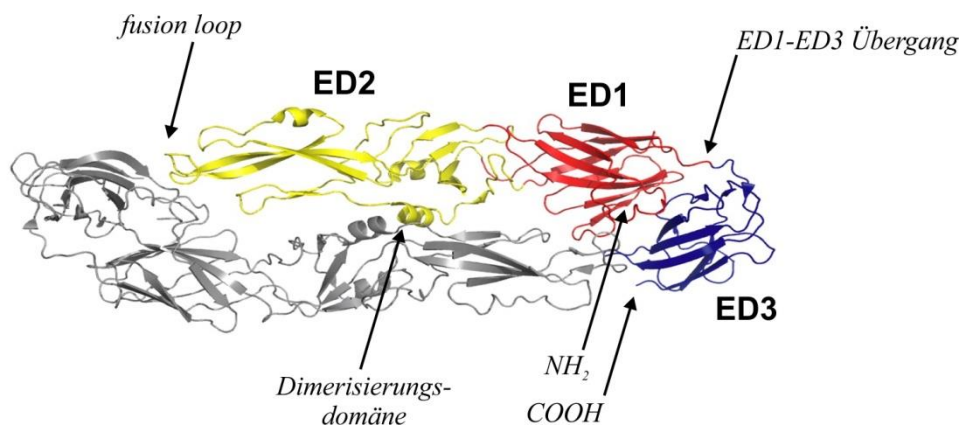
In dieser Arbeit sollen HIV-1-Pseudotypen untersucht werden, die Hüllproteine der Flaviviren tragen. Die Flaviviren sind alle identisch aufgebaut und besitzen im Inneren ein positiv-orientiertes RNA-Genom, welches sich in dem vom C-Protein gebildeten Kapsid befindet (Abb. 2). Die Hüllmembran entstammt dem endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle. In diese Membran sind die beiden Transmembranproteine prM und E eingelagert. Nach der proteolytischen Abspaltung der pr-Domäne kommt es zu einer Strukturumlagerung der äußeren Hüllproteine M und E. Dieser Zustand wird als der reife, bzw. infektiöse Zustand des Viruspartikels bezeichnet.



**Abb. 2: Aufbau und Struktur der Flaviren**

Flaviviren werden als unreife Partikel freigesetzt. Die Umwandlung in reife, bzw. infektiöse Partikel erfolgt durch die proteolytische Abspaltung des pr-Peptides durch eine zelluläre Furin-Protease. C, Capsid-Protein; M, M-Protein; pr, von M abgespaltene Domäne; E, E-Protein.

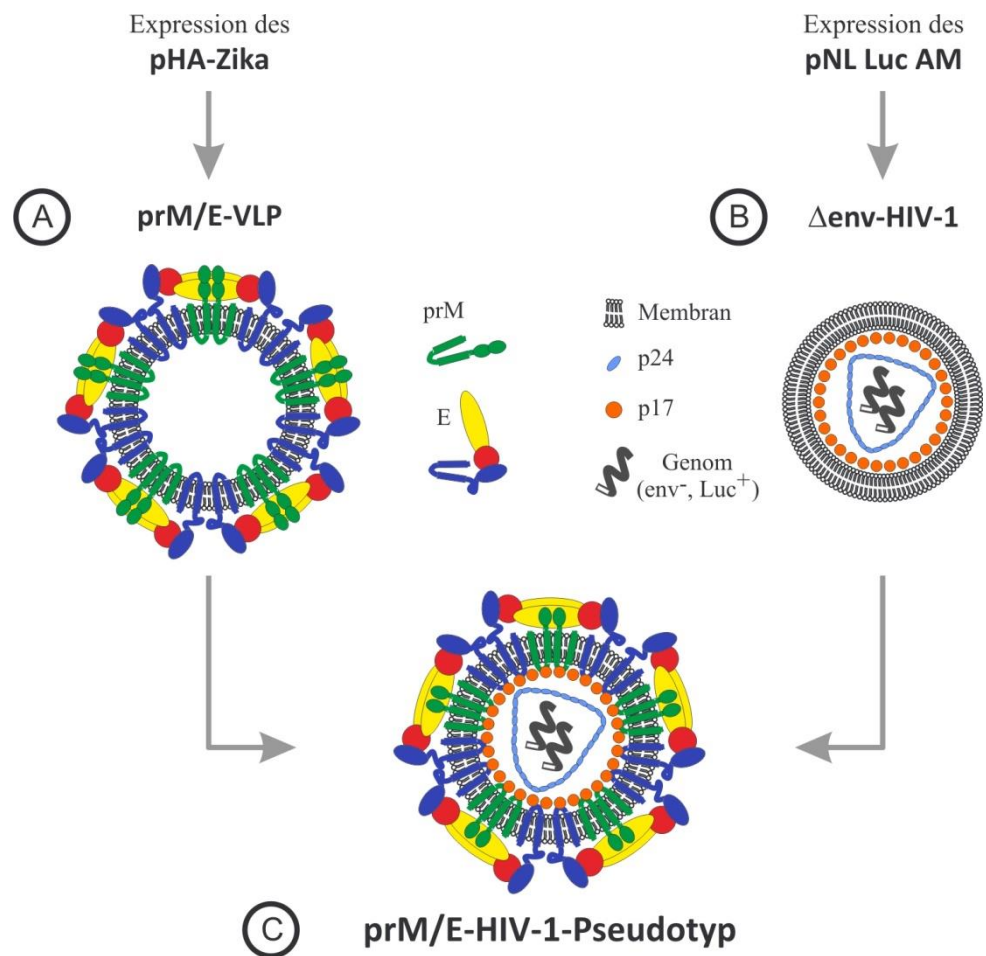
Das äußere Hüllprotein E besteht aus drei Domänen, ED1, ED2 und ED3 (Abb. 3). Das E-Protein liegt als Dimer vor, welches durch die Dimerisierungsregion in der ED2-Domäne gebildet wird. Die ED3 Domäne ist die Rezeptor-bindende Domäne und schließt an die ED1-Domäne an (Abb. 3, ED1-ED3-Übergang). Die ED3-Domäne ist linear codiert und kann daher durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) leicht amplifiziert und kloniert werden. Das gleiche gilt für die ED1--ED2-Region. Dadurch lässt sich das E-Protein in zwei getrennt zu klonierende Bereiche unterteilen, die ED1--ED2-Region und die ED3-Domäne. Durch Kombination von ED1--ED2-Regionen mit ED3-Domänen unterschiedlicher Flaviviren lassen sich so E-Protein-Chimären herstellen (Nomenklatur = X<sub>12</sub>Y<sub>3</sub>).



**Abb. 3: Struktur des Flavivirus E-Protein Dimers**

Das Protein besteht aus den drei Domänen, ED1, ED2 und ED3. Die zweite Domäne, ED2 (gelb) besitzt den *fusion loop*, der die Fusion der Virus- mit der Zellmembran bewirkt sowie die Dimerisierungsdomäne. Die Domäne ED3 (blau) ist für die Bindung an den zellulären Rezeptor verantwortlich. Da die ED3-Domäne als linearer Genabschnitt vorliegt, lassen sich Viruschimären mit ED3-Austauschen am ED1-ED3 Übergang leicht herstellen. *Abbildung modifiziert aus: Wahala et al., (2012) [8].*

Bei einem pseudotypisierten Viruspartikel sind die viralen Hüllproteine ( $\Delta$ env) gegen die Hüllproteine eines anderen Virus ausgetauscht. Viruspartikel ohne viralen Kern werden als virusähnliche Partikel (*virus like particles*, VLP) bezeichnet (Abb. 4).



**Abb. 4: Struktur eines pseudotypisierten HIV-1-Viruspartikels mit den Flavivirus prM/E Hüllproteinen.**

(A) Durch die Expression von prM und E bilden sich virusähnliche-Partikel (VLP). Diese enthalten kein Genom. Sie entstehen bei der Expression der Zika-Hüllproteine an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. (B) Die virale Struktur bildet das HIV-1 welches env deletiert ist (HIV-1- $\Delta$ env) Die innere Struktur wird von dem Matrixprotein p17 gebildet, in ihm befinden sich zwei identische RNA-Genome, welche vom Kapsid p24 umschlossen sind. In das HIV-1-Genom ist ein Reporter gen für das Enzym Luciferase eingebaut (Genom  $\Delta$ env Luc<sup>+</sup>). (C) Der Zika prM/E-HIV-1-Pseudotyp trägt als äußere Hülle die Hüllproteine des Zikavirus und besitzt im Inneren die Struktur und das Genom der HIV-1- $\Delta$ env Luc<sup>+</sup> Variante. Der Viruseintritt eines solchen Pseudotypen kann daher leicht anhand der Luciferase Aktivität detektiert und quantifiziert werden [9].

Durch das Fehlen der viralen Matrix- und Kapsidstrukturen sowie des virale Genoms im Inneren des VLP können VLPs zwar mit der Zellmembran verschmelzen, es kann aber keine Replikation stattfinden [10]. Als Viruskern werden verschiedene Lentiviren [11], aber auch das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) verwendet [2]. Dabei werden virale Vektoren verwendet bei denen die Hüllproteine entfernt wurden und stattdessen ein Reporter gen eingesetzt wurde. Als Reportergene eignen sich das *green fluorescent protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* oder die Luciferase des Glühwürmchens *Photinus pyralis* (*fire-fly Luciferase*). Anhand des Reportergens kann die Infektion von Zellen mit solchen pseudotypisierten Viruspartikeln leicht gemessen werden. Die pseudotypisierten Partikel übertragen das virale Genom und die Reportergene werden in der infizierten Zelle abgelesen. Daher sind für die Analyse von Viren und deren Infektionsmechanismen pseudotypisierte Partikel von großer Bedeutung, weshalb sie im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen und klinischer Studien vielfach zum Einsatz kommen [12]. Weit verbreitete Vektoren für die Herstellung verschiedenster pseudotypisierter Partikel sind lentivirale Vektoren. Lentiviren bilden eine Gattung innerhalb der Familie der Retroviren. Der bekannteste Vertreter der Lentiviren ist das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) [11].

Pseudotypisierte Partikel werden bei einer Kotransfektion mit Hilfe zweier Plasmide hergestellt. Ein Plasmid trägt das virale Genom und das andere Plasmid codiert für die Hüllproteine prM und E. Vor allem Plasmide mit einem HIV-1- $\Delta$ env [13] oder HIV-1-env<sup>-</sup> [14] Genom finden häufig Einsatz als Vektoren zur Herstellung viraler Pseudotypen. Im Fall der Flavivirus prM/E-HIV-1-Pseudotypen gibt es bisher keine wissenschaftliche Veröffentlichung, mit einer Ausnahme, der Publikation von Hu *et al.*, (2007) [14]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden lassen sich aber nicht reproduzieren und führen nicht zur Herstellung prM/E pseudotypisierter HIV-1-Partikel.

In einem Review zu viralen Pseudotypen wird diese Arbeit auch als nicht umsetzbar bewertet [2]. In der Arbeitsgruppe Laborgruppe-Schreiber (LG) am BNITM wurde aber in den letzten Jahren eine Methode zur Herstellung solcher Pseudotypen erarbeitet und kontinuierlich verbessert. Mit dieser Methode werden pseudotypisierte Partikel mittels einer Kotransfektion von eukaryotischen Zellen mit zwei Vektoren, einem HIV-1- $\Delta$ env Vektor und einem Expressionsvektor für prM/E hergestellt (Abb. 4). Die Kotransfektion von HEK293T-Zellen mit beiden Vektoren führt zur Bildung und Ausschleusung pseudotypisierter Partikel in den Zellkulturüberstand (ZKÜ).



## 1.2 Flaviviren

Die Gattung Flaviviren der Familie *Flaviviridae* besteht aus mehr als 70 verschiedenen Virustypen. Das Genom aller Flaviviren besteht aus einem positiv-orientierten RNA-Einzelstrang. Zu den bekanntesten humanpathogenen Vertretern aus der Gattung der Flaviviren, zählen das namensgebende (flavus = gelb) Gelbfiebervirus (yellow fever virus, YFV), das Denguevirus (DENV), das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV), das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (tick-borne encephalitis virus, TBEV), das Westnil-Virus (WNV) und die Zikaviren (ZIKV). Die Übertragung der Flaviviren auf den Menschen erfolgt durch Arthropoden (Mücken, Zecken), weshalb die Flaviviren zu den Arboviren gezählt werden [15,16].

### 1.2.1 Zikavirus

Im Jahr 1947 wurde das Zikavirus von einem Rhesusaffen aus dem Zika-Wald, einem tropischen Wald in der Nähe von Entebbe (Uganda), isoliert [17]. Im Jahr 1952 wurde das ZIKV erstmals im Menschen nachgewiesen. Die vollständige Genom-Sequenzierung und Charakterisierung des ZIKV erfolgte 2006 [18]. Generell wird beim ZIKV zwischen afrikanischen und asiatischen Virusisolaten unterschieden [19]. In den meisten Fällen verläuft eine Infektion asymptomatisch. Milde nicht lebensbedrohliche symptomatische Anzeichen sind unter anderem leichtes Fieber, Arthralgie, Myalgie, Konjunktivitis, Kopfschmerzen, und Hautausschlag [20]. Es gibt jedoch zunehmend Studien, die Belegen das eine ZIKV-Infektion mit neurologischen Erkrankungen, wie dem Guillain-Barré-Syndrom (GBS) bei Erwachsenen sowie der Mikrozephalie bei Föten und Säuglingen zusammenhängt [21,22].

Der erste große Zika-Ausbruch außerhalb von Afrika und Asien fand 2013 in Französisch-Polynesien statt [23]. Seit 2015 hat sich das ZIKV der asiatischen Linie in ganz Südamerika, ausgehend von Brasilien, rasch verbreitet. Da es 2015 zu einem sprunghaften Anstieg von Zika-induzierten Fehlbildungen bei Neugeborenen kam hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) die ZIKV-Infektion im Februar 2016 als weltweiten Gesundheitsnotstand ausgerufen [24,25].

Das einzelsträngige, positive RNA-Molekül des ZIKV hat eine Länge von 10794 Kilobasenpaare (kb) und besitzt ein offenes Leseraster (*open reading frame* (ORF)), welcher am 5'- und 3'-Ende von nicht-kodierenden Sequenzen flankiert ist. Das kodierte Polyprotein 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' weist drei

Strukturproteine, das Kapsidprotein C (*capsid protein*), das Vorläufer Membranprotein M (*premembrane protein*) das Hüllprotein E (*envelope protein*) und sieben Nichtstrukturproteine (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) auf. Dabei bilden das Membranprotein M sowie das Hüllprotein E die äußere Hülle. Das E-Protein ist vor allem für die Rezeptorbindung, Membranfusion und den Neurotropismus des ZIKV verantwortlich [18] [26].

### **1.2.2 Japanische Enzephalitis-Virus**

Im Jahr 1935 wurde das JEV (Stamm Nakayma) erstmals in Japan aus dem Gehirn eines verstorbenen Enzephalitisopfers isoliert [27,28]. Das einzelsträngige positive RNA-Genom des JEV ist ca. 11 kb groß [29]. Das JEV stellt ein enormes Gesundheitsproblem dar. Es sind in etwa 68,000 klinische Fälle und 10,000 bis 15,000 Todesfälle pro Jahr bekannt [30]. Typische Symptome einer JEV-Infektion sind unter anderem Fieber, Kopfschmerzen, Durchfall, psychische Veränderungen und Hirnhautreizungen. Betroffene mit einer akuten Enzephalitis weisen neurologische Symptome, wie Bewegungsstörungen und mentale Zustandsänderungen auf. Zudem haben JE-Patienten häufig Symptome, die der Parkinson-Krankheit ähneln [29,31].

### **1.2.3 Usutuvirus**

Das Usutuvirus (USUV) ist mit dem JEV, dem WNV und dem Murray Valley Enzephalitis-Virus (MVEV) verwandt. Diese werden zu den Japanischen Enzephalitis-Virus-Serokomplex zugeordnet [32]. Das Virus wurde erstmals 1959 in Südafrika aus Stechmücken der Art *Culex neavei* isoliert und nach dem Fluss Usutu in Swasiland (Afrika) benannt [33]. Das einzelsträngige positive RNA-Molekül des USUV besitzt 11064 Nukleotide [34].

2001 trat das Virus erstmals außerhalb von Afrika in Europa (Österreich) auf, und verursachte ein Massensterben der Eurasischen Amseln (*Turdus merula*) [35]. Die Infektion bei Vögeln verläuft oft letal, beim Menschen verläuft die Infektion meist asymptomatisch oder mit sehr geringen Beschwerden. Es gibt aber auch einige Fälle, bei denen die Infektion beim Menschen mit neurologischen Komplikationen einhergeht. Die ersten Fälle schwerer Enzephalitis aufgrund einer USUV Infektion wurden 2009 in Italien bei zwei immungeschwächten Personen gemeldet [36,37].

### 1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung von pseudotypisierten HIV-1-Partikel mit prM/E-Hüllen von verschiedenen Flaviviren und Viruschimären (Zika-, Usutu- und Japanische Enzephalitis-Virus), sowie den Neurotropismus der Pseudotypen durch Infektionsversuche an verschiedenen Zellen zu erforschen. Zur Verfügung standen verschiedene Flavivirus prM/E-Expressionsvektoren für prM/E Hüllproteine und prM/E-Chimären ( $X_{12}Y_3$ ). Die ED1--ED2-ED3-Viruschimären entstanden durch den Austausch der ED3 Region eines Virus gegen die ED3 Region eines anderen Virus, wodurch sich die einzelnen Domänen genauer studieren lassen.

Die Arbeit wird in drei Abschnitte unterteilt. Im ersten Teil der Arbeit sollen nach einer Transformation in chemokompetente DH5 $\alpha$ -Zellen, die entsprechenden Plasmide in Bakterien vermehrt und mittels der CsCl-Methode in einem größeren Maßstab isoliert und anschließend aufgereinigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen die pseudotypisierten Partikel in HEK-293T-Zellen hergestellt werden. Dafür soll die Plasmid-DNA in HEK293T-Zellen transfiziert und die Transfektion anhand der Expression des Reportergens Luciferase überprüft werden. Abschließend soll im dritten Teil der Arbeit die Infektiosität der pseudotypisierten HIV-1-Partikeln für verschiedene Zellen (Vero-B4, U87 und Hg39) untersucht werden. Die Zellkulturüberstände der transfizierten Zellkulturen, welche die pseudotypisierten Viruspartikel enthalten, sollen zu den Vero-B4, U87 und Hg39 Zellen hinzugegeben werden. Durch die Expression des Luciferase-Reportergens in den infizierten Zellen sollen die resultierenden Infektionseffizienzen anhand der Luciferase-Aktivität gemessen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller	Sitz (Ort, Land)
Analysewaage ED3202S-CW	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Inkubator CB 150	BINDER	Tuttlingen, Deutschland
Inkubator INE 500	Memmert	Schwabach, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA-Werke	Staufen, Deutschland
Mikroküvetten	Shimadzu	Kyōto, Japan
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies	Bad Wildbad, Deutschland
Mikroskop Diavert	Leitz	Wetzlar, Deutschland
pH-Meter CG 840	Schott AG	Mainz, Deutschland
Ein- & Mehrkanalpipetten	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator 3031	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel, Deutschland
Photometer UV-160A	Shimadzu	Kyōto, Japan
Sterilwerkbank	The Baker Company	Sanford Maine, USA
Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Thermomixer Compact	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Vortexschüttler VF2	IKA-Werke	Staufen, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-26XP	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 3.0R	Heraeus Holding	Hanau, Deutschland
Zentrifuge Optima XE-90	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland

### 2.1.2 Zellkulturmaterialien

Einweg- und Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Sitz (Ort, Land)
Einwegpipetten (5, 10, 25 ml)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt	Nümbrecht, DEU
Zellkulturplatten (6 <i>well</i> oder 24 <i>well</i> )	Sarstedt	Nümbrecht, DEU
Zellkulturplatten (Nunc™ F96, Micro <i>Well</i> ™)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

### 2.1.3 Zellen

Zellen	Ursprungsorganismus	ATCC	Herkunft
HEK293T	<i>Homo sapiens</i>	CRL-11268	Friedrich-Löffler-Institut, Riems-Greifswald
Vero-B4	<i>Cercopithecus aethiops</i>	CCL-81	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
U87 CXCR4	<i>Homo sapiens</i>	-	BNITM, Hamburg

### 2.1.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pNL Luc AM	HIV-1 Genom ( $\Delta$ env, Luc <sup>+</sup> )	[38]
pHA-Z41519	prM/E-Expressionsvektor	[9]
pHA-USU-BH65	prM/E-Expressionsvektor	[9]
pHA-JE-NAK	prM/E-Expressionsvektor	[9]
pHA-Z <sub>12</sub> U <sub>3</sub>	prM/E-Expressionsvektor	[9]
pHA-U <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	prM/E-Expressionsvektor	[9]
pHA-Z <sub>12</sub> J <sub>3</sub>	prM/E-Expressionsvektor	[9]
pHA-J <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	prM/E-Expressionsvektor	[9]

## 2.2 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz (Ort, Land)</b>
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Agar	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, USA
Agarose	Biozym Scientific	Oldendorf, DEU
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Bromphenolblau	Merck KGaA	Darmstadt, DEU
Caesiumchlorid	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Calciumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Chloroquindiphosphat Salz	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Eisessig	neoLab Migge	Heidelberg, DEU
Essigsäure	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Ethanol	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Glukose	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Glycerin	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Hefeextrakt	Becton, Dickinson	Franklin Lakes, USA
Kaliumacetat	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Magnesiumchlorid (25 mM)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Natriumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Natriumhydroxid	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Salzsäure	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS)	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Triton X-100	Carl Roth	Karlsruhe, DEU

### 2.2.1 Reagenzien

Gerät	Hersteller	Sitz (Ort, Land)
Dulbeccos Modified Eagle Medium + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Fetales Rinderserum (FBS)	PAN-Biotech	Aidenbach, DEU
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
OptiPRO SFM Medium	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin (5.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RPMI 1640 Medium + GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Trypton	Carl Roth	Karlsruhe, DEU
Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 % in PBS)	PAN-Biotech	Aidenbach, DEU

### 2.2.2 Reagenzien-Kits

Reagenzien-Kits	Hersteller	Sitz (Ort, Land)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega	Madison, USA
Dilution Buffer	InCella	Eggenstein- Leopoldshafen, DEU
ScreenFect® A	ScreenFect	Eggenstein- Leopoldshafen, DEU

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Medien und Agarplatten

**dYT-Medium :** 16 g Trypton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl

**YT-Medium :** 8 g Trypton  
15 g Hefeextrakt  
5 g NaCl

**YT-Agarplatten :** 8 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
16 g Agar

Die aufgelisteten Komponenten wurden für das Ansetzen des YT/dYT-Mediums und der YT-Agarplatten eingewogen und mit 1 L doppelt destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) aufgefüllt. Die Autoklavierung erfolgte bei 121 °C und 1,5 bar. Die zusätzliche Zugabe vom hitzeempfindlichen Antibiotika Ampicillin zu den Medien, erfolgte nach dem Abkühlen auf < 50 °C.

