



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Infektion von Glioblastom-Zelllinien mit Zikavirus
prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln**

Masterarbeit

im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

vorgelegt von

Daniel Hoffmann



Hamburg, 08. Januar 2021

Die Masterarbeit wurde betreut und erstellt in der Laborgruppe Schreiber in der Abteilung für Virologie am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM) in Hamburg.

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

(HAW-Hamburg)

2. Gutachter: Dr. Michael Schreiber

(BNITM-Hamburg)

Danksagung

Für die Ermöglichung dieser Masterarbeit möchte ich zunächst Herrn Dr. Schreiber danken. Durch engagierte Betreuung konnten zahlreiche Fragen geklärt werden. Mit dem gleichzeitig zur Verfügung gestelltem Freiraum zum selbstständigen Arbeiten konnte ich mich dem spannenden Thema dieser Arbeit intensiv widmen. Dies habe ich in der entspannten Atmosphäre der Laborgruppe stets gerne getan.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Claus-Dieter Wacker für das Betreuen dieser Arbeit. Als Gutachter stand er zur Klärung für Fragen aller Art, neben seinen Pflichten gegenüber der Hochschule, immer gerne zur Verfügung.

Durch Kerstin Krausz wurde ich umfangreich in das Labor und dessen Abläufe eingearbeitet. Darüber hinaus konnten während der Kaffeepausen immer wieder wichtige Laborthemen erörtert werden. Für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft möchte ich mich an dieser Stelle recht herzlich bedanken.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meiner Freundin und meiner Familie bedanken. Während meiner Studienzeit und der praktischen Umsetzung im Labor konnte ich stets mit ihrer Unterstützung rechnen. Dadurch war es auch möglich, sich in stressigen Phasen auf das Wesentliche zu konzentrieren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Glioblastoma multiforme	1
1.2	Humanes Immundefizienzvirus Typ-1	2
1.3	HIV-1-pseudotypisierte Viruspartikel	7
1.4	Verwendung HIV-1-pseudotypisierter Viruspartikel	8
1.5	Zikavirus Verbreitung und Struktur	10
1.6	Ziele dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien	16
2.2	Geräte	16
2.3	Chemikalien und Reagenzien	17
2.3.1	<i>Chemikalien</i>	17
2.3.2	<i>Reagenzien</i>	18
2.4	Plasmide	18
2.5	Zelllinien	18
2.6	Mikrobiologische Methoden	19
2.6.1	<i>Medien und Agarplatten</i>	19
2.6.2	<i>Kultivierung von Escherechia coli</i>	19
2.6.3	<i>Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen</i>	19
2.7	Molekularbiologische Methoden	20
2.7.1	<i>DNA-Extraktion durch Caesiumchlorid-Maxi-Präparation</i>	20
2.7.2	<i>Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA</i>	22
2.7.3	<i>Restriktionsendonukleasespaltung</i>	22
2.7.4	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	22
2.8	Zellbiologische Methoden	23
2.8.1	<i>Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien</i>	23
2.8.2	<i>Kultivierung eukaryotischer Zelllinien</i>	23
2.8.3	<i>Transfektion von HEK293T-Zellen</i>	24
2.8.4	<i>Infektion eukaryotischer Zelllinien mit viralen Pseudotypen</i>	26
2.8.5	<i>Luciferase-Assay</i>	27
2.8.6	<i>Fluoreszenzmikroskopie (mCherry-Nachweis)</i>	29

3	Ergebnisse	30
3.1	Produktion und Charakterisierung der Plasmide für die Herstellung der Pseudotypen	30
3.2	Etablierung eines Puffers zum Luciferase-Nachweis	33
3.3	Nachweis von Infektionen durch Luciferase-Assay	35
3.3.1	<i>Herstellung von ZIKA- und Usutu-prM/E- pseudotypisierten Viruspartikeln</i>	35
3.3.2	<i>Infektion von VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen mit Z1-HIVluc und Z1-LENTIluc Pseudotypen.</i>	37
3.4	Infektionen von Zellen mit Pseudotypen die im Genom das CRISPR/Cas9-System tragen	40
3.4.1	<i>Transfektion von Zellen mit den für die Pseudotyp- Produktion verwendeten Plasmiden</i>	40
3.4.2	<i>Infektion von VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen durch Z1-LENTIluc</i>	44
4	Diskussion	53
4.1	Verwendung pseudotypisierter Viruspartikel	53
4.2	Luciferase Messungen	55
4.3	Infektion von Hg39- und U87-Zellen mit Z1-HIVluc	55
4.4	Infektion von Hg39- und U87-Zellen mit Z1-LENTIluc.....	56
4.5	Infektion von Hg39- und U87-Zellen LENTICherry Pseudotypen	59
4.6	Ausblick	60
5	Zusammenfassung	62
6	Literaturverzeichnis	63
7	Anhang	67
7.1	Plasmid psPAX2	67
7.2	Plasmid pNL Luc AM	68
7.3	Plasmid Lenti-luciferase-P2A-Neo	69
7.4	Plasmid pME.....	70
7.5	Plasmid pMD2.G	71
7.6	Plasmid LentiCRISPRv2-mCherry	72
7.7	Plasmide LentiCRISPR-CXCR4.1 und LentiCRISPR-CXCR4.2.....	72
8	Eidesstattliche Erklärung	73

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Virus <i>budding</i> durch das wirtseigene ESCRT-System	5
Abb. 2	Reifungsprozess des HIV-1-Virions	6
Abb. 3	Zika-Virion mit RNA-Genom	13
Abb. 4	Reifungsprozess des Zikavirus	14
Abb. 5	Graphische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation	21
Abb. 6	Reaktionsschema der lichtemittierenden Luciferase-Reaktion	28
Abb. 7	Agarose-Gelelektrophorese der verwendeten Plasmide	31
Abb. 8	Restriktionsverdau des HIV-1 Plasmids pNL Luc AM	32
Abb. 9	Vergleich des angesetzten Luciferasepuffers mit dem kommerziellen Bright-Glo™-Reagenz	34
Abb. 10	Luciferaseaktivitäten in infizierten VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen	38
Abb. 11	Luciferaseaktivitäten in infizierten VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen	39
Abb. 12	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit LentiCRISPRv2-mCherry transfizierter HEK293T-Zellen (Kontrolle)	41
Abb. 13	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme transfizierter HEK293T-Zellen durch 3-Plasmid Kombinationen	42
Abb. 14	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme transfizierter HEK293T-Zellen durch drei Plasmide mit VSV-Hüllproteinen	43
Abb. 15	VeroB4-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen LentiCRISPRv2- mCherry transfizierter HEK293T-Zellen (Kontrolle)	45
Abb. 16	VeroB4-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen 3-Plasmid transfizierter HEK293T-Zellen	46
Abb. 17	Hg39-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen LentiCRISPRv2- mCherry transfizierter HEK293T-Zellen (Kontrolle)	47
Abb. 18	Hg39-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen 3-Plasmid transfizierter HEK293T-Zellen	48
Abb. 19	U87-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen LentiCRISPRv2- mCherry transfizierter HEK293T-Zellen (Kontrolle)	49
Abb. 20	U87-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen 3-Plasmid transfizierter HEK293T-Zellen	50
Abb. 21	VeroB4-Zellen inkubiert mit VSV-G-Pseudotyp (VSV-G-LENTIluc) haltigen HEK293T-Zellkulturüberständen	51

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Transfektionsansätze für 24-well Zellkulturplatten	25
Tab. 2	Transfektionsansätze für den mCherry Fluoreszenznachweis	26
Tab. 3	Luciferaseaktivitäten in transfizierten HEK293T-Zellen	36

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
CaCl ₂	Calciumchlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A
CsCl	Caesiumchlorid
DAPI	4,6-Diamin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherechia coli</i>
ED1	E-Protein-Domäne 1
ED2	Protein-Domäne-2
ED3	Protein-Domäne-3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
env	envelope
ESCRT	Endosomaler Sortierungskomplex
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
GBM	Glioblastom multiforma
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gRNA	guide RNA für CRISPR/Cas9
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus Typ-1

kb	Kilobasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOAc	Natriumacetat
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
RLU	Relative Lichtimpulse (relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFA	ScreenFect™
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
TRIS-	HCl Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VSV	Vesicular stomatitis Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZKÜ	Zellkulturüberstände