**Ampicillin :** 4 ml/l (60 mg/ml)

### 2.3.2 Kultivierung von *E. coli* Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* Bakterien (Stamm DH5 $\alpha$ ) erfolgte durch das Animpfen einer Flüssigkultur mittels Einzelkolonie. Die Flüssigkulturen wurden im Schüttelkolben über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Flüssigkulturen auf YT-Agarplatten ausgestrichen. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Die Platten wurden anschließend im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.



### **2.3.3 Herstellung chemokompetenter Bakterien**

Für die Herstellung chemokompetenter Bakterien wurde eine Einzelkolonie des *E. coli* Stammes DH5 $\alpha$  von einer YT-Agarplatte entnommen und in 3 ml YT Medium über Nacht bei 37 °C im Rotor kultiviert. Für das Animpfen der Hauptkultur wurden 1 ml der Vorkultur zu 100 ml YT-Medium zugegeben, es erfolgte eine Inkubation der Bakterien in einem Schüttelkolben bei 37 °C und 180 rpm. Bei Erreichen einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,4 wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt, und anschließend bei 4 °C und 5.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 40 ml sterilfiltriertem 50 mM CaCl<sub>2</sub> suspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4 °C und 5.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> suspendiert und über Nacht auf Eis gestellt. Am nächsten Tag wurde die Suspension mit 2 ml 50 %igem Glycerin versetzt und in Aliquots mit je 200  $\mu$ l aufgeteilt. Nach dem Schockfrieren der Aliquots in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei -70 °C gelagert.

## **2.4 Molekularbiologische Methoden**

### **2.4.1 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli***

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde eine Transformation in *E. coli* DH5 $\alpha$  vorgenommen. Hierfür wurden zunächst die bei -70 °C gelagerten chemokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, anschließend mit 1  $\mu$ l Plasmid-DNA versetzt (ca. 100 ng Plasmid auf 100 ml Zellen) und für 30 min inkubiert. Mittels Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec und einer darauffolgenden Abkühlung auf Eis wurde die Plasmid-DNA in *E. coli* DH5 $\alpha$  eingebracht. Danach wurden die Bakterien mit 800  $\mu$ l YT-Medium versetzt und für 45 min bei 37 °C im Thermoschüttler inkubiert. 150  $\mu$ l der Bakterienkultur wurden mit dYT-Medium resuspendiert und auf Amp/YT-Agarplatten ausplattiert. Der Rest der Bakterienkultur wurde für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 600  $\mu$ l des Überstandes verworfen, das Pellet mit dem restlichen Medium resuspendiert und ebenfalls ausgestrichen. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

## **2.4.2 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA**

Nach der Kultivierung der Plasmid-DNA in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden unterschiedliche Präparationsarten (Minipräparation durch alkalische Lyse (2.4.2.1), CsCl-Maxipräparation (2.4.2.2) und DNA-Extraktion mit Glasmilch (2.4.2.3) für die Isolierung und Reinigung der DNA verwendet.

### **2.4.2.1 Minipräparation durch alkalische Lyse**

Mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit erfolgte die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA. Hierfür wurde 4 ml Amp/dYT-Medium mit einer Einzelkolonie der transformierten Zellen (2.4.1) angeimpft und im Rotor über Nacht bei 37 ° kultiviert. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5.000 rpm und Raumtemperatur (RT). Die anschließenden Schritte für die DNA-Isolierung erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die Eluation der Plasmid-DNA erfolgte mit 50  $\mu$ l des im Kit enthaltenen EB-Puffers. Die gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### **2.4.2.2 CsCl-Maxipräparation**

Mit der CsCl-Methode wurde Plasmid-DNA in größerem Maßstab isoliert und aufgereinigt. 250  $\mu$ l Amp/dYT-Medium wurden mit einer Einzelkolonie der transformierten Zellen (2.4.1) angeimpft und über Nacht im Schüttelkolben bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Danach wurde die Bakterienkultur auf 10.000 rpm beschleunigt und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 5 ml der Lösung 1 resuspendiert und anschließend in 50 ml Falconröhrchen überführt. Für die Lyse der Zellen wurde 10 ml der Lösung 2 hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 7,5 ml der Lösung 3 hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Für die Abtrennung der Präzipitate, wurde für 20 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand durch Baumwolle gefiltert, mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 20 min bei 4000 g und RT, erfolgte ein Waschschriff mit 10 ml 70 %igem Ethanol (EtOH) und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 4000 g und RT. Der Überstand wurde verworfen und die DNA wurde in 4 ml TE-Puffer gelöst und anschließend mit 4,9 g CsCl und 150  $\mu$ l Ethidiumbromid (EtBr) (10 mg/ml) versetzt. Mit Hilfe einer 0,9 mm x 40 mm Kanüle und einer 5 ml Spritze wurde die Lösung in Quick Seal Tubes

überführt, austariert ( $\pm 50$  mg) und zugeschmolzen. Nach der Überprüfung der Dichtigkeit durch Drücken der Röhrchen wurde der Rotor beladen. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte über Nacht bei mind. 50.000 – 70.000 rpm und 25 °C. Mit einer 0,9 mm x 40 mm Kanüle und einer 2 ml Spritze erfolgte die Entnahme der Plasmid-DNA aus den Quick Seal Röhrchen. Um einen Unterdruck zu vermindern wurde zunächst ein Luftloch im oberen Teil des Röhrchens gestochen. Anschließend wurde durch das Röhrchen gestochen, die untere Bande durch Aufziehen der Spritze entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von jeweils 1 ml n-Butanol wurde EtBr extrahiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis keine rötliche Restfarbe mehr vorhanden ist.

Für die DNA-Präzipitation wurde die Plasmid-DNA mit 0,7 Vol. 3 M Natriumacetat (NaOAc) (pH 5,2) und 2 Vol. 97 %igem EtOH versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm und RT wurde die Plasmid-DNA zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O gelöst. Für die Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm gemessen. Die DNA-Konzentration wurde danach einheitlich auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l gebracht. Dies erfolgte durch die Verdünnung mit ddH<sub>2</sub>O oder einer erneuten Ethanolpräzipitation (2.4.3).

<b>Lösung 1:</b>	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM TRIS-HCl (pH 8,0)
<b>Lösung 2:</b>	0,2 M NaOH 1 % SDS
<b>Lösung 3:</b>	3 M Kaliumacetat 2 M Essigsäure
<b>TE-Puffer:</b>	10 mM TRIS 1 M EDTA (pH 8,0)

### 2.4.2.3 DNA-Extraktion mit Glasmilch

Bei der DNA-Extraktion mit Hilfe der Glasmilch erfolgt die Isolation der Plasmid-DNA durch die Bindung an Glaspartikel. Das Animpfen sowie die Lyse der Zellen (Lösung 1-3) erfolgte wie in 2.4.2.2 beschrieben. Es wurden 5 ml des klaren Überstandes der Probe mit 50 µl RNase versetzt und für 15 min bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurden zu der Probe 1 ml Glasmilch hinzugegeben. Nach kräftigem Schütteln erfolgte eine Inkubationszeit von 30 min bei RT auf dem Rollgerät, in diesem Schritt erfolgt die Bindung der DNA an die Glaspartikel der Glasmilch. Daraufhin erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 1000 rpm und 10 °C. Das DNA-Glaspellet wurde mit 5 ml des New-Wash-Puffer gewaschen, für 5 min auf dem Rollgerät inkubiert und für 1 min bei 1000 rpm und 10 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde erneut wiederholt. Anschließend wurde das DNA-Glaspellet mit 2 ml H<sub>2</sub>O gelöst und für 10 min bei 72 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 3 min bei 9.000 rpm und 10 °C wurde der Überstand, welcher Plasmid-DNA enthält in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um restliche Glaspartikel zu entfernen, wurde das Reaktionsgefäß jeweils zweimal anzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Präzipitation ist in Kapitel 2.4.2.2 beschrieben.

**Lösung 1:** 50 mM Glucose  
10 mM EDTA  
25 mM TRIS-HCl (pH 8,0)

**Lösung 2:** 0,2 M NaOH  
1 % SDS

**Lösung 3:** 3 M Kaliumacetat  
2 M Essigsäure

**New-Wash-Puffer:** 10 mM TRIS-HCl  
50 mM EDTA  
50 mM NaCl

Der New-Wash-Puffer wurde 1:1 mit EtOH versetzt (100 ml New-Wash-Puffer + 100 ml EtOH 98 %ig).

### **2.4.3 Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA**

Für die Aufkonzentrierung der Plasmid-DNA wurde eine Ethanolfällung angewandt. Zunächst wurde die DNA-Lösung mit 0,1 Vol. NaOAc (3 M, pH 5,2) und 2 Vol. 100 %igem EtOH versetzt und für mind. 3 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA für 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte zweimal je ein Waschschriff mit 70 %igem EtOH und einer erneuten Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm. Letztlich wurde das Pellet in ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf eine Endkonzentration von 1 µg/µl gebracht.

### **2.4.4 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA hat die Firma LGC Genomics mit Hilfe eines automatisiertenVerfahren nach Sanger durchgeführt. Für die Sequenzierung der pHA-Expressionsvektoren wurden die Primer CMV-F und cDNA3.1-R verwendet. Es wurden jeweils 2 Läufe durchgeführt, ein Lauf in Vorwärtsrichtung (*forward*, F) und ein Lauf in entgegengesetzter Richtung (*reverse*, R). Nach der Sequenzierung wurden die Ergebnisse verglichen.

### **2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Für die analytische Bestimmung von DNA-Plasmiden wurde das Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Für die Gele wurde ein 0,8 % Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde 0,8 % Agarose in 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle durch Aufkochen gelöst. In ein vorbereitetes Gelbett (7 cm x 7 cm) wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pipettiert. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 56 °C wurde diese in das Bett gegossen. Der Kamm mit der gewünschten Taschenanzahl wurde in die Gelapparatur eingesetzt. Nach dem aushärten des Agarosegels wurde dieser wieder entfernt. Anschließend wurde das Agarosegel mit dem Gelbett in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TAE-Puffer überdeckt. Je 1 µl der aufzutrennenden Proben wurden mit 3 µl des 6 x Ladepuffers und 2 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt und anschließend in die Taschen pipettiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde der Marker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder verwendet. Die Proben wurden bei einer Spannung von 100 V für 1 h aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht detektiert.

**TAE-Puffer :** 40 mM TRIS  
20 mM Eisessig  
2 mM EDTA

**6 x Ladepuffer :** 50 % Glycerin  
0,2 % Bromphenolblau  
in 1 Vol. TAE-Puffer

## **2.5 Zellbiologische Methoden**

### **2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte im Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen befanden sich in supplementiertem DMEM- oder RPMI-Medium und wurden in regelmäßigen Abständen alle 3-5 Tage, je nach Zelldichte rekultiviert. Zunächst erfolgte ein Waschschrift mit PBS, anschließend wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin/EDTA inkubiert. Die Zellen wurden somit von der Wand der Zellkulturflaschen gelöst und mit Zugabe von DMEM- oder RPMI-Medium aufgenommen. Für die Rekultivierung wurden die eukaryotischen Zellen mit DMEM- oder RPMI-Medium verdünnt und erneut in einer Zellkulturflasche ausgesät.

**DMEM suppl.:** DMEM (1x) + GlutaMAX™-I  
10 % FCS  
1 % Pen-Strep

**RPMI suppl.:** RPMI 1640 (1x) + GlutaMAX™-I  
10 % FCS  
1 % Pen-Strep

### **2.5.2 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotischen Zellen**

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotischen Zellen wurden die zwei Methoden der SFA-Transfektion (2.5.2.1) als auch der PEI-Transfektion (2.5.2.2) angewendet. Die Herstellung pseudotypisierter Partikel wurde durch eine

DNA-Transfektion in HEK293T-Zellen durchgeführt. Für die SFA-Transfektion befanden sich die HEK293T-Zellen in RPMI-Medium, für die PEI-Transfektion in DMEM-Medium. Vor der Transfektion wurden die Zellen in einer 24-*well*-Platte mit einer Dichte ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Transfektion eine ca. 80 % Konfluenz resultierte. Hierfür wurde nach dem Aussäen der Zellen die Zellkulturplatte im Inkubationsschrank für ein bis zwei Nächte inkubiert. Für alle Inkubationsschritte wurde die Zellkulturplatte im Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.5.2.1 SFA-Transfektion von Plasmid-DNA

Am Tag der Transfektion wurde zunächst Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegtem *dilution buffer* pipettiert. In ein weiteres Reaktionsgefäß ebenfalls mit vorgelegtem *dilution buffer* wurde ScreenfectA (SFA) hinzugegeben. Letzteres wurde tropfenweise in das Reaktionsgefäß mit der Plasmid-DNA pipettiert. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubationszeit bei RT. Währenddessen wurde das Medium in der 24-*well* Platte verworfen und 420 µl neues supplementiertes RPMI-Medium hinzugegeben. Danach wurde der Transfektionskomplex zu den Zellen gegeben. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit im Inkubator wurde das Medium abgenommen und 1 ml supplementiertes RPMI-Medium zu den Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen im Inkubator wurde der Zellkulturüberstand entnommen und 1 ml neues supplementiertes RPMI-Medium hinzugegeben. Der entnommene Zellkulturüberstand wurde bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Der partikelhaltige Überstand wurde bei 4 °C gelagert.

Die Zellkulturplatte wurde erneut für 2 Tage im Inkubator inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand entnommen und bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der partikelhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Zum Lösen der restlichen Zellen wurde die Zellkulturplatte mit je 100 µl Trypsin versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 500 µl RPMI in jedes *well* gegeben, auf- und abpipettiert und in das Reaktionsgefäß mit dem Zellpellet überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 10.000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.5.2.2 PEI-Transfektion von Plasmid-DNA**

Am Tag der Transfektion wurde das DMEM-Medium in der 24-*well* Platte verworfen und in jedes *well* 420 µl Chloroquindiphosphat pipettiert. Es erfolgte eine Inkubationszeit von 5 h im Inkubator. Währenddessen wurde das PEI zunächst in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegtem *dilution buffer* pipettiert. In ein weiteres Reaktionsgefäß ebenfalls mit vorgelegtem *dilution buffer* wurde die Plasmid-DNA dazugegeben. Letzteres wurde tropfenweise in das Reaktionsgefäß mit dem PEI pipettiert. Es erfolgte eine 20-minütige Inkubation. Anschließend wurde der jeweilige Transfektionskomplex vorsichtig zu den HEK293T-Zellen gegeben und über Nacht im Inkubationsschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Transfektionskomplex vorsichtig entnommen und mit je 1 ml DMEM suppl. ersetzt. Die Zellen wurden erneut über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung der Transfektion. Die Zellen wurden mit dem Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 10.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der partikelhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Zum Lösen der restlichen Zellen wurde die Zellkulturplatte mit je 100 µl Trypsin versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 500 µl DMEM in jedes *well* dazugegeben, auf- und abpipettiert und in das Reaktionsgefäß mit dem Pellet überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 10.000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.5.3 Infektion von Zellen mit pseudotypisierten Viruspartikeln**

Die Infektion eukaryotischer Zellen wurde mittels pseudotypisierten HIV-1-Partikeln aus den Zellkulturüberständen der Transfektion durchgeführt. Die zu infizierenden Zellen (Vero-B4, U87 und Hg39-Zellen) waren in supplementiertem DMEM- oder RPMI Medium suspendiert. Für die Infektion wurden je 100 µl der entsprechenden Zellen in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und definierte Verdünnungen hergestellt. Die Zellkulturplatte wurde für 3 Tage im Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der dreitägigen Inkubationszeit konnte die Infektionseffizienz mit dem Luciferase-Assay (2.5.4) gemessen werden.



#### 2.5.4 Luciferase-Assay

Mit dem Luciferase-Assay werden sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Effizienz der Infektion von eukaryotischen Zellen mit pseudotypisierten Partikeln gemessen. Für die Messung wurde eine weiße unbeschichtete 96-well-Platte verwendet. Für die Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit 100 µl Lysispuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die lysierten Zellen in die 96-well-Platte mit 100 µl D-Luciferin-Puffer gegeben. Nach der Zugabe von D-Luciferin-Puffer wurde die Platte nach 3 – 5 min gemessen. Für die Messungen der Infektionseffizienz wurde der Überstand in den 96-well-Platten verworfen und die Zellen mit 100 µl Lysispuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde 100 µl D-Luciferin-Puffer in die wells gegeben. Anschließend wurde die Platte direkt gemessen. Die Messungen wurden mit Hilfe eines Mikroplattenluminometer und dem Programm Mikro Win 2000 durchgeführt. Die detektierte relative Lichteinheit RLU (*relative light units*), entsteht durch die gemessene Lichtemission, die bei der Umsetzung von Luciferase zu Oxiluciferin entsteht.

##### **Lysepuffer.:**

25 mM TRIS  
2 mM EDTA  
12 mM DTT  
10 % Glycerol  
1 % Triton x-100

##### **D-Luciferin-Puffer:**

100 mM TRIS-HCL (pH 8,0)  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
250 µM CoA  
150 µM ATP  
200 mg AMP  
150 µg/ml d-Luciferin

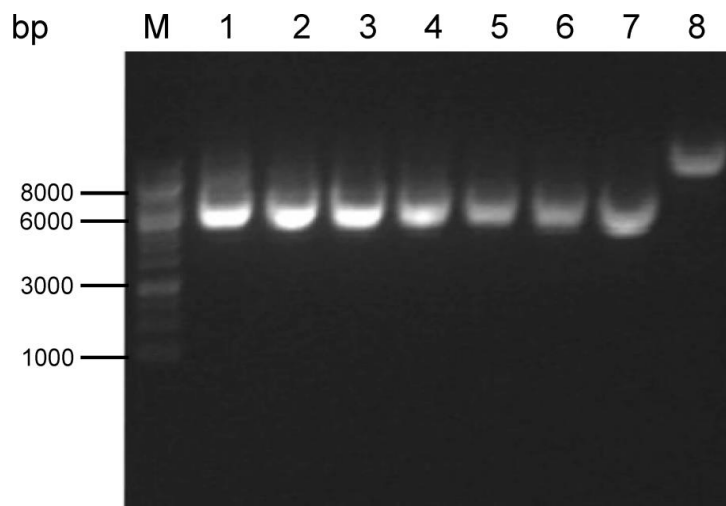
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aufreinigung der Vektoren

Nach der Kultivierung der Plasmid-DNA in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden drei unterschiedliche Präparationsarten: Minipräparation durch alkalische Lyse (2.4.2.1), CsCl-Maxipräparation (2.4.2.2) und DNA-Extraktion mit Glasmilch (2.4.2.3) angewandt. Um die Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA nachzuweisen, wurde die Plasmid-DNA nach der Anwendung der genannten Verfahren sowie der DNA-Marker GeneRuer™ 1 kb als Vergleich auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Herstellen des Agarosegels sowie die Geräteeinstellungen für die Auftrennung der entsprechenden Banden sind in Abschnitt 2.4.5 zu entnehmen. In der Abbildung 5 sind die für die Transfektion verwendeten Plasmid-DNA in einem Agarosegel dargestellt. Deutlich zu erkennen sind bei den prM/E-Expressionsvektoren (pHA, Spur 1 – Spur 8) eine Bande. Die Banden des Markers haben eine Größe von 1000 bp bis 10 kb. Das HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM liegt wie erwartet oberhalb dieser Bande und weist eine Größe von ca. 14 kb auf.

Für die Kotransfektion wurden jeweils 2,5  $\mu$ g des HIV-1-Vektorplasmids pNL Luc AM und 12,5  $\mu$ g des entsprechenden Expressionsvektors (pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519, pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub>) pro *well* einer 24-*well*-Platte benötigt.

Um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zu erreichen, wurden mehrere Präparationen im großen Maßstab durchgeführt (2.4.2.2). Insgesamt wurden mit der Methode der CsCl-Maxipräparation pro Plasmid-DNA ca. 5-10 mg hergestellt. Die DNA-Lösungen wurden alle auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt.



**Abb. 5: Aufgereinigte Plasmid DNA der Pseudotyp Vektoren.**

Spur 1: pHA-USU-BH65

Spur 2: pHA-JE-NAK

Spur 3: pHA-Z41519

Spur 4: pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>

Spur 5: pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>

Spur 6: pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>

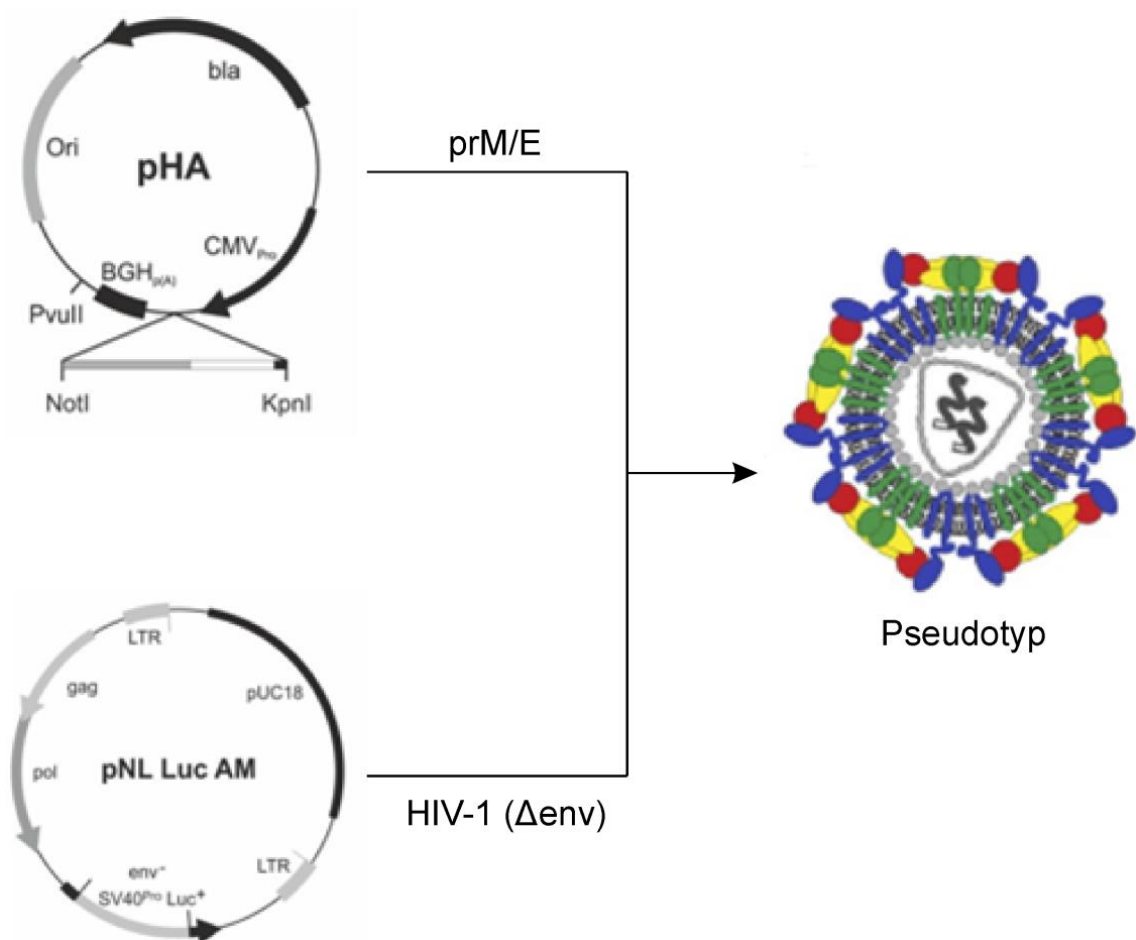
Spur 7: pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub>

Spur 8: HIV-1-Vektor pNL Luc AM

### 3.2 Herstellung pseudotypisierter Viruspartikel

Eine Transfektion bezeichnet das Einbringen genetischen Materials, hier Plasmid-DNA, in eukaryotische Zellen. Mittels Kotransfektion lassen sich mehrere DNA-Plasmide gleichzeitig in Zellen transfizieren. Verschiedene Flavivirus prM/E-Expressionsvektoren mit prM/E als Hüllproteine und prM/E-Chimären ( $X_{12}Y_3$ ) standen für die Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikeln zur Verfügung, da diese in der LG-Schreiber bereits erfolgreich realisiert wurden [9]. In dieser Arbeit wurde die Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikeln auf weitere E-Protein-Chimären von Flaviviren erweitert.

Für die Kotransfektion wurde das HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit verschiedenen Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519, pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> in HEK293T-Zellen transfiziert (Abb. 6). Dabei dient das Vektorplasmid pNL Luc AM als rekombinanter Vektor, welcher durch die Deletion des Genoms ( $\Delta env$ ) einen replikationsunfähigen HIV-1-Vektor darstellt. Somit sind die hergestellten pseudotypisierten Partikel in der Lage in die Zellen einzudringen, können jedoch nach der Infektion keine neuen infektiösen Partikel bilden (*single-round-infection*). Durch das zusätzliche Austauschen des Hüllproteins durch ein Reportergen für Luciferase ( $Luc^+$ ) unter der Kontrolle des SV40-Promoters, kann die Infektion der Pseudotypen detektiert und quantifiziert werden.



**Abb. 6: Vektoren für die Herstellung von Flavivirus prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln.**

Die Klonierung der prM/E-Genfragmente in den Expressionsvektor pHA, über die Schnittstellen Not I und Kpn I wurde bereits in der Laborgruppe erfolgreich realisiert [9]. Für die Kotransfektion wurde das jeweilige Hüllprotein mit dem HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM in HEK293T-Zellen transfiziert. Dies führt zur Bildung prM/E pseudotypisierter HIV-1-Partikel, welche das HIV-1-Genom mit dem Reportergen Luciferase (Luc<sup>+</sup>) im Inneren und die entsprechenden Hüllproteine der Flaviviren an der Oberfläche besitzen. Mit den so hergestellten HIV-1-Partikeln können Infektionsexperimente durchgeführt werden.

### 3.2.1 Herstellung von USUV, JEV und ZIKV prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln

Für die Herstellung der Pseudotypen wurde das Verfahren der SFA-Transfektion angewandt (2.5.2.1). Hierfür wurden pro *well* einer 24-*well*-Platte, je 2,5 µg pNL Luc AM mit 12,5µg des entsprechenden Expressionsvektors pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK und pHA-Z41519 in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Zellkulturüberstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (10.000 rpm, 5 min). Der partikelhaltige ZKÜ wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert. Zum Lösen der restlichen Zellen wurde die Zellkulturplatte mit je 100 µl Trypsin versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 500 µl RPMI in jedes 24er-*well* gegeben, auf- und abpipettiert und in das Reaktionsgefäß mit dem Zellpellet aus der ersten Zentrifugation überführt. Nach Zentrifugation (10.000 rpm, 15 min) wurde der ZKÜ verworfen und die gesammelten Zellen bei -20 °C gelagert. Für die Messung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit 100 µl Lysispuffer versetzt und in eine weiße 96-*well*-Platte pipettiert. Nach 10 min wurde der Zellextrakt mit je 100 µl D-Luciferin-Puffer versetzt und nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT, mit Hilfe eines Mikroplattenluminometers und dem Programm Mikro Win 2000 gemessen (Tab. 1). Deutlich erkennbar ist, dass für alle Transfektionen hohe Luciferasewerte gemessen wurden. Des Weiteren ist die Transfektionseffizienz mit dem Expressionsvektor pHA-USU-BH65 mit  $1,73 \cdot 10^7$  am höchsten.

**Tab. 1: Luciferase-Aktivitäten mittels pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK und pHA-Z41519 transfizierter HEK293T-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU		
	pHA-USU-BH65	pHA-JE-NAK	pHA-Z41519
	$1,11 \cdot 10^5$	$1,86 \cdot 10^6$	$6,37 \cdot 10^6$
	$2,96 \cdot 10^6$	$7,59 \cdot 10^5$	$3,34 \cdot 10^6$
	$3,77 \cdot 10^7$	$4,22 \cdot 10^6$	$2,04 \cdot 10^7$
<b>RLU Ø</b>	$1,73 \cdot 10^7$	$2,28 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^7$

### 3.2.2 Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikeln mit prM/E der USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären

Die Herstellung der Pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit den Hüllproteinen der Chimäre pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub> wurde mittels Kotransfektion in HEK293T-Zellen realisiert. Somit weisen die gebildeten pseudotypisierten HIV-1-Partikel, welche beispielsweise mit dem Hüllprotein der Chimäre pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und dem HIV-1-Vektor pNL Luc AM gebildet wurden, auf ihrer Oberfläche E-Proteine mit der Domäne 1 und 2 vom Usutuvirus und der Domäne 3 vom Zikavirus auf. Dementsprechend für pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub> die umgekehrte Version. Dabei wurde wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben das Verfahren der SFA-Transfektion angewandt.

Die Ermittlung der Transfektionseffizienz konnte mittels Luciferase-Assay gemessen werden. Die resultierenden Werte, sowie die daraus ermittelten Mittelwerte der entsprechenden Transfektionseffizienz sind tabellarisch (Tab. 2) dargestellt. Deutlich erkennbar ist, dass für beide Flaviviren hohe Transfektionsraten gemessen wurden. Die Messergebnisse unterlagen Schwankungen von bis zu einer Zehnerpotenz, die bei beiden prM/E-Plasmiden zu erkennen sind. Vergleicht man beide Mittelwerte der Chimär-Konstrukte ist zu erkennen, dass die Transfektionseffizienz mit dem Expressionsvektor pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> mit  $1,39 \cdot 10^7$  höher ist, als mit pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>.

**Tab. 2: Luciferase-Aktivitäten mittels pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub> transfizierter HEK293T-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU	
	pHA-U <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> U <sub>3</sub>
	$5,02 \cdot 10^6$	$5,22 \cdot 10^6$
	$6,85 \cdot 10^6$	$1,82 \cdot 10^6$
	$2,99 \cdot 10^7$	$1,05 \cdot 10^7$
<b>RLU Ø</b>	$1,39 \cdot 10^7$	$5,85 \cdot 10^6$

### 3.2.3 Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV-Chimären

Für die Herstellung der Pseudotypisierten HIV-1-Partikeln wurden Hüllproteine der Chimäre pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> verwendet. Die gebildeten pseudotypisierten HIV-1-Partikel welche mit dem Hüllprotein der Chimäre pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und dem HIV-1-Vektor pNL Luc AM gebildet wurden, weisen auf ihrer Oberfläche E-Proteine mit der Domäne 1 und 2 vom JEV und der Domäne 3 vom ZIKV auf. Dementsprechend für pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> die umgekehrte Version. Das Vorgehen der SFA-Transfektion erfolgte wie in 3.2.1 beschrieben.

Die Messung der Luciferase-Aktivitäten sowie die daraus ermittelten Mittelwerte sind in Tabelle 3 dargestellt. Sichtbar ist, dass für beide Flaviviren hohe Transfektionsraten von bis zu  $9,47 \cdot 10^6$  für pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub>, gemessen wurden. Beim Expressionsvektor pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> unterlagen die Messergebnisse Schwankungen von bis zu zwei Zehnerpotenzen. Beide Mittelwerte der zwei Chimär-Konstrukte sind in der gleichen Größenordnung und zeigen somit keine hohen Differenzen auf.

**Tab. 3: Luciferase-Aktivitäten (RLU) mittels pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> transfizierter HEK293T-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU	
	pHA-J <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> J <sub>3</sub>
	$1,15 \cdot 10^6$	$8,10 \cdot 10^5$
	$1,77 \cdot 10^6$	$5,52 \cdot 10^6$
	$6,35 \cdot 10^6$	$2,21 \cdot 10^7$
<b>RLU Ø</b>	$3,09 \cdot 10^6$	$9,47 \cdot 10^6$



### 3.3 Infektion von Vero-B4-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln

Zunächst wurden Infektionsexperimente von Vero-B4-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln aus den Zellkulturüberständen der Transfektion durchgeführt. Während der lipophilen Kotransfektion wurde das HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit verschiedenen Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519, pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> in HEK293T-Zellen transfiziert. Die daraus hergestellten pseudotypisierten Partikeln wurden dann aus den HEK293T-Zellen geschleust. Durch die partikelhaltigen Überstände lassen sich eukaryotische Zellen infizieren. Dabei trägt das Vektorplasmid pNL Luc Am das Luciferase-Reportergen. Nach der Infektion in die Zelle wird das Genom der Partikel abgelesen. Somit kann die Infektionseffizienz mittels Luciferase-Assay detektiert und quantifiziert werden. Die Infektionsexperimente wurden in weißen 96-*well*-Zellkulturplatten durchgeführt. Die zu infizierenden Vero-B4-Zellen waren in supplementiertem DMEM-Medium suspendiert. Für die Infektion wurden zunächst je 100 µl der Zellen in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und definierte Verdünnungen hergestellt. Die Zellkulturplatte wurde für 3 Tage im Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der dreitägigen Inkubationszeit erfolgte die Auswertung der Infektion.

Hierfür wurde der Überstand in den 96-*well*-Platten verworfen und die Zellen mit 100 µl Lysispuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde 100 µl D-Luciferin-Puffer in die *wells* pipettiert. Anschließend wurde die Platte innerhalb von 3-5 min gemessen. Die Messungen der Luciferase-Aktivität der infizierten Zellen wurden mit Hilfe eines Mikroplattenluminometer und dem Programm Mikro Win 2000 durchgeführt.

### 3.3.1 Infektion von Vero-B4-Zellen mit USUV-, JEV-Virus- und ZIKV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln

Die Infektion von Vero-B4-Zellen geschah mittels Usutu-, JE- und Zika-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln. Diese prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln entstanden durch die Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den entsprechenden Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK und pHA-Z41519 in HEK293T-Zellen (3.3). Die Vero-B4-Zellen wurden mit definierten Verdünnungen der jeweiligen partikelhaltigen ZKU in dreifach oder vierfach Bestimmung infiziert. Hierfür wurde die 96-well-Platte zunächst mit 100  $\mu$ l der zu infizierenden Zellen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem DMEM-Medium hergestellt. Drei Tage nach der Infektion fand die Messung der Infektionseffizienz statt. In Tabelle 4, 5 und 6 sind die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln infizierten Vero-B4-Zellen der verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:4 und 1:8) sowie die daraus resultierenden Mittelwerte dargestellt.

In der Abbildung 7 sind die gemessenen Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E (pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519) pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten Vero-B4-Zellen der verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:4 und 1:8) abgebildet. Deutlich zu erkennen ist, dass die Infektion mit dem Hüllprotein pHA-USU-BH65 mit einem Mittelwert (MW) von  $4,95 \cdot 10^4$  die höchste Infektionseffizienz aufweist. Anschließend folgt die Infektion mit dem Hüllprotein pHA-Z41519 und letztlich pHA-JE-NAK mit  $RLU = 7,53 \cdot 10^3$ . Hierbei ist anzumerken, dass pNL Luc AM keine Blankwerte aufweist. Die Infektion mit dem Hüllprotein führt zu hohen Ergebnissen von bis zu  $2,20 \cdot 10^6$ , wie der Tabelle 7 zu entnehmen ist.

**Tab. 4: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika-prM/E Pseudotypen infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU*		
	pHA-USU-H65	pHA-JE-NAK	pHA-Z41519
<b>Versuch 1</b>	$8,53 \cdot 10^4$	$2,53 \cdot 10^4$	$1,09 \cdot 10^4$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$6,98 \cdot 10^4$	$1,05 \cdot 10^4$	$6,18 \cdot 10^4$
	$5,11 \cdot 10^4$	$3,30 \cdot 10^2$	$9,60 \cdot 10^2$
<b>RLU Ø</b>	$6,87 \cdot 10^4$	$1,20 \cdot 10^4$	$2,64 \cdot 10^4$
<b>Versuch 2</b>	$2,41 \cdot 10^4$	$1,35 \cdot 10^3$	$1,58 \cdot 10^4$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$2,48 \cdot 10^4$	$7,65 \cdot 10^3$	$6,67 \cdot 10^3$
	$1,67 \cdot 10^4$	$1,00 \cdot 10^2$	$6,61 \cdot 10^3$
<b>RLU Ø</b>	$2,19 \cdot 10^4$	$3,03 \cdot 10^3$	$9,69 \cdot 10^3$
<b>Versuch 3</b>	$8,89 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^2$	$2,14 \cdot 10^3$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$9,70 \cdot 10^3$	$9,00 \cdot 10^2$	$2,11 \cdot 10^3$
	$3,88 \cdot 10^3$	$1,16 \cdot 10^3$	$1,02 \cdot 10^3$
<b>RLU Ø</b>	$7,49 \cdot 10^3$	$7,57 \cdot 10^3$	$1,76 \cdot 10^3$
<b>Versuch 4</b>	$1,86 \cdot 10^5$	-	$4,09 \cdot 10^4$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$1,00 \cdot 10^5$	-	$3,48 \cdot 10^4$
	$1,08 \cdot 10^5$	-	$4,76 \cdot 10^4$
	$5,19 \cdot 10^4$	-	$4,15 \cdot 10^4$
<b>RLU Ø</b>	$1,00 \cdot 10^5$	-	$3,48 \cdot 10^4$
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	$4,95 \cdot 10^4$	$7,53 \cdot 10^3$	$1,82 \cdot 10^4$

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

**Tab. 5: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika-prM/E Pseudotypen infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU*		
	pHA-USU-BH65	pHA-JE-NAK	pHA-Z41519
<b>Versuch 1</b>	$1,40 \cdot 10^4$	$3,06 \cdot 10^3$	$1,84 \cdot 10^4$
<b>ZKÜ 1:4</b>	$1,93 \cdot 10^4$	$2,20 \cdot 10^2$	$1,09 \cdot 10^4$
	$1,60 \cdot 10^2$	$1,70 \cdot 10^2$	$5,75 \cdot 10^3$
<b>RLU Ø</b>	$1,11 \cdot 10^4$	$1,15 \cdot 10^3$	$1,17 \cdot 10^4$
<b>Versuch 2</b>	$5,13 \cdot 10^3$	$4,50 \cdot 10^2$	$3,91 \cdot 10^3$
<b>ZKÜ 1:4</b>	$8,63 \cdot 10^3$	$6,30 \cdot 10^2$	$3,87 \cdot 10^3$
	$7,75 \cdot 10^3$	$1,38 \cdot 10^3$	$3,72 \cdot 10^3$
<b>RLU Ø</b>	$7,17 \cdot 10^3$	$8,20 \cdot 10^2$	$3,83 \cdot 10^3$
<b>Versuch 3</b>	$1,20 \cdot 10^4$	$9,50 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:4</b>	$7,90 \cdot 10^2$	$6,50 \cdot 10^2$	$1,90 \cdot 10^2$
	$2,80 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^2$	$1,90 \cdot 10^2$
<b>RLU Ø</b>	$5,19 \cdot 10^3$	$6,03 \cdot 10^2$	$1,93 \cdot 10^2$
<b>Versuch 4</b>	$4,11 \cdot 10^4$	-	$2,01 \cdot 10^4$
<b>ZKÜ 1:4</b>	$9,29 \cdot 10^4$	-	$4,10 \cdot 10^4$
	$9,23 \cdot 10^4$	-	$1,71 \cdot 10^4$
	$9,01 \cdot 10^4$	-	$1,10 \cdot 10^4$
<b>RLU Ø</b>	$7,91 \cdot 10^4$	-	$2,23 \cdot 10^4$
<b>Mittelwerte alle Ø</b>	$1,82 \cdot 10^4$	$8,58 \cdot 10^2$	$9,51 \cdot 10^3$

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:4 und Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

**Tab. 6: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika-prM/E Pseudotypen infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU*		
	pHA-USU-BH65	pHA-JE-NAK	pHA-Z41519
<b>Versuch 1</b>	$2,17 \cdot 10^3$	$5,66 \cdot 10^3$	$2,96 \cdot 10^3$
<b>ZKÜ 1:8</b>	$1,05 \cdot 10^4$	$1,60 \cdot 10^2$	$4,80 \cdot 10^2$
	$1,60 \cdot 10^2$	$1,80 \cdot 10^2$	$1,14 \cdot 10^4$
<b>RLU Ø</b>	$4,27 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^3$	$4,93 \cdot 10^3$
<b>Versuch 2</b>	$4,20 \cdot 10^2$	$1,90 \cdot 10^2$	$1,26 \cdot 10^3$
<b>ZKÜ 1:8</b>	$2,77 \cdot 10^3$	$1,80 \cdot 10^2$	$2,30 \cdot 10^2$
	$9,78 \cdot 10^3$	$1,08 \cdot 10^3$	$5,07 \cdot 10^3$
<b>RLU Ø</b>	$4,32 \cdot 10^3$	$4,83 \cdot 10^2$	$2,19 \cdot 10^3$
<b>Versuch 3</b>	$5,62 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^2$	$1,70 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:8</b>	$4,30 \cdot 10^2$	$1,40 \cdot 10^2$	$1,80 \cdot 10^2$
	$1,90 \cdot 10^2$	$1,70 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^2$
<b>RLU Ø</b>	$2,08 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^2$	$1,83 \cdot 10^2$
<b>Versuch 4</b>	$7,26 \cdot 10^4$	-	$8,64 \cdot 10^3$
<b>ZKÜ 1:8</b>	$2,67 \cdot 10^4$	-	$3,13 \cdot 10^4$
	$3,58 \cdot 10^4$	-	$1,45 \cdot 10^3$
	$5,13 \cdot 10^4$	-	$1,13 \cdot 10^4$
<b>RLU Ø</b>	$4,66 \cdot 10^4$	-	$1,32 \cdot 10^4$
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	$7,22 \cdot 10^3$	$8,81 \cdot 10^2$	$5,13 \cdot 10^3$

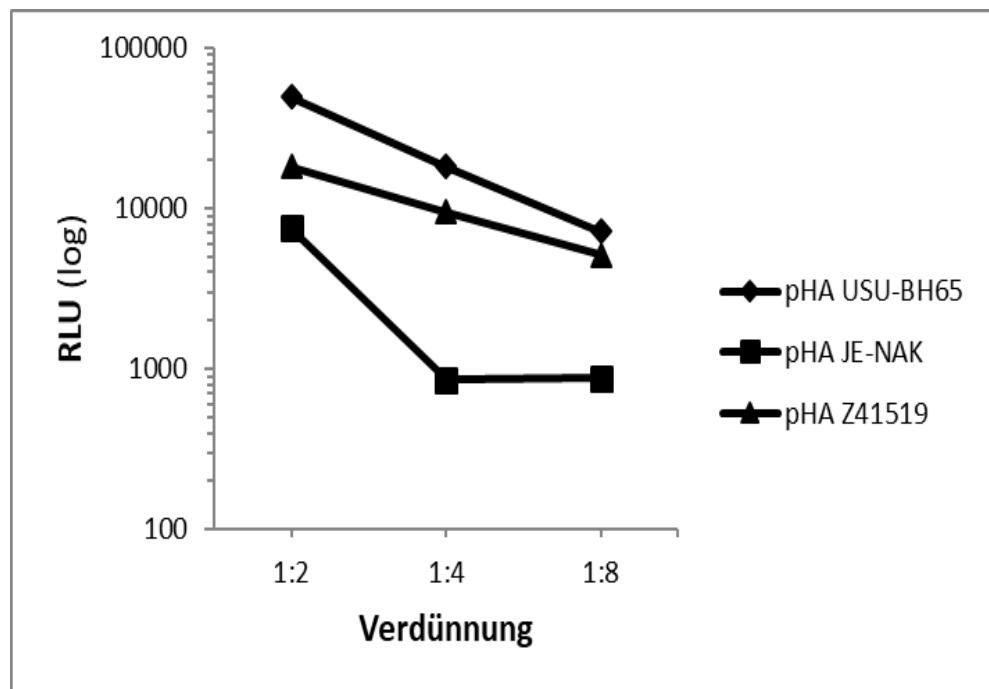
\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:8 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

In der Nachfolgenden Tabelle sind die Luciferase-Aktivitäten mittels Vektorplasmids pNL Luc AM infizierten Vero-B4-Zellen abgebildet.

**Tab. 7: Luciferase-Aktivitäten des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM in Vero-B4-Zellen.**

pNL Luc AM	RLU*		
	ZKÜ 1:2	ZKÜ 1:4	ZKÜ 1:8
<b>Versuch 1</b>	$5,32 \cdot 10^3$	$1,90 \cdot 10^2$	$1,50 \cdot 10^2$
	$2,20 \cdot 10^2$	$5,67 \cdot 10^3$	$1,90 \cdot 10^2$
	$1,15 \cdot 10^4$	$2,10 \cdot 10^2$	$1,80 \cdot 10^2$
<b>RLU Ø</b>	$5,69 \cdot 10^3$	$2,02 \cdot 10^3$	$1,73 \cdot 10^2$
<b>Versuch 2</b>	$2,66 \cdot 10^4$	$5,13 \cdot 10^3$	$1,60 \cdot 10^2$
	$9,61 \cdot 10^3$	$1,70 \cdot 10^2$	$1,80 \cdot 10^2$
	$1,90 \cdot 10^2$	$3,20 \cdot 10^2$	$3,80 \cdot 10^2$
<b>RLU Ø</b>	$1,21 \cdot 10^4$	$1,87 \cdot 10^3$	$2,40 \cdot 10^2$
<b>Versuch 3</b>	$2,40 \cdot 10^2$	$1,60 \cdot 10^2$	$1,50 \cdot 10^2$
	$2,60 \cdot 10^2$	$1,80 \cdot 10^2$	$1,70 \cdot 10^2$
	$2,00 \cdot 10^2$	$1,50 \cdot 10^2$	$1,50 \cdot 10^2$
<b>RLU Ø</b>	$2,33 \cdot 10^2$	$1,63 \cdot 10^2$	$1,57 \cdot 10^2$
<b>Mittelwerte aller RLU Ø</b>	$6,01 \cdot 10^3$	$1,36 \cdot 10^2$	$1,90 \cdot 10^2$

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2, 1:4 und 1:8 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte.



**Abb. 7: Infektion mit Usutu, JE und Zika-Pseudotypen.**

Vero-B4-Zellen wurden mittels des erhaltenen Überstandes von der Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den jeweiligen Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK und pHA-Z41519 infiziert. Die Verdünnungen der Zellkulturüberstände (1:2, 1:4 und 1:8) sind gegen die berechneten Mittelwerte (Versuch 1-4) der gemessenen relativen Lichteinheit (RLU) aufgetragen.

### 3.3.2 Infektion von Vero-B4-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E-Chimären der USUV-ZIKV

Für die Infektion von Vero-B4-Zellen wurden die USUV-ZIKV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln verwendet. Die Herstellung der Pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit den Hüllproteinen der Chimäre pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub> wurde durch Kotransfektion in HEK293T-Zellen realisiert (2.5.2.1). Dabei wurden definierten Verdünnungen der jeweiligen partikelhaltigen Zellkulturüberstände in dreifach oder vierfach Bestimmung zu den Vero-B4-Zellen gegeben. Zunächst wurde die 96-well-Platte mit 100 µl der zu infizierenden Zellen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem DMEM-Medium hergestellt. Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Messung der Infektionseffizienz. Die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten Vero-B4-Zellen, sowie die daraus resultierenden Mittelwerte ist in den Tabellen 8-10 angegeben. In der nachfolgenden Abbildung 9 sind die gemessenen Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten der mit den Usutu-Zika Pseudotypen infizierten Vero-B4-Zellen der verschiedenen Verdünnungen (1:2, 1:4 und 1:8) abgebildet (Abb. 8). Wie in dieser Abbildung zu entnehmen ist, weichen die Ergebnisse bei der Infektion mit den Usutu-Zika-Pseudotypen nicht weit auseinander. Die Infektion mit dem Hüllprotein der Chimäre pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> weist bei einer 1:2 Verdünnung einen Wert von bis zu  $2,22 \cdot 10^4$  auf. Die Infektion mit dem Hüllprotein der Chimäre pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, folgt mit einem Wert von  $3,68 \cdot 10^3$ .



**Tab. 8: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU*	
	pHA-U <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> U <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	1,05 · 10 <sup>3</sup>	9,77 · 10 <sup>4</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	1,60 · 10 <sup>2</sup>	3,82 · 10 <sup>4</sup>
	2,20 · 10 <sup>2</sup>	1,71 · 10 <sup>4</sup>
<b>RLU Ø</b>	4,77 · 10 <sup>2</sup>	5,10 · 10 <sup>4</sup>
<b>Versuch 2</b>	1,81 · 10 <sup>4</sup>	3,08 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	9,32 · 10 <sup>3</sup>	6,27 · 10 <sup>3</sup>
	2,20 · 10 <sup>4</sup>	6,04 · 10 <sup>3</sup>
<b>RLU Ø</b>	1,65 · 10 <sup>4</sup>	5,13 · 10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 3</b>	6,30 · 10 <sup>2</sup>	4,80 · 10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	1,40 · 10 <sup>3</sup>	5,24 · 10 <sup>3</sup>
	5,43 · 10 <sup>3</sup>	3,97 · 10 <sup>3</sup>
<b>RLU Ø</b>	2,49 · 10 <sup>3</sup>	3,23 · 10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 4</b>	6,85 · 10 <sup>4</sup>	6,82 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	6,92 · 10 <sup>4</sup>	1,95 · 10 <sup>3</sup>
	7,26 · 10 <sup>4</sup>	2,12 · 10 <sup>4</sup>
	8,81 · 10 <sup>4</sup>	1,34 · 10 <sup>4</sup>
<b>RLU Ø</b>	6,92 · 10 <sup>4</sup>	1,95 · 10 <sup>3</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	2,22 · 10 <sup>4</sup>	3,68 · 10 <sup>3</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

**Tab. 9: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.**

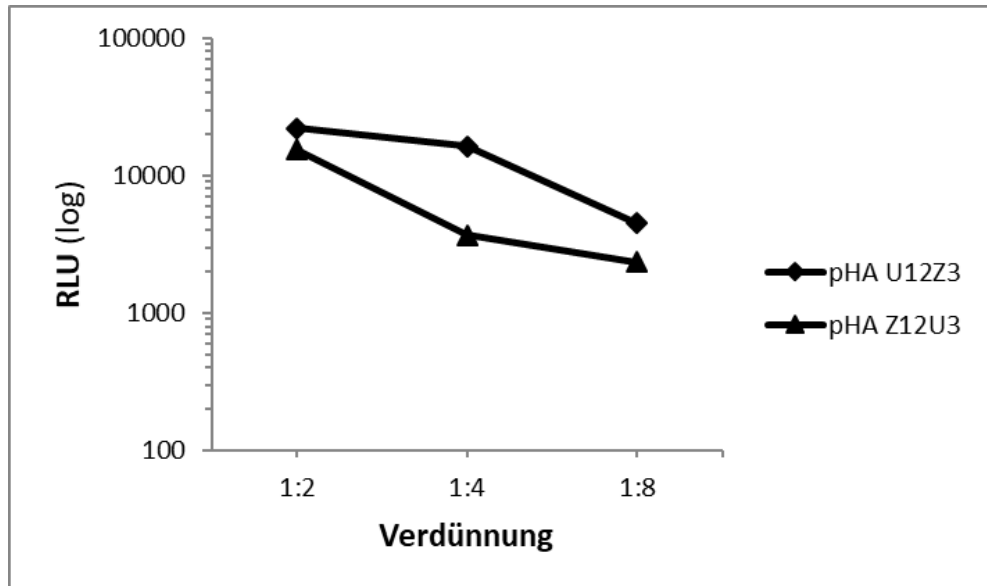
prM/E-Plasmid	RLU*	
	pHA-U <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> U <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	2,67·10 <sup>3</sup>	9,10·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	1,60·10 <sup>2</sup>	2,92·10 <sup>3</sup>
	1,28·10 <sup>3</sup>	2,95·10 <sup>4</sup>
<b>RLU Ø</b>	1,37·10 <sup>3</sup>	1,11·10 <sup>4</sup>
<b>Versuch 2</b>	4,18·10 <sup>3</sup>	2,79·10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	8,83·10 <sup>3</sup>	2,79·10 <sup>3</sup>
	3,29·10 <sup>3</sup>	2,50·10 <sup>2</sup>
<b>RLU Ø</b>	5,43·10 <sup>3</sup>	1,94·10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 3</b>	1,90·10 <sup>2</sup>	2,00·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	7,90·10 <sup>2</sup>	8,90·10 <sup>2</sup>
	2,00·10 <sup>2</sup>	2,40·10 <sup>2</sup>
<b>RLU Ø</b>	3,93·10 <sup>2</sup>	4,43·10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 4</b>	5,02·10 <sup>4</sup>	2,17·10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	5,83·10 <sup>4</sup>	5,70·10 <sup>2</sup>
	5,51·10 <sup>4</sup>	9,30·10 <sup>2</sup>
	6,85·10 <sup>4</sup>	1,22·10 <sup>3</sup>
<b>RLU Ø</b>	5,80·10 <sup>4</sup>	1,22·10 <sup>3</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	1,63·10 <sup>4</sup>	3,68·10 <sup>3</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:4 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

**Tab. 10: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmid	RLU*	
	pHA-U <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> U <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	1,40 · 10 <sup>2</sup>	2,31 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:8</b>	1,60 · 10 <sup>2</sup>	1,30 · 10 <sup>2</sup>
	1,70 · 10 <sup>2</sup>	5,90 · 10 <sup>2</sup>
<b>RLU Ø</b>	1,57 · 10 <sup>2</sup>	1,01 · 10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 2</b>	1,90 · 10 <sup>2</sup>	3,10 · 10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:8</b>	7,90 · 10 <sup>3</sup>	3,80 · 10 <sup>2</sup>
	1,34 · 10 <sup>3</sup>	1,60 · 10 <sup>2</sup>
<b>RLU Ø</b>	3,14 · 10 <sup>3</sup>	2,83 · 10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 3</b>	5,30 · 10 <sup>2</sup>	2,20 · 10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:8</b>	2,00 · 10 <sup>2</sup>	1,80 · 10 <sup>2</sup>
	1,80 · 10 <sup>2</sup>	1,90 · 10 <sup>2</sup>
<b>RLU Ø</b>	3,03 · 10 <sup>2</sup>	1,97 · 10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 4</b>	1,52 · 10 <sup>4</sup>	2,43 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:8</b>	4,65 · 10 <sup>3</sup>	1,08 · 10 <sup>3</sup>
	3,58 · 10 <sup>4</sup>	9,04 · 10 <sup>3</sup>
	1,53 · 10 <sup>3</sup>	1,89 · 10 <sup>4</sup>
<b>RLU Ø</b>	1,43 · 10 <sup>4</sup>	7,87 · 10 <sup>3</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	4,48 · 10 <sup>3</sup>	2,34 · 10 <sup>3</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:8 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.



**Abb. 8: Infektion mit Usutu-Zika-Chimären-HIV-1-Pseudotypen.**

Vero-B4-Zellen wurden mittels des erhaltenen Überstandes von der Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den jeweiligen Hüllproteinen pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub> infiziert. Die Verdünnungen (1:2, 1:4 und 1:8) sind gegen die berechneten Mittelwerte (Versuch 1-4) der gemessenen relativen Lichteinheit (RLU) aufgetragen.

### 3.3.3 Infektion von Vero-B4-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV Chimären

Die Infektion von Vero-B4-Zellen wurde mit JEV-ZIKV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln durchgeführt. Für die Herstellung der pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mittels Kotransfektion in HEK293T-Zellen wurden Hüllproteine der Chimäre pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> verwendet. Es wurden definierten Verdünnungen der partikelhaltigen Zellkulturüberstände mit den entsprechenden Expressionsvektor pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> bzw. pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> in dreifach oder vierfach Bestimmung zu den Vero-B4-Zellen gegeben. Zuvor wurde die 96-well-Platte mit 100 µl der zu infizierenden Zellen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem DMEM-Medium hergestellt. Nach drei Tagen Inkubation erfolgte die Messung der Infektionseffizienz. In Tabelle 11, 12 und 13 sind die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten Vero-B4-Zellen sowie die daraus resultierenden Mittelwerte zusammengefasst.

In der Abbildung 9 sind die Luciferase-Aktivitäten der Infektion mit JEV-ZIKV-Pseudotypen graphisch dargestellt. Dabei weist die Infektion mit dem Hüllprotein pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> bei einer 1:2 Verdünnung einen Wert von  $RLU = 1,27 \cdot 10^5$  auf. pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> folgt mit einem Wert von  $8,49 \cdot 10^3$ . Wie in der Abbildung 9 zu entnehmen ist, liegen die RLU-Werte beider Hüllproteine bei einer 1:4 als auch bei einer 1:8 Verdünnung nah beieinander.

**Tab. 11: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit prM/E der JE-Zika-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*	
	pHA-J <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> J <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	1,66 · 10 <sup>4</sup>	2,96 · 10 <sup>4</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	2,58 · 10 <sup>4</sup>	8,59 · 10 <sup>4</sup>
	1,40 · 10 <sup>4</sup>	3,70 · 10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	1,88 · 10 <sup>4</sup>	1,39 · 10 <sup>4</sup>
<b>Versuch 2</b>	1,50 · 10 <sup>3</sup>	3,19 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	1,01 · 10 <sup>4</sup>	1,20 · 10 <sup>3</sup>
	1,62 · 10 <sup>3</sup>	1,26 · 10 <sup>3</sup>
<b>Ø</b>	4,39 · 10 <sup>3</sup>	1,88 · 10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 3</b>	4,59 · 10 <sup>3</sup>	1,36 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	1,03 · 10 <sup>3</sup>	5,40 · 10 <sup>2</sup>
	1,18 · 10 <sup>3</sup>	3,60 · 10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	2,27 · 10 <sup>3</sup>	7,53 · 10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 4</b>	-	5,75 · 10 <sup>4</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>		4,93 · 10 <sup>4</sup>
	-	1,42 · 10 <sup>5</sup>
	-	1,42 · 10 <sup>5</sup>
<b>Ø</b>	-	4,93 · 10 <sup>5</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	8,49 · 10 <sup>3</sup>	1,27 · 10 <sup>5</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

**Tab. 12: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit prM/E der JE-Zika-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*	
	pHA-J <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> J <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	3,76 · 10 <sup>4</sup>	9,33 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	9,04 · 10 <sup>3</sup>	1,51 · 10 <sup>3</sup>
	7,44 · 10 <sup>3</sup>	4,26 · 10 <sup>3</sup>
<b>Ø</b>	1,80 · 10 <sup>4</sup>	5,03 · 10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 2</b>	7,83 · 10 <sup>3</sup>	9,60 · 10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	9,60 · 10 <sup>2</sup>	1,19 · 10 <sup>3</sup>
	4,00 · 10 <sup>2</sup>	2,10 · 10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	3,06 · 10 <sup>3</sup>	7,87 · 10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 3</b>	2,50 · 10 <sup>3</sup>	2,40 · 10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>	1,25 · 10 <sup>3</sup>	2,60 · 10 <sup>2</sup>
	2,00 · 10 <sup>2</sup>	2,40 · 10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	1,32 · 10 <sup>3</sup>	2,47 · 10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 4</b>	-	2,79 · 10 <sup>4</sup>
<b>ZKÜ 1:4</b>		9,68 · 10 <sup>3</sup>
	-	5,13 · 10 <sup>4</sup>
	-	3,39 · 10 <sup>4</sup>
<b>Ø</b>	-	3,07 · 10 <sup>4</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	7,46 · 10 <sup>3</sup>	9,19 · 10 <sup>3</sup>

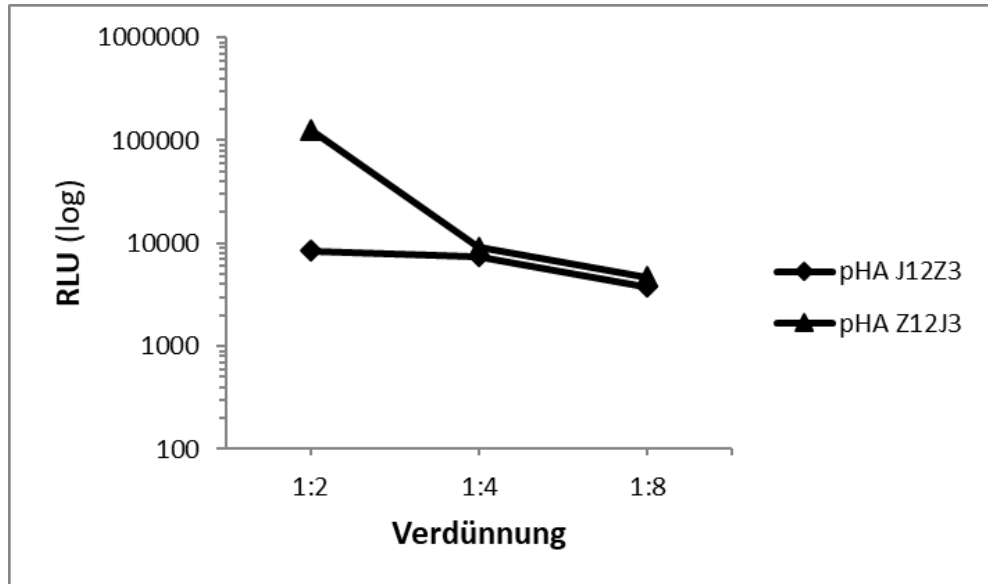
\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:4 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

**Tab. 13: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit prM/E der JE-Zika-E-Protein-Chimären infizierten Vero-B4-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*	
	pHA-J <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> J <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	2,56 · 10 <sup>3</sup>	1,30 · 10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:8</b>	5,42 · 10 <sup>3</sup>	8,30 · 10 <sup>2</sup>
	3,50 · 10 <sup>2</sup>	5,70 · 10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	2,78 · 10 <sup>3</sup>	5,10 · 10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 2</b>	1,50 · 10 <sup>2</sup>	3,70 · 10 <sup>2</sup>
<b>KÜ 1:8</b>	2,25 · 10 <sup>4</sup>	1,60 · 10 <sup>2</sup>
	9,30 · 10 <sup>2</sup>	2,70 · 10 <sup>3</sup>
<b>Ø</b>	3,79 · 10 <sup>3</sup>	1,08 · 10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 3</b>	1,19 · 10 <sup>3</sup>	2,31 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:8</b>	8,10 · 10 <sup>2</sup>	1,60 · 10 <sup>2</sup>
	1,70 · 10 <sup>2</sup>	1,70 · 10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	7,23 · 10 <sup>2</sup>	8,80 · 10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 4</b>	-	7,27 · 10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:8</b>	-	9,54 · 10 <sup>3</sup>
	-	2,06 · 10 <sup>4</sup>
	-	2,74 · 10 <sup>4</sup>
<b>Ø</b>	-	1,62 · 10 <sup>4</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	7,46 · 10 <sup>3</sup>	4,67 · 10 <sup>3</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:8 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.





**Abb. 9: Infektion mit Japanische-Enzephalitis -Zika-Pseudotypen.**

Vero-B4-Zellen wurden mittels des erhaltenen Überstandes von der Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den jeweiligen Hüllproteinen pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> infiziert. Die Verdünnungen 1:2, 1:4 und 1:8 sind gegen die berechneten Mittelwerte (Versuch 1-4) der gemessenen relativen Lichteinheit (RLU) aufgetragen.

### 3.4 Infektion von U87-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln

Im weiteren Verlauf wurden Infektionsversuche an den Glioblastomzellen der U87-Zelllinie durchgeführt. Die zu infizierenden Zellen wurden mit prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln infiziert. Diese Partikel entstanden während der lipophilen Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den entsprechenden Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519, pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> in HEK293T-Zellen (2.5.2.1).

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurde, sind die daraus hergestellten pseudotypisierten Partikeln aus den HEK293T-Zellen in den Überstand geschleust und wurden zum infizieren der U87-Zellen verwendet. Durch das Luciferase-Reportergen-Vektor pNL Luc AM wird die Infektionseffizienz gemessen.

Die Infektionsexperimente fanden in weißen 96-*well*-Zellkulturplatten statt. Zunächst wurden die zu infizierenden U87-Zellen in supplementiertem DMEM-Medium suspendiert. Für die Infektion wurden je 100 µl der Zellen in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und definierte Verdünnungen hergestellt. Die Zellkulturplatte wurde für 3 Tage im Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Auswertung.

Zunächst wurde der Überstand in den 96-*well*-Platten verworfen und die Zellen mit 100 µl Lysispuffer versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde 100 µl D-Luciferin-Puffer in die *wells* pipettiert. Nach 3-5 min wurde die Platte gemessen. Für die Messung der Luciferase-Aktivität der infizierten Zellen wurde ein Mikroplattenluminometer und das Programm Mikro Win 2000 verwendet.

### **3.4.1 Infektion von U87-Zellen mit Usutu-, JE- und Zika- prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln**

Die Infektion von U87-Zellen wurde mittels Usutu-, JE- und Zika-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln durchgeführt. Die prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikels entstanden durch die Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den entsprechenden Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519 in HEK293T-Zellen (2.5.2.1).

Die U87-Zellen wurden mit definierten Verdünnungen der jeweiligen partikelhaltigen Zellkulturüberstände in dreifach-Bestimmung infiziert. Hierfür wurde wie in Kapitel 3.4 beschrieben, die 96-*well*-Platte mit 100 µl der zu infizierenden Zellen ausgesät. Danach wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem DMEM-Medium hergestellt. Nach drei Tagen Inkubation fand die Messung der Infektionseffizienz statt.

In der Tabelle 14 sind die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten U87-Zellen sowie die daraus resultierenden Mittelwerte dargestellt. Die Mittelwerte der RLU liegen für alle drei Hüllproteine mit einem RLU = 1000 nicht über den Messwerten der Negativkontrollen.

**Tab. 14: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika-prM/E Pseudotypen infizierten U87-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*		
	pHA-USU-BH65	pHA-JE-NAK	pHA-Z41519
<b>Versuch 1</b>	$4,10 \cdot 10^2$	$2,10 \cdot 10^2$	$2,10 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$9,10 \cdot 10^2$	$1,90 \cdot 10^2$	$2,30 \cdot 10^2$
	$2,30 \cdot 10^2$	$2,10 \cdot 10^2$	$2,50 \cdot 10^2$
<b>Ø</b>	$5,17 \cdot 10^2$	$2,03 \cdot 10^2$	$2,30 \cdot 10^2$
<b>Versuch 2</b>	$3,00 \cdot 10^2$	$2,30 \cdot 10^2$	$4,70 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$1,42 \cdot 10^3$	$2,80 \cdot 10^2$	$1,06 \cdot 10^3$
	$5,60 \cdot 10^2$	$5,20 \cdot 10^2$	$9,80 \cdot 10^2$
<b>Ø</b>	$7,60 \cdot 10^2$	$3,43 \cdot 10^2$	$8,37 \cdot 10^2$
<b>Versuch 3</b>	$2,50 \cdot 10^2$	$2,30 \cdot 10^2$	$6,20 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$4,00 \cdot 10^2$	$4,20 \cdot 10^2$	$7,00 \cdot 10^2$
	$4,10 \cdot 10^2$	$3,00 \cdot 10^2$	$2,70 \cdot 10^2$
<b>Ø</b>	$3,53 \cdot 10^2$	$3,17 \cdot 10^2$	$5,30 \cdot 10^2$
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	$5,43 \cdot 10^2$	$2,88 \cdot 10^2$	$5,32 \cdot 10^2$

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

### **3.4.2 Infektion von U87-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E-Chimären der USUV-ZIKV**

Die mit Kotransfektion hergestellten USUV-ZIKV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln wurden für die Infektion von U87-Zellen verwendet. Die Herstellung der Pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit den Hüllproteinen der Chimäre pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub> wurde in HEK293T-Zellen realisiert (2.5.2.1). Für die Infektion der U87-Zellen wurde die 96-*well*-Platte mit 100 µl dieser Zellen ausgesät. Danach wurden die U87-Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Zellkulturüberstände von der Transfektion infiziert und dabei definierte Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem DMEM-Medium hergestellt. Jede Verdünnung wurde in dreifach oder vierfach Bestimmung hergestellt. Nach drei Tagen Inkubation erfolgte die Messung der Infektionseffizienz.

Die resultierenden Ergebnisse der Luciferase-Aktivitäten, der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten U87-Zellen sowie die daraus berechneten Mittelwerte sind in Tabelle 15 aufgelistet. Die Luciferase-Aktivitäten der USUV-ZIKV-Chimären infizierten U87-Zellen liegen im Bereich von 200 bis 700 RLU und damit nicht über den Messwerten der Negativkontrollen.

**Tab. 15: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten U87-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*	
	pHA-U <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> U <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	2,20·10 <sup>2</sup>	2,20·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,00·10 <sup>2</sup>	2,10·10 <sup>2</sup>
	1,90·10 <sup>2</sup>	1,70·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	2,03·10 <sup>2</sup>	2,00·10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 2</b>	3,00·10 <sup>2</sup>	6,30·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,79·10 <sup>3</sup>	1,90·10 <sup>2</sup>
	1,53·10 <sup>3</sup>	3,00·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	1,54·10 <sup>3</sup>	2,73·10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 3</b>	2,30·10 <sup>2</sup>	2,40·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	6,00·10 <sup>2</sup>	2,10·10 <sup>2</sup>
	2,80·10 <sup>2</sup>	2,50·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	3,70·10 <sup>2</sup>	2,33·10 <sup>2</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	7,04·10 <sup>2</sup>	2,35·10 <sup>2</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

### **3.4.3 Infektion von U87-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV-Chimären**

Im weiteren Verlauf wurden Infektionsexperimente mit den Zellkulturüberständen der Kotransfektion mit den Expressionsvektoren für die Hüllproteine der JEV-ZIKV-Chimäre durchgeführt. Die Herstellung der pseudotypisierten HIV-1-Partikeln wurde mittels Kotransfektion in HEK293T-Zellen mit den Hüllproteinen der Chimäre pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> und dem HIV-1-Vektor pNL Luc AM realisiert (2.5.2.1). Für die Infektion wurde zuvor die 96-*well*-Platte mit 100 µl der zu infizierenden Zellen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem DMEM-Medium hergestellt. Jeder Ansatz wurde in dreifach oder vierfach Bestimmung angesetzt.

Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Messung der Infektionseffizienz. In Tabelle 16 sind die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten U87-Zellen sowie die daraus resultierenden Mittelwerte zusammengefasst. Ähnlich wie in Abschnitt 3.4.1 und 3.4.2 liegen die ermittelten Ergebnisse der Luciferase-Aktivitäten unter RLU = 1000.

**Tab. 16: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit JEV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten U87-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*	
	pHA-J <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> J <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	2,40·10 <sup>2</sup>	1,80·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,50·10 <sup>2</sup>	2,40·10 <sup>2</sup>
	4,60·10 <sup>2</sup>	3,60·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	3,17·10 <sup>2</sup>	2,60·10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 2</b>	3,40·10 <sup>2</sup>	2,50·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,10·10 <sup>2</sup>	2,50·10 <sup>2</sup>
	1,31·10 <sup>3</sup>	2,70·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	6,20·10 <sup>2</sup>	2,57·10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 3</b>	2,20·10 <sup>2</sup>	2,40·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	5,70·10 <sup>2</sup>	2,60·10 <sup>2</sup>
	5,40·10 <sup>2</sup>	3,60·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	4,43·10 <sup>2</sup>	2,87·10 <sup>2</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	4,60·10 <sup>2</sup>	2,68·10 <sup>2</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.



### 3.5 Infektion von Hg39-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln

Zuletzt wurden Infektionsversuche mit der Glioblastomzelllinie Hg39 durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls die zu infizierenden Zellen mittels prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln infiziert. Durch die lipophile Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den entsprechenden Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519, pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> in HEK293T-Zellen, entstanden die prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln (2.5.2.1).

Dabei wurden die hergestellten pseudotypisierten Partikeln aus den HEK293T-Zellen in den Überstand geschleust und zum infizieren der Hg39-Zellen verwendet. Mit Hilfe des Vektors pNL Luc AM wird die Infektionseffizienz anhand des Luciferase-Assay gemessen. Alle Infektionsexperimente fanden in weißen 96-*well*-Zellkulturplatten statt. Als erstes wurden die zu infizierenden Hg39-Zellen in supplementiertem RPMI-Medium suspendiert. Anschließend wurden je 100 µl der Zellen in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Danach wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei definierte Verdünnungen hergestellt. Die Zellkulturplatte wurde für drei Tage im Inkubationsschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach drei Tagen Inkubation erfolgte die Auswertung.

Zuerst wurde der Überstand in den 96-*well*-Platten verworfen und die Hg39-Zellen mit 100 µl Lysispuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde 100 µl D-Luciferin-Puffer in die *wells* gegeben. Anschließend wurde die 96-*well*-Platte nach 3-5 min gemessen. Dabei wurde für die Messung der Luciferase-Aktivität der infizierten Zellen, ein Mikroplattenluminometer und das Programm Mikro Win 2000 verwendet.

### **3.5.1 Infektion von Hg39-Zellen mit USUV-, JEV- und ZIKV- prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln**

Die Infektion von Hg39-Zellen wurde mittels Usutu-, JE- und Zika-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln durchgeführt. Die prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikels entstanden durch die Kotransfektion des HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM mit den entsprechenden Hüllproteinen pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519 in HEK293T-Zellen (2.5.2.1).

Für die Infektion wurde wie in Kapitel 3.5 beschrieben, die 96-*well*-Platte mit 100  $\mu$ l der zu infizierenden Zellen ausgesät. Danach wurden die Zellen mit 100  $\mu$ l der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion in dreifach oder vierfach Bestimmung infiziert und dabei Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem RPMI-Medium hergestellt. Nach drei Tagen Inkubation fand die Messung der Infektionseffizienz statt. Die Tabelle 17 zeigt die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten Hg39-Zellen sowie die daraus resultierenden Mittelwerte dar. Die Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten liegen für alle drei Hüllproteine bei RLU < 700 und sind damit nicht größer als die Messwerte der Negativkontrollen (RLU < 1000).

**Tab. 17: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit Usutu-, JE- und Zika-prM/E Pseudotypen infizierten Hg39-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*		
	pHA-USU-		
	BH65	pHA-JE-NAK	pHA-Z41519
<b>Versuch 1</b>	$2,30 \cdot 10^2$	$1,90 \cdot 10^2$	$1,97 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$9,30 \cdot 10^2$	$1,80 \cdot 10^2$	$1,75 \cdot 10^2$
	$2,60 \cdot 10^2$	$2,60 \cdot 10^2$	$2,00 \cdot 10^2$
<b>Ø</b>	$4,73 \cdot 10^2$	$2,10 \cdot 10^2$	$1,31 \cdot 10^2$
<b>Versuch 2</b>	$9,30 \cdot 10^2$	$2,80 \cdot 10^2$	$2,30 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$1,12 \cdot 10^3$	$2,40 \cdot 10^2$	$3,20 \cdot 10^2$
	$3,00 \cdot 10^2$	$2,40 \cdot 10^2$	$2,80 \cdot 10^2$
<b>Ø</b>	$7,83 \cdot 10^2$	$2,53 \cdot 10^2$	$2,77 \cdot 10^2$
<b>Versuch 3</b>	$1,69 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^2$	$2,30 \cdot 10^2$
<b>ZKÜ 1:2</b>	$2,30 \cdot 10^2$	$2,20 \cdot 10^2$	$3,27 \cdot 10^2$
	$2,50 \cdot 10^2$	$2,40 \cdot 10^2$	$1,05 \cdot 10^3$
<b>Ø</b>	$7,23 \cdot 10^2$	$2,23 \cdot 10^2$	$1,52 \cdot 10^3$
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	$6,60 \cdot 10^2$	$2,29 \cdot 10^2$	$6,43 \cdot 10^2$

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

### **3.5.2 Infektion von Hg39-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E-Chimären der USUV-ZIKV**

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Infektionsversuche mit den USUV-ZIKV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln durchgeführt. Die Herstellung der pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit den Hüllproteinen der Chimäre pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub> wurde anhand der Kotransfektion in HEK293T-Zellen durchgeführt. Es wurden definierte Verdünnungen der jeweiligen partikelhaltigen Zellkulturüberstände in dreifach oder vierfach Bestimmung zu den Hg39-Zellen gegeben. Hierfür wurden zuerst 100 µl der zu infizierenden Zellen in die 96-*well*-Platte ausgesät. Folglich wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem RPMI-Medium hergestellt. Drei Tage nach der Infektion erfolgte die Messung der Infektionseffizienz.

In Tabelle 18 sind die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten Hg39-Zellen sowie die daraus resultierenden Mittelwerte dargestellt. Die Mittelwerte der Luciferase-Aktivitäten der mit USUV-ZIKV-Chimären infizierten Hg39-Zellen liegen bei RLU < 600 und sind somit nicht größer als die Messwerte der Negativkontrollen (RLU < 1000).

**Tab. 18: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit USUV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Hg39-Zellen.**

Expressionsvektor	RLU*	
	pHA-U <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> U <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	2,00·10 <sup>2</sup>	4,23·10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	6,20·10 <sup>2</sup>	1,48·10 <sup>3</sup>
	2,06·10 <sup>3</sup>	2,00·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	9,60·10 <sup>2</sup>	1,97·10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 2</b>	2,30·10 <sup>2</sup>	3,90·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	6,30·10 <sup>2</sup>	2,60·10 <sup>2</sup>
	2,50·10 <sup>2</sup>	1,46·10 <sup>3</sup>
<b>Ø</b>	3,70·10 <sup>2</sup>	7,03·10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 3</b>	3,30·10 <sup>2</sup>	2,57·10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,80·10 <sup>2</sup>	4,50·10 <sup>2</sup>
	7,00·10 <sup>2</sup>	2,60·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	4,37·10 <sup>2</sup>	1,09·10 <sup>3</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	5,89·10 <sup>2</sup>	1,75·10 <sup>3</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

### 3.5.3 Infektion von Hg39-Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der JEV-ZIKV-Chimären

Letztlich wurde die Infektion von Hg39-Zellen mit JEV-ZIKV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln durchgeführt. Die Herstellung der pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit Hilfe der Kotransfektion in HEK293T-Zellen wurde anhand der Hüllproteine der Chimäre pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> und pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> realisiert (2.5.2.1). Für die Infektion der Hg39-Zellen wurden definierten Verdünnungen der partikelhaltigen Zellkulturüberstände mit den entsprechenden Expressionsvektor pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> bzw. pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> in dreifach oder vierfach Bestimmung zu den Zellen gegeben. Zunächst wurde die 96-*well*-Platte mit 100 µl der zu infizierenden Zellen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl der partikelhaltigen Überstände von der Transfektion infiziert und dabei festgelegte Verdünnungen von 1:2 bis 1:8 mit supplementiertem RPMI-Medium hergestellt. Nach drei Tagen Inkubation erfolgte die Messung der Infektionseffizienz.

In Tabelle 19 sind die Luciferase-Aktivitäten der mit den prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel infizierten Hg39-Zellen sowie die daraus berechneten Mittelwerte dargestellt. Die Infektion der Hg39-Zellen mittels JEV-ZIKV-Chimären weisen Luciferase-Aktivitäten von RLU < 1000 auf und liegen damit unterhalb der Kontrollmesswerte.

**Tab. 19: Luciferase-Aktivitäten mittels der mit JEV-ZIKV-E-Protein-Chimären infizierten Hg39-Zellen.**

prM/E-Plasmide	RLU*	
	pHA-J <sub>12</sub> Z <sub>3</sub>	pHA-Z <sub>12</sub> J <sub>3</sub>
<b>Versuch 1</b>	2,30·10 <sup>2</sup>	4,50·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,00·10 <sup>2</sup>	1,70·10 <sup>3</sup>
	1,80·10 <sup>2</sup>	9,80·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	2,03·10 <sup>2</sup>	1,04·10 <sup>3</sup>
<b>Versuch 2</b>	3,10·10 <sup>2</sup>	2,60·10 <sup>2</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,80·10 <sup>2</sup>	3,80·10 <sup>2</sup>
	2,80·10 <sup>2</sup>	2,50·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	2,90·10 <sup>2</sup>	2,97·10 <sup>2</sup>
<b>Versuch 3</b>	2,90·10 <sup>2</sup>	1,71·10 <sup>3</sup>
<b>ZKÜ 1:2</b>	2,50·10 <sup>2</sup>	2,10·10 <sup>2</sup>
	2,50·10 <sup>2</sup>	1,90·10 <sup>2</sup>
<b>Ø</b>	2,63·10 <sup>2</sup>	7,03·10 <sup>2</sup>
<b>Mittelwerte aller Ø</b>	2,52·10 <sup>2</sup>	6,80·10 <sup>2</sup>

\* Abgebildet sind die gemessenen Luciferase-Aktivitäten der 1:2 Verdünnungen, sowie die daraus berechneten Mittelwerte der jeweiligen Expressionsvektoren.

## 4 Diskussion

Pseudotypisierte Partikel sind für die Analyse von Viren von großer Bedeutung. Diese Partikel stellen einen guten Ersatz zur Untersuchung von hochpathogenen Viren im Rahmen wissenschaftlicher Studien und klinischen Untersuchungen dar. Arbeiten mit pseudotypisierten Viruspartikeln können in Laboren der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt werden, währenddessen Untersuchungen mit hochpathogenen Viren Hochsicherheitslabore der Sicherheitsstufe, 3 und 4 benötigen. Dadurch verursachen diese Arbeiten einen großen Aufwand und hohe Kosten [39–41]. Neben normalen Pseudotypen mit vollständigen Hüllproteinen können auch chimäre E-Proteine untersucht werden. Die Konstruktion chimärer Pseudotypen eröffnet ein ganz neues Feld zur Studie der E-Proteinfunktion. In den letzten Jahren wurden viele Forschungsarbeiten durchgeführt unter Verwendung verschiedener Flavivirus-Chimären [42–44]. Die in dieser Arbeit untersuchten Flaviviren, JEV, USUV und ZIKV haben die gleiche Grundstruktur des E-Proteins, welche aus den drei Domänen ED1, ED2 und ED3 bestehen. Die ED1-Sequenz schließt dabei direkt an die linear codierte ED3-Sequenz an, wodurch ED1--ED2-ED3-Viruschimäre einfach hergestellt werden können. Dieser Austausch der ED3-Region eines Virus gegen die ED3-Region eines anderen Virus führt dazu, dass sich die einzelnen Domänen genauer studieren lassen. Mit den Klonierungsmethoden z. B. assembly-PCR können alle möglichen chimären Kombinationen der Flaviviren, sowie gezielte Mutationen einfach hergestellt werden [45]. Die Herstellung von Chimären ermöglicht die Untersuchung, der Unterschiede in den biologischen Eigenschaften von beispielsweise zwei Flaviviren. Die hergestellten Konstrukte der E-Proteinvarianten können auf Immunogenität, Rezeptorbindung sowie den Viruseintritt untersucht werden [42]. Vor allem für die Konstruktion attenuierter Lebendvirus-Impfstoffe können Studien mit chimären Viren sinnvoll sein. Die Eigenschaften gentechnisch veränderter chimärer Flaviviren müssen sorgfältig untersucht werden, da diese nicht immer vorhergesagt werden können [46,47]. Ein weiterer Vorteil von pseudotypisierte Viruspartikel ist, dass kein Virus-Wildtyp zur Herstellung dieser pseudotypisierten Viruspartikel benötigt wird. Für die rekombinante Produktion sind lediglich amplifizierte DNA- oder Sequenzdaten des Hüllproteins notwendig. Die Pseudotypen erscheinen von außen betrachtet wie ihre entsprechenden Virus-Wildtypen, wodurch diese besonders für die Untersuchung des Zelleintritts



bedeutsam sind. Die Deletion des Genoms ( $\Delta env$ ) führt dazu, dass die pseudotypisierten Viruspartikel nicht die vollständige genetische Information für die Vermehrung von infektiösen Viruspartikeln aufweisen. Sie sind in der Lage in die Wirtszelle einzudringen, können jedoch keinen vollständigen Viruszyklus durchlaufen, weshalb sie nach der Infektion keine neuen infektiösen Partikeln bilden (*single-round-infection*) [48].

Ein zusätzlicher Vorteil gegenüber Virus-ähnlichen-Partikeln (VLP) ist, dass Pseudotypen ein Genom tragen, in dem die eigentlichen Hüllproteine deletiert sind und sie stattdessen ein Reporter-gen besitzen. Durch den Austausch des Hüllproteins ( $\Delta env$ ) durch ein Reporter-gen, z. B. das Enzym Luciferase-Gen ( $Luc^+$ ), kann der Viruseintritt sehr einfach quantitativ analysiert werden. Weitere mögliche Reporter-gene können beispielsweise  $\beta$ -gal oder GFP sein [7,49]. Kommt es zur Bindung eines solchen Viruspartikel mit seinen Hüllproteinen an die Rezeptoren der Wirtszelle, erfolgt die Fusion mit der Membran wodurch das Genom aus den Partikeln in die Zelle transportiert wird. Das Reporter-gen wird dabei nach Viruseintritt aktiviert, wodurch die Infektionseffizienz anhand der Enzymmenge detektiert werden kann. Diese Methode ermöglicht die Untersuchung der Eigenschaften von Hüllproteinen von unterschiedlichen natürlichen Virusvarianten, Mutanten und Chimären [50].

Bisher konnten verschiedene lentivirale Vektoren des MLV (*Murines Leukämie-Virus*), SIV (*Simianes Immundefizienz-Virus*) sowie HIV für die Herstellung pseudotypisierter Partikel eingesetzt werden [51,52]. Zusätzlich zu den rein retroviralen Pseudotypen, haben sich auch pseudotypisierte Partikel mit viralen Hüllproteinen anderer Viren wie beispielsweise VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) [53], Hepatitis C Virus [54] und Ebolavirus [39] bewährt. Die Anwendung eines solchen Pseudotypen, wird beispielsweise bei den Ebola-Ausbrüchen in Afrika eingesetzt. Dieser Impfstoff basiert auf einem Ebola-VSV-Pseudotyp. Hierbei wurde das virale Hüllprotein G (VSV-G) im Genom deletiert und durch das virale Hüllprotein des Ebolavirus substituiert [39,55,56]. Diese Anwendung des Pseudotyp-System ist von großer Bedeutung, da das Ebolavirus im Menschen ein schweres hämorrhagisches Fieber verursacht und eine Sterberate von ca. 80 % aufweist [57,58]. Dieses Beispiel stellt die Wichtigkeit von Pseudotyp-Systemen als eine viel versprechende Möglichkeit zur Bekämpfung von Viren dar.

Ein wesentlicher Unterschied von Flaviviren zu anderen Viren, wie beispielsweise dem Ebolavirus ist der Austrittsprozess, auch genannt *budding* Prozess. Der *budding* Prozess bei Ebolaviren erfolgt an der Zellmembran, während der Prozess bei Flaviviren an der

Membran des Endoplasmatischen Retikulum stattfindet. Beim Ebolavirus erfolgt die Verbindung der Virusproteine mit den zellulären ESCRT-Sortierkomplexen (*endosomal sorting complexes required for transport*), anhand eines viralen Proteins welches ein bestimmtes Sequenzmotiv, das PTAP-Aminosäuremotiv enthält. Die Sortierkomplexe bestehen dabei aus cytosolischen Proteinkomplexen: ESCRT-0, ESCRT-1, ESCRT-2 und ESCRT-3. Flaviviren besitzen im Vergleich zum Ebolavirus keine Proteine mit einem PTAP-Sequenzmotiv, wodurch der *budding* Prozess nicht durch das ESCRT-System unterstützt wird. Dies könnte ein möglicher Grund sein, weshalb es bisher keine Arbeiten zu HIV-1-Pseudotypen mit Hüllproteinen der Flaviviren gibt. In einer Publikation wurde die Herstellung und Infektionsexperimente zu JEV beschrieben [59]. Jedoch wurde hierfür das VSV, anstelle des HIV als Verpackungssystem verwendet.

Eine weitere Veröffentlichung, welche jedoch sehr kritisch zu betrachten ist, erläutert das Dengue-prM/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel [14]. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden lassen sich jedoch nicht reproduzieren und führen nicht zur Herstellung prM/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel. Aktuell wird in der LG-Schreiber (BNITM, Hamburg) produktiv an ein Pseudotyp-System gearbeitet. Bisher wurden eine Dissertation, eine Bachelorarbeit sowie eine Masterarbeit veröffentlicht, in dem es gelungen ist, ein System für DENV-prM/E pseudotypisierte HIV-1-Partikeln zu etablieren [9,60,61]. In der Dissertation von Auerswald wurden erfolgreich Dengue-Hüllproteine exprimiert. Die Klonierungsstrategie für prM/E sowie die entsprechend veränderte Variante des Plasmids pcDNA3.1 wurde aus der Arbeit von Hu *et al.* übernommen [14]. Die Kotransfektion mit dem Vektor pNL4-3.Luc.R<sup>E</sup> führte zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen bzw. zu sehr niedrigen Ausbeuten. Die RLU-Infektionsergebnisse lagen nicht deutlich über die Infektionswerte der Negativkontrollen. Laut der Publikation von Usami *et al.* bestand der Verdacht, dass der nef-negative-Phänotyp des pNL4-3.Luc.R<sup>E</sup> Vektors, Auslöser für eine schlechte Produktion der Partikel sorgt. Infolgedessen erfolgten Experimente mittels Kotransfektion eines nef-Expressionsvektors. Hierbei konnten zum ersten Mal Infektionsraten mit den Dengue-Pseudotypen erreicht werden [61]. Die Arbeit von Kadlubowska (2019) erweiterte das bereits existierende HIV-1-basierende Pseudotypen-System für Dengueviren auf weitere Flaviviren [9]. Das vorhandene System sollte dabei verwendet werden, um herauszustellen ob Chimäre unterschiedliche Infektionsraten darstellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte das Pseudotypen-System für weitere Flaviviren, wie Usutu- Zika- und Japanische Enzephalitis- Viren, getestet werden. Transfektionsversuche sollten dabei in HEK293T-Zellen durchgeführt werden, da diese sich in der Vergangenheit als geeignet bewährt hatten [62]. Infektionsexperimente sollten an Vero-B4-Zellen als auch an die Glioblastomzellen der U87- sowie Hg39-Zelllinie durchgeführt werden, um den Neurotropismus der verschiedenen pseudotypisierten Viruspartikel zu untersuchen.

Die Transfektionsexperimente wurden für die Vergleichbarkeit für alle Flaviviren (USUV, ZIKV und JEV), mit denselben DNA-Mengen (2,5 µg pNL Luc AM + 12,5 µg prM/E-Expressionsvektor) durchgeführt. Dabei wurden in dieser Arbeit für alle vorhandenen Flaviviren sowie für die daraus resultierenden Chimäre positive Luciferase-Aktivitäten der Transfektion der lysierten HEK293T-Zellen erzielt. Aufgrund der erfolgreichen Transfektion konnten die Zellkulturüberstände für die Infektion von Vero-B4-, Hg39- und U87-Zellen verwendet werden.

Schwankungen bei der Messung der Transfektions- und Infektionseffizienz könnten mehrere Gründe haben. Neben den systematischen Abweichungen des Messgerätes, können Abweichungen auch aufgrund der Zelldichte entstehen. Hierbei spielt eine große Rolle, in welchen Zellen die Transfektion bzw. Infektion stattfindet, wie dicht diese zum Zeitpunkt der Transfektion und Infektion sind und wie das Zellwachstum verläuft. Da die Zellen sich während der zweitägigen Inkubationszeit teilen und die 96-well-Platte zunehmend bedecken ist darauf zu achten, dass eine komplette Konfluenz verhindert wird. Aufgrund der Konfluenz der Zellen, kann es zur Zellkontakthemmung führen, wodurch die Zellteilungsrate vermindert wird, der Zellmetabolismus reduziert und der Infektionsprozess letztlich eingeschränkt wird. Zudem kann die Konfluenz zur erschwerten Lyse des Zellrasens führen.

Bei den Infektionsexperimenten mit den Vero-B4-Zellen zeigten die Kontrollen der Luciferase-Aktivitäten zum Teil positive Messergebnisse auf. Die zu infizierenden Zellen wurden mit dem partikelhaltigen Überstand der Kotransfektion infiziert. Demnach muss sich das Luciferase-Protein in dem Überstand der Kotransfektion befinden. Um dies nachzuweisen, wurden die partikelhaltigen Überstände in eine 96-well-Platte überführt, mit D-Luciferin-Puffer versetzt und direkt gemessen. Die Luciferase-Aktivitäten der gemessenen Überstände weisen Werte von bis zu 6000 RLU auf, welche damit deutlich über die Messwerte der Negativkontrollen (RLU < 1000) liegen. Eine Möglichkeit für diese Verunreinigung könnten HEK293T-Zellen sein, die

möglicherweise bei der Kotransfektion, zu dicht wachsen. Wird adhärent wachsenden Zellen die Möglichkeit zur Adhäsion genommen, führt dies zur Bildung von Aggregaten und schließlich zum Zelltod. Durch das Absterben der Zellen wird dann Luciferase freigesetzt. In der Literatur gibt es bis dato keine Veröffentlichungen bei denen dieser „Fehler“ beschrieben wird. In Zukunft ist es essenziell, solche Kontrollen einzuführen, um diese Verunreinigung zu vermeiden. Es sollten mehrere Versuchsexperimente durchgeführt werden, bei denen die HEK293T-Zellen unterschiedliche Konfluenzen zum Zeitpunkt der Kotransfektion aufweisen. Darüber hinaus könnte der Zeitpunkt der Zellernte vorgezogen werden.

Zukünftig sollte genauer untersucht werden, welche Infektionsraten beim Austausch der Domänen erzielt werden können. Speziell für Flaviviren mit geringen Infektionseffizienzen, könnten in weiteren Untersuchungen, die Domänen der Flaviviren, welche geringe Infektionseffizienzen aufweisen, gegen die Domänen der Flaviviren mit deutlich höheren Effizienzen, ausgetauscht werden. Dadurch können Rückschlüsse auf die einzelnen Domänen des E-Proteins gezogen werden, um letztlich herauszufinden, welche Domäne inwiefern für die Infektion verantwortlich ist. Zusätzlich besteht die Möglichkeit gezielte sowie auch randomisierte Mutationen in den Domänenbereichen durchzuführen, um schließlich Viren mit besonderen Infektionseigenschaften zu selektieren. Gelingt dies, wäre es in der Zukunft möglich, ein Pseudotyp-System mit Flaviviren zu erzeugen, welche noch höhere Infektionseffizienzen oder einen spezifischeren Tropismus besitzen.

Der Neurotropismus, vor allem vom Zikavirus auf verschiedene Zellen sollte weiterhin untersucht werden. Zukünftige Infektionsexperimente mit den humanen Glioblastomzellen der U87- sowie Hg39-Zelllinie sind daher zu empfehlen. Ziel ist es, Glioblastom krebserregende Pseudotypen herzustellen. In naher Zukunft können Infektionsversuche mit frisch operierten Glioblastompatienten erfolgen. Das Zikavirus ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, wodurch das Virus das Gehirn von Menschen, vor allem von Föten schädigen kann. Es infiziert und tötet gezielt neuronale Vorläuferzellen, aus denen neue Nervenzellen entstehen, ab. Diese Vorläuferzellen besitzen ähnliche Markerproteine wie die Krebsstammzellen des Glioblastoms. Das gezielte töten neuronaler Vorläufer- und Stammzellen des Tumors mit dem Zikavirus könnte eine Möglichkeit sein, um die Lebensdauer der Krebspatienten zu erhöhen [63].

Die häufigste Form von Hirntumoren bei Erwachsenen stellen die bösartigen Gliome mit etwa 34 % aller Hirntumore dar [64]. Glioblastome haben im Vergleich zu anderen Tumorarten wie beispielsweise Oligodendrogliome eine erhöhte Tendenz nach einer aggressiven Therapie wieder zu wachsen [64]. Das Glioblastom entspricht somit einem schnell wachsenden, bösartigen Tumor, und wird aufgrund der sehr schlechten Prognosen nach der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems als Grad 4 eingestuft [65]. Heutzutage verwendete Therapien zur Bekämpfung von bösartigen Hirntumoren (Glioblastome) wie Operation, Chemotherapie und Bestrahlung weisen nur einen minimalen Erfolg dar.

Derzeit kann mit den aktuell gängigen Therapiemethoden nur eine mittlere Überlebenszeit von ca. 15 Monaten erreicht werden. Aufgrund des infiltrativen Wachstum der malignen Tumoren, sind diese schwer operativ zu entfernen, es können nie alle bösartigen Tumorzellen durch Bestrahlung bzw. Chemotherapie beseitigt werden. Zusätzlich weisen Gliom-Stammzellen ohne hin schon eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung auf [63,66,67]. Zudem kann bei der bildgebenden Diagnostik, aufgrund der Wanderung einzelner Zellen in andere Gebiete nicht die Wachstumsfront der Zellen komplett erfasst werden. Die Beseitigung aller Tumorzellen kann daher mit den heutzutage verwendeten Therapiemethoden nicht erzielt werden und die Rezidive des Glioblastoms ist somit absehbar [68].

Umso bedeutender ist es an Alternativ- bzw. Ergänzungs-Methoden zu forschen. Die Verwendung eines Pseudotyp-Systems kann sich als eine vielversprechende Ergänzung zu den bisherigen Therapien als erfolgreich erweisen. Bisher gibt es einige Publikationen bei denen Mäuse mit ZIKV infiziert wurden. In der Arbeit von Zhu *et al.* stellte sich fest, dass die Hirntumore, die mit dem ZIKV-Dakar-Stamm infizierten Mäuse, drastisch reduziert wurden und die Mäuse eine längere Lebensdauer hatten. Es stellte sich heraus das ZIKV einen onkolytischen Tropismus zur Infektion von Glioblastom-Stammzellen hat und hocheffizient ist, um humane Glioblastom-Stammzellen *in vitro* zu infizieren [69].

Chen *et al.* haben Infektionsversuche mit einem attenuierten ZIKV-Lebendimpfstoff (ZIKV-LAV) entwickelt. Diese fanden zusätzlich heraus, dass ZIKV-LAV seinen onkolytischen Tropismus gegenüber Glioblastom-Stammzellen von Patienten beibehält [70]. In weiteren Publikation wurde der Neurotropismus des ZIKV untersucht und dabei die Wirksamkeit der ZIKV-Behandlung gegenüber Glioblastome bestätigt [71,72]. Letztendlich muss in Zukunft untersucht werden, ob und inwiefern ZIKV bei

Glioblastompatienten Nebenwirkungen hervorrufen kann. Vor allem neurologische Komplikationen, wie beispielsweise das Guillain-Barré-Syndrom, müssen berücksichtigt werden [71,73]. Dies kann mit Hilfe von genetisch veränderten Stämmen realisiert werden, wodurch man das ZIKV so konstruiert, dass seine optimierte Sicherheit verbessert wird und seine onkolytische Aktivität gegenüber Glioblastomzellen bestehen bleibt. Von besonderer Bedeutung sind an dieser Stelle, Zika-Pseudotypen. Hierbei wird das Genom des Vektorplasmids HIV-1 verwendet. Das Hüllprotein wird dabei durch Hüllproteine des Zikavirus ersetzt. Die Erkenntnis, dass das Zikavirus einen onkolytischen Tropismus zur Infektion von Glioblastom-Stammzellen hat und in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden stellt eine bedeutende Möglichkeit zur Bekämpfung des Glioblastoms dar.

Die Tatsache, dass pseudotypisierte Partikel keinen vollständigen Viruszyklus durchlaufen und eine Vermehrung daher nach Zelleintritt nicht möglich ist, spricht für die Verwendung von Zika-Pseudotypen an Patienten.

Ein wichtiger Vorteil von Pseudotypen ist, dass das CRISPR/Cas9 in das Genom der Pseudotypen integriert werden kann. Die Verwendung von Chimären E-Proteinen ist für das Studium der Rezeptorbindung, der Membranfusion und besonders des Neurotropismus ein wichtiges Werkzeug. Zusammen mit der Integration des CRISPR/Cas9-Systems könnten Zika-Pseudotypen in Zukunft eine Rolle bei der Bekämpfung des Glioblastoms spielen.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Infektionsexperimente mit pseudotypisierten HIV-1-Viruspartikeln durchgeführt. Als Hüllproteine wurden die Proteine prM und E der Flaviviren Usutu, Japanische Enzephalitis (JE) und Zika verwendet. Dafür standen drei Expressionsvektoren pHA-USU-BH65 (Usutu), pHA-JE-NAK (JE) und pHA-Z41519 (Zika) zur Verfügung. Zusätzlich wurden Chimären des E-Proteins mit ausgetauschten ED3-Domänen verwendet. Das E-Protein unterteilt sich in drei Domänen, ED1, ED2 und ED3 wobei die ED3 Domäne leicht austauschbar ist. Für die Expression der Chimären standen vier Plasmide zur Verfügung. Als viralen Vektor wurde das Plasmid pNL Luc AM ( $\Delta env$ ,  $nef^+$ ,  $Luc^+$ ) verwendet.

Im ersten Schritt der Arbeit wurde anhand der CsCl-Maxipräparation, Plasmid-DNA von den acht Plasmiden hergestellt. Für die Transfektionsexperimente wurden je Plasmid ca. 5-10 mg Plasmid-DNA aufgereinigt. Die DNA-Lösungen wurden alle auf eine Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingestellt.

Im zweiten Teil wurden pseudotypisierte Viruspartikel durch Transfektion des pNL Luc AM Vektors zusammen mit pHA-prM/E Expressionsvektoren hergestellt. Das Plasmid, pNL Luc AM, codiert für das HIV-1-Genom. Das andere Plasmid codiert für die prM/E-Hüllproteine des entsprechenden Flavivirus bzw. der E-Chimäre. Bei der Transfektion wurde das HIV-1-Vektorplasmid pNL Luc AM zusammen mit jeweils einem der Hüllproteine pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519 sowie den Chimären pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> der Zika- Usutu- und JE-Viren erfolgreich in HEK293T-Zellen transfiziert. Es wurden jeweils positive Luciferase-Aktivitäten nach Transfektion in den lysierten Zellen gemessen.

Im dritten Teil der Arbeit wurden Infektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurde die höchste Infektiosität für den Usutu-prM/E Pseudotypen gemessen, gefolgt von Zika-prM/E und dem JE-prM/E Pseudotypen. Bei den Pseudotypen mit den E-Protein Chimären zeigten die Zika/Usutu-Chimären (U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> > Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>) eine deutlich höhere Infektiosität als die Zika/JE-Chimären (Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> > J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>). Bei den Infektionsexperimenten mit U87- und Hg39-Zellen waren die meisten Messungen im Rahmen der Negativkontrollen. Für die Pseudotypen mit E-Proteinen der Usutu- und Zikaviren, sowie die Pseudotypen mit Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> und J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> E-Protein -Kombinationen wurden signifikante Luciferase-Werte erreicht. Damit konnte gezeigt werden, dass die ED3-Domäne eine wichtige Rolle beim Viruseintritt in U87- und Hg39-Zellen spielt.

## 6 Summary

In this master's thesis, infection studies were performed using pseudotyped HIV-1 particles. As envelope the prM and E proteins from the three Flaviviruses Usutu, Japanese Encephalitis (JE) and Zika were used. For this study three expression vectors, pHA-USU-BH65 (Usutu), pHA-JE-NAK (JE) and pHA-Z41519 (Zika) were available. Additionally, chimeras of the E-proteins with exchanged ED3 domains were used. The E-protein is divided into the three domains ED1, ED2 and ED3 with the ED3 as the domain that can easily be replaced by an ED3 domain of another flavivirus. For the expression of E-protein chimeras, four plasmids pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> and pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> were available and used. The viral vector used was the pNL Luc AM plasmid ( $\Delta env$ ,  $nef^+$ ,  $Luc^+$ ).

First of all, of all eight plasmids DNA was purified by the CsCl-method. For the transfection experiments 5-10 mg of plasmid-DNA was purified from each of the plasmids. The final concentration was adjusted to 1  $\mu g/\mu l$  each.

Secondly, pseudotyped HIV-1 was produced by transfection of the pNL Luc AM vector together with one of the pHA-prM/E expressing vectors. The plasmid pNL Luc AM codes for the HIV-1 genome, gag and pol. The other plasmid codes for the prM/E envelopes of the respective E-protein or the respective E-chimera. The transfection of HEK293T cells was successful for pNL Luc AM in all combinations with pHA-USU-BH65, pHA-JE-NAK, pHA-Z41519 as well as the chimeras pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>, pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>, pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> of the Zika- Usutu- and Japanese Encephalitis viruses. For all combinations, positive Luciferase activities were measured in the lysed HEK293T cells on day three after transfection.

Thirdly, pseudotyped viruses were used for infection experiments. The highest infection rates were observed for the Usutu-prM/E pseudotype followed by the Zika-prM/E and the JE-prM/E pseudotype. For pseudotypes containing the E-protein chimeras, the Zika/Usutu-chimera (U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> > Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>) showed higher infection rates compared to the Zika/JE-chimeras (Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> > J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>). For the infection experiments using U87 and Hg39 cells, most of the experiments showed infection rates similar to the controls. For pseudotyped viruses containing E-proteins of the Usutu and Zika viruses as well as the pseudotypes with Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub> and J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub> E-Protein combinations, significant Luciferase values above the controls were obtained. Therefore, a role for the ED3 domain for viral entry into U87 and Hg39 cells was shown.



## 7 Literaturverzeichnis

1. Tomás, H.A.; Mestre, D.A.; Rodrigues, A.F.; Guerreiro, M.R.; Carrondo, M.J.T.; Coroadinha, A.S. Improved GaLV-TR Glycoproteins to Pseudotype Lentiviral Vectors: Impact of Viral Protease Activity in the Production of LV Pseudotypes. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* 2019, 15, 1–8.
2. Li, Q.; Liu, Q.; Huang, W.; Li, X.; Wang, Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Rev. Med. Virol.* 2018, 28.
3. Wang, W.; Nie, J.; Prochnow, C.; Truong, C.; Jia, Z.; Wang, S.; Chen, X.S.; Wang, Y. A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. *Retrovirology* 2013, 10.
4. Zhao, J.; Nie, J.; Jiao, Y.; Li, L.; Zhang, T.; Liu, Q.; Huang, W.; Wu, H.; Wang, Y. Effect of the maturation of neutralizing antibodies on human immunodeficiency virus (HIV) envelope evolution in HIV-infected subjects. *Infect. Genet. Evol.* 2016, 38, 82–89.
5. Robinson, J.E.; Hastie, K.M.; Cross, R.W.; Yenni, R.E.; Elliott, D.H.; Rouelle, J.A.; Kannadka, C.B.; Smira, A.A.; Garry, C.E.; Bradley, B.T.; et al. Most neutralizing human monoclonal antibodies target novel epitopes requiring both Lassa virus glycoprotein subunits. *Nat. Commun.* 2016, 7.
6. Wright, E.; Temperton, N.J.; Marston, D.A.; McElhinney, L.M.; Fooks, A.R.; Weiss, R.A. Investigating antibody neutralization of lyssaviruses using lentiviral pseudotypes: a cross-species comparison. *J. Gen. Virol.* 2008, 89, 2204–13.
7. Garcia-Perez, J.; Sanchez-Palomino, S.; Perez-Olmeda, M.; Fernandez, B.; Alcami, J. A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Virol.* 2007, 79, 127–137.
8. Wahala, W.M.P.B.; Huang, C.; Butrapet, S.; White, L.J.; de Silva, A.M. Recombinant Dengue Type 2 Viruses with Altered E Protein Domain III Epitopes Are Efficiently Neutralized by Human Immune Sera. *J. Virol.* 2012, 86, 4019–4023.
9. Kadlubowska, P. *Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg Darstellung und Untersuchung von ZIKV-prM/E pseudotypisierten HIV-1-*

*Partikeln*; 2018;

10. Cronin, J.; Zhang, X.-Y.; Reiser, J. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Curr. Gene Ther.* 2005, 5, 387–398.
11. Doan, L.X.; Li, M.; Chen, C.; Yao, Q. Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Rev. Med. Virol.* 2005, 15, 75–88.
12. Strang, B.L.; Takeuchi, Y.; Relander, T.; Richter, J.; Bailey, R.; Sanders, D.A.; Collins, M.K.L.; Ikeda, Y. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors with Alphavirus Envelope Glycoproteins Produced from Stable Packaging Cells. *J. Virol.* 2005, 79, 1765–1771.
13. Liu, Q.; Fan, C.; Li, Q.; Zhou, S.; Huang, W.; Wang, L.; Sun, C.; Wang, M.; Wu, X.; Ma, J.; et al. Antibody-dependent-cellular-cytotoxicity-inducing antibodies significantly affect the post-exposure treatment of Ebola virus infection. *Sci. Rep.* 2017, 7.
14. Hu, H.P.; Hsieh, S.C.; King, C.C.; Wang, W.K. Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology* 2007, 368, 376–387.
15. Heinz, F.X.; Stiasny, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* 2012, 30, 4301–4306.
16. Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U.; Schätzl, H. *Molekulare Virologie*; Spektrum Akademischer Verlag 3. Auflage, 196–224, 2010; ISBN 978-3-8274-2241-5.
17. Simpson, D.I.H. Zika virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1964, 58, 335–338.
18. Kuno, G.; Chang, G.-J.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 2007, 152, 687–96.
19. Österlund, P.; Jiang, M.; Westenius, V.; Kuivanen, S.; Järvi, R.; Kakkola, L.; Lundberg, R.; Melén, K.; Korva, M.; Avšič – Županc, T.; et al. Asian and African lineage Zika viruses show differential replication and innate immune responses in human dendritic cells and macrophages. *Sci. Rep.* 2019, 9.
20. Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 2009, 360, 2536–2543.
21. Cao-Lormeau, V.M.; Blake, A.; Mons, S.; Lastère, S.; Roche, C.; Vanhomwegen, J.; Dub, T.; Baudouin, L.; Teissier, A.; Larre, P.; et al. Guillain-Barré Syndrome

- outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. *Lancet* 2016, 387, 1531–1539.
22. Araujo, A.Q.C.; Silva, M.T.T.; Araujo, A.P.Q.C. Zika virus-associated neurological disorders: A review. *Brain* 2016, 139, 2122–2130.
  23. Broutet, N.; Krauer, F.; Riesen, M.; Khalakdina, A.; Almiron, M.; Aldighieri, S.; Espinal, M.; Low, N.; Dye, C. Zika virus as a cause of neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 2016, 374, 1506–1509.
  24. Zanluca, C.; De Melo, V.C.A.; Mosimann, A.L.P.; Dos Santos, G.I.V.; dos Santos, C.N.D.; Luz, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2015, 110, 569–572.
  25. Chang, C.; Ortiz, K.; Ansari, A.; Gershwin, M.E. The Zika outbreak of the 21st century. *J. Autoimmun.* 2016, 68, 1–13.
  26. Ren, J.; Ding, T.; Zhang, W.; Song, J.; Ma, W. Does Japanese encephalitis virus share the same cellular receptor with other mosquito-borne flaviviruses on the C6/36 mosquito cells? *Virology* 2007, 4, 83.
  27. Mackenzie, J.S.; Gubler, D.J.; Petersen, L.R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* 2004, 10, S98-109.
  28. Vaughn, D.W.; Hoke, C.H. The Epidemiology of Japanese Encephalitis: Prospects for Prevention. *Epidemiol. Rev.* 1992, 14, 197–221.
  29. Yun, S.I.; Lee, Y.M. Japanese encephalitis the virus and vacci. *Hum. Vaccines Immunother.* 2014, 10, 263–279.
  30. Misra, U.K.; Kalita, J. Overview: Japanese encephalitis. *Prog. Neurobiol.* 2010, 91, 108–120.
  31. Ghosh, D.; Basu, A. Japanese encephalitis - A pathological and clinical perspective. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009, 3.
  32. Poidinger, M.; Hall, R.A.; Mackenzie, J.S. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology* 1996, 218, 417–421.
  33. Seitz, R. Usutu Virus. *Transfus. Med. Hemotherapy* 2014, 41, 73–82.
  34. Bakonyi, T.; Gould, E.A.; Kolodziejek, J.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology* 2004, 328, 301–310.

35. Weissenböck, H.; Kolodziejek, J.; Url, A.; Lussy, H.; Rebel-Bauder, B.; Nowotny, N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8, 652–656.
36. Cavrini, F.; Gaibani, P.; Longo, G.; Pierro, A.M.; Rossini, G.; Bonilauri, P.; Gerundi, G.E.; Di Benedetto, F.; Pasetto, A.; Girardis, M.; et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* 2009, 14.
37. Pecorari, M.; Longo, G.; Gennari, W.; Grottola, A.; Sabbatini, A.; Tagliazucchi, S.; Savini, G.; Monaco, F.; Simone, M.; Lelli, R.; et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* 2009, 14.
38. Pugach, P.; Marozsan, A.J.; Ketas, T.J.; Landes, E.L.; Moore, J.P.; Kuhmann, S.E. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology* 2007, 361, 212–228.
39. Wool-Lewis, R.J.; Bates, P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* 1998, 72, 3155–60.
40. Kiley, M.P.; Bowen, E.T.W.; Eddy, G.; Isaäcson, M.; Johnson, K.M.; McCormick, J.B.; Murphy, F.; Pattyn, S.R.; Peters, D.; Prozesky, O.W.; et al. Filoviridae: A taxonomic home for marburg and ebola viruses? *Intervirology* 1982, 18, 24–32.
41. Xiao, J.; Rijal, P.; Schimanski, L.; Tharkeshwar, A.K.; Wright, E.; Annaert, W.; Townsend, A. Characterization of an influenza virus pseudotyped with Ebolavirus glycoprotein. *J. Virol.* 2017, JVI.00941-17.
42. Chambers, T.J.; Nestorowicz, A.; Mason, P.W.; Rice, C.M. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J. Virol.* 1999, 73, 3095–101.
43. Liljeqvist, S.; Ståhl, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.* 1999, 73, 1–33.
44. Lai, C.; Bray, M.; Men, R.; Cahour, A.; Chen, W.; Kawano, H.; Tadano, M.; Hiramatsu, K.; Tokimatsu, I.; Pletnev, A.; et al. Evaluation of molecular strategies to develop a live dengue vaccine. *Clin. Diagn. Virol.* 1998, 10, 173–

179.

45. Smith, H.O.; Hutchison, C.A.; Pfannkoch, C.; Venter, J.C. Generating a synthetic genome by whole genome assembly:  $\phi$ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2003, *100*, 15440–15445.
46. Kaufmann, J.K.; Nettelbeck, D.M. Virus chimeras for gene therapy, vaccination, and oncolysis: Adenoviruses and beyond. *Trends Mol. Med.* 2012, *18*, 365–376.
47. Chambers, T.J.; Jiang, X.; Droll, D.A.; Liang, Y.; Wold, W.S.M.; Nickells, J. Chimeric Japanese encephalitis virus/dengue 2 virus infectious clone: Biological properties, immunogenicity and protection against dengue encephalitis in mice. *J. Gen. Virol.* 2006, *87*, 3131–3140.
48. McMahon, M.A.; Shen, L.; Siliciano, R.F. New approaches for quantitating the inhibition of HIV-1 replication by antiviral drugs in vitro and in vivo. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2009, *22*, 574–582.
49. Hachiya, A.; Sriwiriyanont, P.; Patel, A.; Saito, N.; Ohuchi, A.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Tsuboi, R.; Boissy, R.E.; Visscher, M.O.; et al. Gene transfer in human skin with different pseudotyped HIV-based vectors. *Gene Ther.* 2007, *14*, 648–656.
50. Lutz, A.; Dyall, J.; Olivo, P.D.; Pekosz, A. Virus-inducible reporter genes as a tool for detecting and quantifying influenza A virus replication. *J. Virol. Methods* 2005, *126*, 13–20.
51. Tan, R.C.H.; Harouse, J.M.; Gettie, A.; Cheng-Mayer, C. In vivo adaptation of SHIVSF162: Chimeric virus expressing a NSI, CCR5-specific envelope protein. *J. Med. Primatol.* 1999, *28*, 164–168.
52. Siegert, S.; Thaler, S.; Wagner, R.; Schnierle, B.S. Assessment of HIV-1 entry inhibitors by MLV/HIV-1 pseudotyped vectors. *AIDS Res. Ther.* 2005, *2*.
53. Guibinga, G.H.; Miyanojara, A.; Esko, J.D.; Friedmann, T. Cell surface heparan sulfate is a receptor for attachment of envelope protein-free retrovirus-like particles and VSV-G pseudotyped MLV-derived retrovirus vectors to target cells. *Mol. Ther.* 2002, *5*, 538–546.
54. Flint, M.; Logvinoff, C.; Rice, C.M.; McKeating, J.A. Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins. *J. Virol.* 2004, *78*, 6875–82.
55. Gross, L.; Lhomme, E.; Pasin, C.; Richert, L.; Thiebaut, R. Ebola vaccine development: Systematic review of pre-clinical and clinical studies, and meta-

- analysis of determinants of antibody response variability after vaccination. *Int. J. Infect. Dis.* 2018, *74*, 83–96.
56. Lennemann, N.J.; Herbert, A.S.; Brouillette, R.; Rhein, B.; Bakken, R.A.; Perschbacher, K.J.; Cooney, A.L.; Miller-Hunt, C.L.; Ten Eyck, P.; Biggins, J.; et al. Vesicular Stomatitis Virus Pseudotyped with Ebola Virus Glycoprotein Serves as a Protective, Noninfectious Vaccine against Ebola Virus Challenge in Mice. *J. Virol.* 2017, *91*.
  57. Feldmann, H.; Jones, S.; Klenk, H.D.; Schnittler, H.J. Ebola virus: From discovery to vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 2003, *3*, 677–685.
  58. Laupland, K.B.; Valiquette, L. Ebola virus disease. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2014, *25*, 128–129.
  59. Tani, H.; Shiokawa, M.; Kaname, Y.; Kambara, H.; Mori, Y.; Abe, T.; Moriishi, K.; Matsuura, Y. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 2010, *84*, 2798–807.
  60. Maibritt *Optimierung eines Infektionsmodells für Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel*; 2017;
  61. Auerswald, H. *Analyse der humoralen, neutralisierenden Immunantwort nach natürlichen Infektionen mit Dengueviren*; 2016;
  62. Hsieh, S.C.; Liu, I.J.; King, C.C.; Chang, G.J.; Wang, W.K. A strong endoplasmic reticulum retention signal in the stem-anchor region of envelope glycoprotein of dengue virus type 2 affects the production of virus-like particles. *Virology* 2008, *374*, 338–350.
  63. Neumaier, J. Zika-Virus killt Tumorstammzellen im Gehirn. *InFo Onkol.* 2017, *20*, 33–33.
  64. Hirntumor - Deutsche Krebsgesellschaft Available online: <https://www.krebsgesellschaft.de/basis-informationen-krebs/krebsarten/hirntumor.html> (accessed on Dec 28, 2019).
  65. Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K.; Burger, P.C.; Jouvett, A.; Scheithauer, B.W.; Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007, *114*, 97–109.
  66. Iacob, G.; Dinca, E.B. Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J. Med. Life* 2009, *2*, 386–393.
  67. Alvarado, A.G.; Thiagarajan, P.S.; Mulkearns-Hubert, E.E.; Silver, D.J.; Hale, J.S.; Alban, T.J.; Turaga, S.M.; Jarrar, A.; Reizes, O.; Longworth, M.S.; et al.

- Glioblastoma Cancer Stem Cells Evade Innate Immune Suppression of Self-Renewal through Reduced TLR4 Expression. *Cell Stem Cell* 2017, 20, 450-461.e4.
68. Giese, A.; Westphal, M. Treatment of malignant glioma: A problem beyond the margins of resection. *J. Cancer Res. Clin. Oncol. Suppl.* 2001, 127, 217–225.
69. Zhu, Z.; Gorman, M.J.; McKenzie, L.D.; Chai, J.N.; Hubert, C.G.; Prager, B.C.; Fernandez, E.; Richner, J.M.; Zhang, R.; Shan, C.; et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *J. Exp. Med.* 2017, 214, 2843–2857.
70. Chen, Q.; Wu, J.; Ye, Q.; Ma, F.; Zhu, Q.; Wu, Y.; Shan, C.; Xie, X.; Li, D.; Zhan, X.; et al. Treatment of human glioblastoma with a live attenuated Zika virus vaccine candidate. *MBio* 2018, 9.
71. Iannolo, G.; Sciuto, M.R.; Cuscino, N.; Pallini, R.; Douradinha, B.; Vitiani, L.R.; De Maria, R.; Conaldi, P.G. Zika virus infection induces MiR34c expression in glioblastoma stem cells: new perspectives for brain tumor treatments. *Cell Death Dis.* 2019, 10.
72. Su, K.Y.; Balasubramaniam, V.R.M.T. Zika Virus as Oncolytic Therapy for Brain Cancer: Myth or Reality? *Front. Microbiol.* 2019, 10.
73. Duca, L.M.; Beckham, J.D.; Tyler, K.L.; Pastula, D.M. Zika Virus Disease and Associated Neurologic Complications. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2017, 19.

## **8 Anhang**

### **8.1 Sequenzen der Flavivirus M und E Proteine**

#### **8.1.1 pHA-USU-BH65**

(cDNA3.1-R)

CCTCTAGACTCGAGCGGCCGCAATTATGCATGGACGTTTGTGGCGAGAAAGAGGAGCAC  
CCCTCCCGTGGCTAACATCACCAGTGCATGGATCGATCTCTCGCATTCACCCCATCC  
ATAGAAGCAGAGCTCCATTAGACCCTGGGTGATCCAGGACATGCCACCGAAGAGAGTTC  
TGAAGGCTCCTCCAAAGACCTGATGTACCGCCTTTCCTACAGAATTGAAAATGCCTCCG  
ACGGACCCAAAGTCCCACGCTGTGTGCCTAGGGCAGCTAGACGCTGTGCCCTTTGAT  
AGTGGTGATGAACGCTTTTCCAATGGAACCTTCTGCTTTGTGCCAGTGATGGTTTATCT  
GCTTATCCCCTCTTCCAACCACAATATATGAATCTCCAAATGGTGGTTCCATCTCAACC  
AACACTTTCGCGTTGGCTTCGGATGAAGCCACATAAGGGTTTGCTGTAACCATTCTACC  
AATGGGGGTGAGATCGGAAAGTGATGCCACAATGGAAATTGGGATTTTGCAAGGTCCGT  
CAGATCCCGTGTACTACAGTTCAAGGACCACAGTGCCGTGACCCGTGTCAGCCGGATTT  
TTTGCAAAGAAAACCTTTCCGTGCACATGCCGTAGGTGGTGCCTTTTAGTGTCAACCT  
TTCCATCTTGACTCGACACTTGAGATGACCAGATGTGAGCTTGACACTGCCCGAGAAAG  
ACACTGGAACAGCTCCTGCCAAGGCCTGGTGCAAAGCACCTTCTGGGAACCAAGCGCC  
ACAACCTGATCGCTTTGTGGCATGGGGCTCTTCGAACTCTAGTAGTATCTCTCTATTTCT  
CCAATTTGAGCTAGCTGGTGAAGTCCATGGGAGGGCCAAGTCATTAACCATTTCTCTAT  
GGACAAGGAAGTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
TTTCTTGGTTCACACTCAACTGATATTTCTCCATAGTCACCCATCTTCACAGTGATGGC  
TGGGGAAGTTGGGGAGTGATGGTAAACCGCCCAGCC

#### **8.1.2 pHA-USU-BH65**

(CMV-F)

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCATG  
GGCAACAATGGACCAGGACTAGTGATGATCATAACACTCATGACGGTTGTTTCAATGGT  
TTCTCTTTAAAGCTTTCCAACTTCCAGGGGAAAGTCATGATGACCATCAACGCGACTG  
ATATGGCAGATGTCATTGTTGTTCCCACGCAACATGGGAAAAACCAGTGCTGGATTAGA  
GCCATGGATGTCGGGTACATGTGTGATGATACCATCACTTATGAATGCCCCAAACTGGA



TGCAGGAAATGACCCAGAAGACATTGACTGTTGGTGTGACAAACAACCCATGTACGTCC  
ACTATGGAAGGTGCACAAGAGCCAGACACTCGAAGCGGAGTCGGCGGTTCGATCGCAGTG  
CAGACGCACGGGGAGAGTATGCTGGCTAACAAGAAGGATGCTTGGCTAGACTCAACCAA  
GGCTTCGAGATACCTGATGAAGACTGAGAATTGGATTATCAGGAATCCTGGGTATGCTT  
TTGTAGCTGTCCTCTTGGGCTGGATGCTGGGAAGCAACAATGGACAAAGGGTCGTTTTTC  
GTCGTTCTCTTGCTCCTTGTGGCGCCTGCTTATAGCTTCAACTGCCTTGGTATGAGCAA  
CAGAGACTTCCTTGAGGGAGTCTCTGGTGCTACCTGGGTTGACGTGGTTTTTGGGAAGGTG  
ACAGCTGCATAACCATCATGGCCAAGGACAAGCCGACCATTGACATTAAGATGATGGAA  
ACTGAAGCCACGAACCTGGCTGAAGTGAGAAGCTACTGCTATCTAGCCACTGTCTCAGA  
TGTTTTCAACTGTCTCCAACTGTCCAACAACCTGGGGAGGCCCAATCCTAAGAGAGCTG  
AGGACACGTACGTGTGCAAAAGTGGTGTCACTGACAGGGGCTGGGGCAATGGCTGTGGA  
CTATTTGGCAAAGGAAGTATAGACACGTGTGCCAACTTCACCTGCTCCCTGAAAGCGAT  
GGGCCGGATGATCCAACCGGAAAATGTTAAGTATGAAGTGGGAA

### **8.1.3 pHA-JE-NAK**

(cDNA3.1-R)

GGCCTCTAGACTCGAGCGGCCCAATTAAGCATGCACATTGGTCGCTAAGAACACGAGC  
ACACCTCCTGTGGCTAAGAAGGCCAAAGCAATTGATCGGTCTCGTGCGTTGACGCCCAT  
CCAGAGTAGTAGGGCCCCCATTAGCCCTTGTGTGATCCAAGACATTCCCCGAAGAGTG  
TTCTGAAGGCACCACCAAACTTGGTGAACGGCTTTCCCTATGGAGTTGAAAACCCCT  
CCAATAGAGCCAAAGTCCCAGGCTGTGTGCGCCAACGCTGCCAGTCTTTGAGCTCCCTT  
CAAAGTCGTTGAAAAGGCTTTGCCAGCGTGCTTCCAGCCTTGTGCCAATGGTGGTTAA  
TCTGCTTGTCTCCCTTTCCAACACTACGATGTAGGAGTCTCCGAAGGGGGTTCCATCTCG  
ACCAGCACCTTTGAGTTGGCGCTGGAAGTCGCGACGAAGGGGTTCACTGTCACCAGCCG  
CCCGACGGGGGTCATGTCATTGAGGCTCGCAACGGAGACAATCGGAATTTTGCAAGGGC  
CATCACTCCCAGAGTAGGAAAGTTCAATGACAACCTGTTCCGTGACCAGTGTCCGCCGA  
TTTTTCGCGAACGAGAATTTTTCTGTGCACATGCCATAGGTTGTGCCTTTCAGAGCCAG  
TTTGTCCATTTTCAGCCTGCATTTTAGGTGGCCTGATGTTAACTTCACTGAGCTTGAGT  
ACTCCACCACGATGGCTCCTGCCAACGCCTGATGGAGGCCTCCTTCTGTGACCCAAGA  
GCAACAACGGACTGTTTTGTGGCGTGCGCCTCTTCAAATTCATGAGGAGTTCTCTGTT  
TCTCCACGCTGTGCTCGAAGGGGGCGTCCAAGGGAGAGCGAGATCATGAAACCATTCCC  
TGTGGACCAAAAATGACTTTGACCCACGGTCATGACGTAAAATGCTTCAGTGTTTAGT  
CCACTCCTTGGCTCACAGTCCAGTGTGACTTCTCCGTAGTCACCAAGTTAAGGGTTAT  
TGAAGGAGCATTGGGTGTTACTGTAAACTTTGCCGCCTGGGACGCCCAACTTGCGCTG

AATAATTCCCATGGTTTTCCGAAGTGGTGGTTCCTGCACAAAATGCCAACTTCGTATT  
TGATGTTTT

#### **8.1.4 pHA-JE-NAK**

(CMV-F)

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCATG  
CAAAACAAAAGAGGAGGAAATGAAGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGT  
CATAGCCTGCGCAGGAGCCATGAAGTTGTCAAATTTCCAGGGGAAGCTTTTGATGACCG  
TCAACAACACGGACATTGCAGACGTTATCGTGATTCCCACCTCAAAGGAGAGAACAGA  
TGTTGGGTCCGGGCAATCGACGTCGGCTACATGTGTGAGGACACTATCACGTACGAATG  
TCCTAAGCTCACCATGGGCAATGATCCAGAGGACGTGGACTGTTGGTGTGACAACCAAG  
AAGTCTACGTCCAATATGGACGGTGCACGCGGACCAGGCATTCCAAGCGAAGCAGGAGA  
TCCGTGTCGGTCCGAACACATGGGGAGAGTTCACTAGTGAATAAAAAAGAGGCTTGGCT  
GGATTCAACGAAAGCCACACGATACCTCATGAAAAGTGGAACTGGATCGTAAGGAATC  
CTGGCTATGCTTTCCTGGCGGCGATACTTGGCTGGATGCTTGGCAGTAACAACGGTCAA  
CGCGTGGTATTACCATCCTCCTGCTGTTGGTTCGCTCCGGCTTACAGTTTCGACTGTCT  
GGGAATGGGCAATCGTGACTTCATAGAAGGAGCCAGTGGAGCCACTTGGGTGGACTTGG  
TGCTAGAAGGAGACAGCTGCTTGACAATTATGGCAAACGACAAACCAACATTGGACGTC  
CGCATGATCAACATCGAAGCTGTCCAACCTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGC  
TTCAGTCACTGACATTTTCGACGGTGGCTCGGTGCCCCACGACTGGAGAAGCTCACAACA  
AGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCAAACAAGGCTTCACTGATCGTGGGTGGGGC  
AACGGATGTGGATTTTTCGGGAAGGAAGCATTGACACATGTGCAAATTTCTCCTGCACC  
AGTAAGG

#### **8.1.5 pHA-Z41519**

(cDNA3.1-R)

CTCTAGACTCGAGCGGCCGCTCAACTAATTAAGCAGAAACAGCCGTGGAGAGGAAGATC  
ATCACTCCCCCAGGGCCAAGCATGTGAGGGAGATAGATCCATTCTTTGTGTTCAAACC  
TAACCACACTAGCAGCGTGCCTATGAGGATCTGTGAGAACCAGGACATTCCTCCAAACA  
GTGATTTGAAGGCTGCTCCAAAATCTGGTGAATGCCCTTACCCAGTGAGTTGAACACA  
CCCCGACTGATCCGAAGTCCCAGGCTGTATCCCCCAGGACTGCCATTTCTCTTGGCGCC  
TCTCACAGTGGCTTCAAATGCCTTTCCGATGGTGTACTACCTCCTATGCCAGTGGTGGG

TGATTTTCTTGTCCCAACTCCTATGACAATGTAAGAATCCCCAAATGGTGGGTCAAGC  
TCCAACATCATCTTTGAGTTCTCAGTGCTTTCAGTAATCACGGGGTTGGCGGTTATCAG  
CCTTCCAACTGGGGTCAGGGTCTGCATGTCCACCGCCATCTGGGCTGGGACCTTGCAGG  
GTCCATCTGTCCCTGCATACTGCACCTCCACTGTGACTGTTCCATGCAGTGTTCAGCT  
GGGACCTTGGTGAATGTGAATGCCGCAGTGCACAAGGAATATGACACGCCCTTCAATCT  
AAGCTTGTCCATTTTTAGGCGGCATTTCAAATGGCCAGAGAACAGCCTTCCCTTTGCAC  
CATCCATCTCAGCCTCTAGAGCTCCAGCGAGAGCCGTGTGAACGGCTCCTTCCTGGCTC  
CCCAGAACGACGACGGTTTGCCTCTTGGCGTGGGCATCCTTGAATTCTACCAATGCCTC  
TTTGTGTTCCAGTGTGGAGTTCGGTGTCTGCCCCAGCATGCCAAGGCAATGGGATGT  
CATGAAACCACTCTTTGTGCACCAACCAATGCTTATTGTTTCATGGTCAGGTAATACAGA  
TCTGAAAAGTCAAGGCCTGTCCTTGGTTCACAGTCAAGTCCTAAGCTTCCAAAGCCTCC  
CAAGGTTGCTTCCGCTCTTGGTGAATTAGGCGTAACCTCGACTTTCGCTCTGTTTTCGT  
CAGTTTCATGTCCGGTATCATTGACAATCATCCCGCTATGCTGGGAGCCATGCACTGAT  
AGCATTATCCG

### **8.1.6 pH A-Z41519**

(CMV-F)

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCCATG  
GGCGCAGACACCAGCATCGGAATCATTGGCCTCCTGCTGACTACAGCCATGGCAGCAGA  
GATCACTAGACGCGGGAGTGCATACTACATGTACTTGGATAGGAGCGATGCCGGGAAGG  
CCATTTTCGTTTGCTACCACATTGGGAGTGAACAAGTGCCACGTACAGATCATGGACCTC  
GGGCACGTGTGTGACGCCACCATGAGTTATGAGTGCCCTATGCTGGATGAGGGAGTGGA  
ACCAGATGATGTTCGATTGTTGGTGAACACGACATCAACTTGGGTTGTGTACGGAACCT  
GTCATCACAAAAAGGTGAGGCACGGCGATCTAGAAGAGCCGTGACGCTCCCTTCTCAC  
TCTACAAGGAAGTTGCAAACGCGGTCGCAGACCTGGTTAGAATCAAGAGAGTACACGAA  
GCACTTGATCAAGGTTGAAAACCTGGATATTCAGGAACCCCGGGTTTGCCTAGTGGCCG  
TTGCCATTGCCTGGCTTTTGGGAAGCTCGACGAGCCAAAAGTCATATACTTGGTCATG  
ATACTGCTGATTGCCCCGGCATAACAGTATCAGGTGCATTGGAGTCAGCAATAGAGACTT  
CGTGGAGGGCATGTGAGGTGGGACCGGGTTGATGTTGTCTTGGAAACATGGAGGCTGCG  
TTACCGTGATGGCACAGGACAAGCCAACAGTTGACATAGAGTTGGTCACGACGACGGTT  
AGTAACATGGCCGAGGTAAGATCCTATTGCTACGAGGCATCGATATCGGACATGGCTTC  
GGACAGTCGTTGCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAAT  
ATGTCTGCAAAGAACATTAGTGGACAGAGGTTGGGGAAAATGGTTGTGGACTTTTTGGC

AAAGGGAGCTTGGTGACATGTGCCAAGTTCACCTTGTCTAAGAAGATGACCGGGAAGAG  
CATTCAACCGGAAAAT

### **8.1.7 pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>**

(cDNA3.1-R)

CGGGCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCTCAACTAATTAAGCAGAAACAGCCGTGGAGAGGA  
AGATCATCACTCCCCCAGGGCCAAGCATGTGAGGGAGATAGATCCATTCTTTGTGTTC  
AAACCTAACACACTAGCAGCGTGCCTATGAGGATCTGTGAGAACCAGGACATTCCTCC  
AAACAGTGATTTGAAGGCTGCTCCAAAATCTGGTGAATGCCCTTGCCCAGTGAGTTGG  
ACACACCCCCGACTGATCCGAAGTCCCAGGCTGTATCCCCCAGGACTGCCATTCTCTTG  
GCGCCTCTCACAGTGGCTTCAAATGCCTTTCCGATGGTGCTACCACTCCTATGCCAGTG  
GTGGGTGATTTTCTTGTCCCCAACTCCTATGACAATGTAAGAATCCCCAAATGGTGGGT  
CAAGCTCCAACATCATCTTTGAGTTCTCAGTGCTTTTCAGTAATCACGGGGTTGGCGGTT  
ATCAGCCTTCCAAGTGGGGTCAGGGTCTGCATGTCCACCGCCATCTGGGCTGGGACCTT  
GCAGGGTCCATCTGTCCCTGCATACTGCACCTCCACTGTGACTGTTCCATGCAGTGTTT  
CAGCTGGGACCTTGGTGAATGTGAATGCCGCAGTGCACAAGGAATATAACACGCCCTTC  
AATGTAAGCCTTTCCATCTTTACTCGACACTTGAGATGACCAGAGGTGAGCTTGACACT  
GCCCAGAAAAGACACTGGAACAGCTCCTGCCAAGGCCTGGTGCAAAGCACCTTCCTGGG  
AACCAAGCGCCACAAGTGAATTGCTTTGTGGCATGGGGCTCTTCGAACTCTAGTAGTATC  
TCTCTATTTCTCCAATTTGAGCTAGCTGGTGAAATCCATGGCAGGGCCAAGTCATTAAA  
CCATTCTCTATGGACCAGGAAGTGTGTGGTGCCCACTGACA

### **8.1.8 pHA-U<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>**

(CMV-F)

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCATG  
GGCAACAATGGACCAGGACTAGTGATGATCATAACACTCATGACGGTTGTTTCTATGGT  
TTCTCTTTTAAAGCTTTCCAAGTCCAGGGGAAAGTCATGATGACCATCAACGCGACTG  
ATGTGGCAGATGTCATTGTTGTTCCCACGCAACATGGGAAAAACCAGTGCTGGATTAGA  
GCCATGGATGTCGGGTACATGTGTGATGATAACCATCACTTATGAATGCCCCAACTGGA  
TGCAGGAAATGACCCAGAAGACATTGACTGTTGGTGTGACAAACAACCCGTGTACGTCC  
ACTATGGAAGGTGCACAAGAACCAGACACTCGAAGCGGAGTCGGCGGTTCGATCGCAGTG  
CAGACGCACGGGGAGAGTATGCTGGCTAACAAGAAGGATGCTTGGCTAGACTCAACCAA

GGCTTCGAGATACCTGATGAAGACTGAGAATTGGATTATCAGGAATCCTGGGTATGCTT  
TTGTAGCTGTCCTCTTGGGCTGGATGCTGGGAAGCAACAATGGACAAAGGGTCGTTTTTC  
GTCGTTCTCTTGCTCCTTGTGGCGCCTGCTTACAGCTTCAACTGCCTTGGTATGAGCAA  
CAGAGACTTCCTTGAGGGAGTCTCTGGTGCTACCTGTATTGACGTGGTTT

### **8.1.9 pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>**

(cDNA3.1-R)

CGGGCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCAATTATGCATGGACGTTTGTGGCGAGAAAGAGGA  
GCACCCCTCCCCTGGCTAACATCACCAGTGCGATGGATCGATCTCTCGCATTACACCCC  
ATCCATAGAAGCAGAGCTCCCATTAGACCCTGGGTGATCCAGGACATGCCACCGAAGAG  
AGTTCTGAAGGCTCCTCCAAAGACCTGATGTACCGCCTTTCTACAGAATTGAAAATCC  
CTCCGACCGACCCAAAGTCCCACGCTGTGTGCGCTAGGGCAGCTAGACGCTGTGCCCT  
TTGATAGTGGTGAACGCTTTTCCAATGGAACCTCCTGCTTTGTGCCAGTGACGGTT  
TATCTGCTTATCCCCTCTTCCAACCACAATATATGAATCTCCAATGGTGGTTCCATCT  
CAACCAACACTTTCGCGTTGGCTTCGGATGAAGCCACATAAGGGTTTGTGTAACCATT  
CTACCAATGGGGGTGAGATCGGAAAGTATGCCACAATGGAAATTTGGGATTTTGCAAGG  
TCCGTCAGATCCCCTGTACTGCAGTTCAAGGACCACAGTGCCGTGACCCGTGTCAGCCG  
GATTTTTTTGCAAAGAAAACCTTTCCGTGCACATGCCGTAGGTGGTGCCTTTTAGTCTA  
AGCTTGTCCATTTTGAGGCGGCATTTCAAATGGCCAGAGAACAGCTTTCCCTTTGCACC  
ATCCATCTCAGCCTCTAGAGCTCCAGCGAGAGCCGTGTGAACGGCTCCTTCCCTGGCTCC  
CCAGAACGACGACGGTTTGCCTCTTGGCGTGGGCATCCTTGGATTCTACCAATGCCTCT  
TTGTTGTTCCAGTGTGGAGTTCCGGTGTCTGCCCCAGCATGCCAAGGCAATGGGATGTC  
ATGAAACCACTCTTTGTGCACCAACCAATGCTTATTGTTTCATGGTCAGGTAATACAGAT  
CTGAAAAGTCAAGGCCTGTCCTTGGTTCACAGTCAAGTCCTAAGCTTCCAAAGCCTCCC  
AAGGTTGCTTCCGCTCTTGGTGAATTAGGCGTAACCTCGACTTTCGCTCTGTTTTCGTC  
AGTTTCATGTCCGGTATCATTGACAATCATCCCGCTATGCTGGGAGCCTGCACTGATAG  
CATTATCCGAAACTCCAGATTTTCCGGT

### **8.1.10 pHA-Z<sub>12</sub>U<sub>3</sub>**

(CMV-F)

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCCATG  
GGCGCAGACACCAGCATCGGAATCATTGGCCTCCTGCTGACTACAGCCATGGCAGCAGA

GATCACTAGACGCGGGAGTGCATACTACATGTACTTGGATAGGAGCGATGCCGGGAAGG  
CCATTTTCGTTTGCTACCACATTGGGAGTGAACAAGTGCCACGTACAGATCATGGACCTC  
GGGCACATGTGTGACGCCACCATGAGTTATGAGTGCCCTATGCTGGATGAGGGAGTGGA  
ACCAGATGATGTTCGATTGCTGGTGCAACACGACATCAACTTGGGTTGTGTACGGAACCT  
GTCATCACAAAAAAGGTGAGGCACGGCGATCTAGAAGAGCCGTGACGCTCCCTTCTCAC  
TCTACAAGGAAGTTGCAAACGCGGTTCGACAGACCTGGTTAGAATCAAGAGAATACACGAA  
GCACTTGATCAAGGTTGAAAACCTGGATATTCAGGAACCCCGGGTTTTCGCTAGTGGCCG  
TTGCCATTGCCTGGCTTTTGGGAAGCTCGACGAGCCAAAAAGTCATATACTTGGTCATG  
ATACTGCTGATTGCCCCGGCATAACAGTATCAGGTGCATTGGAGTCAGCAATAGAGACTT  
CGTGGAGGGCATGTCAGGTGGGACCTGGGTTGATGTTGTCTTGGAACATGGAGGCTGCG  
TTACCGTGATGGCACAGGACAAGCCAACAGTTGACATAGAGTTGGTCACGACGACGGTT  
AGTAACATGGCCGAGGTAAGATCCTATTGCTACGAGGCATCGATATCGGACATGGCTTC  
GGACAGTCGTTGCCAACACAAGGTGAAGCCTACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAAT  
ATGTCTGCAAAGAACATTAGTGGACAGAGGTTGGGGAAAATGGTTGTGGACTTTTTGG  
CAAAGGGAGCTTGGTGACATGTGCCAAGTTCACGTGTTCTAAGAAGATGACCGGGAAGA  
GCATTCAACCGGAA

### 8.1.11 pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>

(cDNA3.1-R)

CTCTAGACTCGAGCGGCCGCTCAACTAATTAAGCAGAAACAGCCGTGGAGAGGAAGATC  
ATCACTCCCCCAGGGCTAAGCATGTGAGGGAGATAGATCCATTCTTTGTGTTCAAACC  
TAACCACACTAGCAGCGTGCCTATGAGGATCTGTGAGAACCAGGACATTCTCCAAACA  
GTGATTTGAAGGCTGCTCCAAAATCTGGTGAATGCCCTTACCCAGTGAGTTGAACACA  
CCCCGACTGATCCGAAGTCCCAGGCTGTATCCCCTAGGACTGCCATTCTCTTGGCGCC  
TCTCACAGTGGCTTCAAATGCCTTTCCGATGGTGCTACCACTCCTATGCCAGTGGTGGG  
TGATTTTCTTGTCCCCAACTCCTATGACAATGTAAGAATCCCCAAATGGTGGGTCAAGC  
TCCAACATCATCTTTGAGTTCTCAGTGCTTTTCAGTAATCACGGGGTTGGCGGTTATCAG  
CCTTCCAACCTGGGGTCAGGGTCTGCATGTCCACCGCCATCTGGGCTGGGACCTTGCAGG  
GTCCATCTGTCCCTGCATACTGCACCTCCACTGTGACTGTTCCATGCAGTGTTCAGCT  
GGGACCTTGGTGAATGTGAATGCCGCAGTGCACAAGGAATATGACACGCCCTTCAAAGC  
CAGTTTGTCCATTTTCAGCCTGCATTTTAGGTGGCCTGACGTAACTTCACTGAGCTTG  
AGTACTCCACCACGATGGCTCCTGCCAACGCCTGATGGAGGCCTCCTTCCTGTGACCCA  
AGAGCAACAACGGACTGTTTTGTGGCGTGCGCCTCTTCAAATTCATGAGGAGTTCTCT  
GTTTCTCCACGCTGTGCTCGAAGGGGGCGTCCAAGGGAGAGCGAGATCATGAAACCATT

CCCTGTGGACCAAAAATGACTTTGACCCACGGTCATGACGTA AAAATGCTTCAGTGTTT  
AGTCCACTCCTTGGCTCACAGTCCAGTGTGACTTCTCCGTAGTCACCAAGTTTAAGGGT  
TATCGAAGGAGCATTGGGTGTTACTGTAACTTTGCCGCCTGGGACGCCCCAACTTGCG  
CTGAATAATTCCCATGGTTTTCCGAAGTGGTGGTTCCATGCACAAAAATGCCAACTTCG  
TACTTGAAGTTT

### **8.1.12 pHA-J<sub>12</sub>Z<sub>3</sub>**

(CMV-F)

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCCATG  
CAAAACAAAAGAGGAGGAAATGAAGGCTCAATCATGTGGCTCGCGAGCTTGGCAGTTGT  
CATAGCCTGCGCAGGAGCCATGAAGTTGTCAAATTTCCAGGGGAAGCTTTTGATGACCG  
TCAACAACACGGACATTGCAGACGTTATCGTGATTCCCACCTCAAAGGAGAGAACAGA  
TGTTGGGTCCGGGCAATCGACGTCGGCTACATGTGTGAGGACACTATCACGTACGAATG  
TCCTAAGCTCACCATGGGCAATGATCCAGAGGACGTGGACTGTTGGTGTGACAACCAAG  
AAGTCTACGTCCAATATGGACGGTGCACGCGGACCAGGCATTCCAAGCGAAGCAGGAGA  
TCCGTGTCGGTCCAAACACATGGGGAGAGTTCACTAGTGAATAAAAAAGAGGCTTGGCT  
GGATTCAACGAAAGCCACACGATACCTCATGAAAACGAGAACTGGATCGTAAGGAATC  
CTGGCTATGCTTTCCTGGCGGCGATACTTGGCTGGATGCTTGGCAGTAACAACGGTCAA  
CGCGTGGCATTACCCATCCTCCTGCTGTTGGTCGCTCCGGCTTACAGTTTCAACTGTCT  
GGGAATGGGCAATCGTGACTTCATAGAAGGAGCCAGTGGAGCCACTTGGGTGGACTTGG  
TGCTAGAAGGAGACAGCTGCTTGACAATTATGGCAAGCGACAAACCAACATTGGACGTC  
CGCATGATCAACATCGAAGCTGTCCAACCTGCTGAGGTCAGAAGTTACTGCTATCATGC  
TTCAGTCACTGACATTTTCGACGGTGGCTCGGTGCCCCACGACTGGAGAAGCTCACAACA  
AGAAGCGAGCTGATAGTAGCTATGTGTGCAAACAAGGCTTCACTGAATCGTGGGTGGGG  
GCAACGGATGTGGACTTTTTTCGGGAAGGGAAGCATTG

### **8.1.13 pHA-Z<sub>12</sub>J<sub>3</sub>**

(cDNA3.1-R)

GTTACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCAATTAAGCATGCACATTGGTTCGCTAAGAA  
CACGAGCACACCTCCTGTGGCTAAGAAGGCCAAAGCAATTGATCGGTCTCGTGCGTTGA  
CGCCCATCCAGAGTAGTAGGGCCCCCATTAGCCCTTGTGTGATCCAAGACATTCCCCCG  
AAGAGTGTCTGAAGGCACCACCAAACTTGGTGAACGGCTTTCCTATGGAGTTGAA

AACCCCTCCAATAGAGCCAAAGTCCCAGGCTGTGTTCGTCCAACGCTGCCAGTCTTTGAG  
CTCCCTTCAAAGTCGTTGAAAAGGCTTTGCCCAGCGTGCTTCCAGCCTTGTGCCAATGG  
TGGTTAATCTGCTTGTCTCCCCTTCCAACACTACGATGTAGGAGTCTCCGAAGGGGGTTC  
CATCTCGACTAGCACCTTTGAGTTGGCGCTGGAAGTCGCGACGAAGGGGTTCACTGTCA  
CCAGCCGCCCGACGGGGTTCATGTCATTGAGGCTCGCAACGGAGACAATCGGAATCTTG  
CAAGGGCCATCACTCCCAGAGTAGGAAAGTTCAATGACAACCTGTTCCGTGACCAGTGTC  
CGCCGGATTTTTTCGCGAACGAGAATTTTTCTGTGCACATGCCATAGGTTGTGCCTTTCA  
GTCTAAGCTTGTCCATTTTTAGGCGGCATTTCAAATGGTCAGAGAACAGCTTTCCCTTT  
GCACCATCCATCTCAGCCTCTAGAGCTCCAGCGAGAGCCGTGTGAACGGCTCCTTCCTG  
GCTCCCCAGAACGACGACGGTTTTGCCTCTTGGCGTGGGCATCCTTGAATTCTACCAATG  
CCTCTTTGTTGTTCCAGTGTGGAGTTCCGGTGTCTGCCCCAGCATGCCAAGGCAATGGG  
ATGTCATGAAACCACTCTTTGTGCACCAACCAATGCTTATTGTTTCATGGTCAGGTAATA  
CAGATCTGAAAAGTCAAGGCCTGTCCTTGGTTCACAGTCAAGTCCTAAGCTTCCAAAGC  
CTCCAAGGTTGCTTCCGCTCTTGTGAATTAGGCGTAACCTCGACTTTCGCTCTGTTTT  
CGTCAGTTT



## 8.2 Expressionsvektor

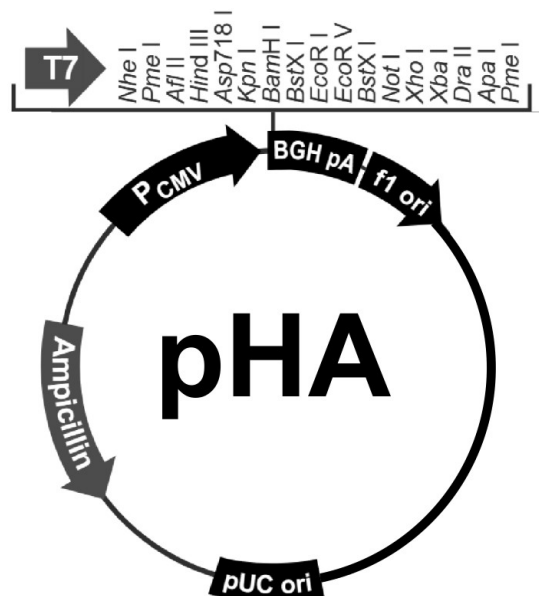
### 8.2.1 Flavivirus prM/E-Expressionsvektor

Die Konstruktion des Expressionsvektors für die Hüllproteine der Flaviviren ist bei Auerswald (2016) beschrieben [61].

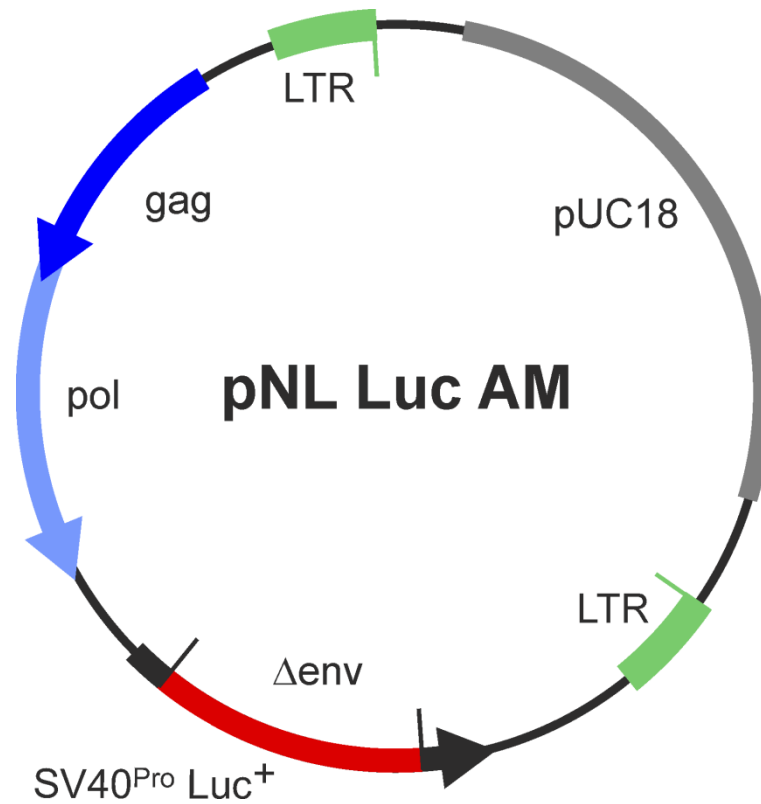
```

      API
      ┌───┴───┐
644  GCGTGGATAG CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG
      ┌───┴───┐
704  GAGTTTGTGTT TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC
      ┌───┴───┐
      CAAT                                TATA                                3' end of hCMV
764  ATTGACGCAA ATGGGCGGTA GGCCTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCTCTG
      ┌───┴───┐
      putative transcriptional start
824  GCTAACTAGA GAACCCACTG CTTACTGGCT TATCGAAATF AATACGACTC ACTATAGGGA
      ┌───┴───┐
      Hind III  Kpn I          BamH I          Bst XI          Eco R I
884  GACCCAAGCT TGGTACCGAG CTCGGATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT GCTGGAATTC
      ┌───┴───┐
      Eco R V  Bst X I          Not I          Xho I          Xba I          Apa I
944  TGCAGATATC CATCACACTG GCGGCCGCTC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC CTATTCTATA
      ┌───┴───┐
      Sp6 promoter
1004 GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC

1064 ATCTGTTGTT TGCCCCCTCC CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT
      ┌───┴───┐
      BGH polyA
1124 CCTTTCCTAA TAAAATGAGG AAATTGCAT
  
```



## 8.2.2 HIV-1 $\Delta$ env-Virusvektor



- $\Delta$ env: env deletiert (schwarz)
- Luc<sup>+</sup>: Luciferase Expression unter der Kontrolle des SV40 Promotors (rot)
- gag: HIV-1 Leseraster für das Vorläuferprotein der Strukturproteine (blau)
- pol: Leseraster für die Enzyme:  
Reverse-Transkriptase, Protease, Integrase (hellblau)
- LTR: Long terminal Repeats (grün)

## 9 Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Masterarbeit (Untersuchungen der Infektiosität von HIV-1 Pseudotypen mit Hüllprotein Chimären humanpathogener Flaviviren) ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Safa Ghanemi

01.01.2020

---

(Name)

(Datum)

(Unterschrift)