1 Einleitung

1.1 Glioblastoma multiforme

Menschen erkranken jährlich an diversen Krebsarten. Zu den häufigsten Krebserkrankungen bei Frauen und Männern zählt die Darmkrebserkrankung. Frauen erkranken insgesamt häufiger an Brust-, Männer an Prostatakrebs. Im Jahr 2012 sind nach Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten (Barnes et al., 2016) bis zu 478.000 Krebs-Neuerkrankungen in Deutschland erfolgt. Die Zahl der Krebserkrankungen in Deutschland hat sich seit dem Jahr 1970 beinahe verdoppelt (Barnes et al., 2016). In den letzten Jahrzehnten wird eine Steigerung an Neuerkrankungen beobachtet.

Tumore des zentralen Nervensystems treten im Vergleich zu den oben genannten Krebsarten selten auf. Sie kommen sowohl bei Erwachsenen wie auch bei Kindern vor. Pro Jahr erkranken ca. 8000 Männer und Frauen an Tumoren des zentralen Nervensystems. Bei Kindern und Jugendlichen tritt der Hirntumor häufiger auf und ist für ca. ein Viertel der Krebserkrankungen verantwortlich. Man unterscheidet mehrere Formen des Hirntumors je nachdem von welchem Gewebetyp die Krebserkrankung abstammt. Das Glioblastom multiforme (GBM) ist der häufigste und gleichzeitig bösartigste Tumor aus der Gruppe der Hirntumore.

Das Glioblastom tritt bevorzugt im späteren Erwachsenenalter auf (Barnes et al., 2016). Es trägt einige Ähnlichkeiten mit den Gliazellen, den Zellen des menschlichen Nervengewebes (Urbańska et al., 2014). Diese Tumore zeichnen sich durch ihre aggressive Ausbreitung und den meist schweren Krankheitsverlauf aus. So kann ein solches Glioblastom innerhalb von 50 Tagen bis zur doppelten Größe anwachsen (Stensjøen et al., 2015). Ohne Behandlung liegt die mittlere Überlebenszeit heute bei wenigen Monaten. Durch aktuelle Behandlungen beträgt die Überlebenszeit bis zu ca. 14 Monaten (Johnson & O'Neill, 2012; Salcman, 1980). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stuft das GBM aufgrund des zügig voranschreitenden Tumorwachstums und seiner Bösartigkeit auf die höchste maligne Stufe IV ein (Deutsche Krebsgesellschaft). Die üblichen Behandlungsmethoden sind das operative Entfernen des erkrankten Hirngewebes mit nachfolgender Bestrahlung, und Chemotherapie (Urbańska et al., 2014).

Mit nur zwei Prozent haben die Glioblastome in Deutschland im Vergleich zu den Darm- und Brustkrebserkrankungen nur einen geringen Anteil (NOA, 2017). Im Gegensatz zum Darmkrebs oder weiteren Formen, ist eine Erkrankung durch Hirntumore noch nicht vollständig heilbar. Daher wird zusätzlich zur möglichst effektiven Früherkennung sowie Reduzierung karzinogener Einflüsse nach weiteren Behandlungsmethoden geforscht. Neben zahlreichen Studien an Zytostatika und Strahlentherapien (Urbańska et al., 2014) könnten auch onkolytische Viren (Wollmann et al., 2012) zur Bekämpfung der Tumore eingesetzt werden. Die Verwendung molekularbiologisch veränderter Viren ist bereits Gegenstand einiger Studien an Glioblastomen (Wollmann et al., 2012). Eine Bestrahlung kann neben Tumorgewebe auch gesundes Gewebe beschädigen. Eine virale Infektion der Tumorzellen dagegen könnte das gesunde Gewebe unangetastet lassen. Die Untersuchung des viralen Zelleintritts und Impfungen gegen Tumorantigene sind weitere Forschungsfelder.

Eine neue Methode ist dabei die Verwendung onkolytischer Viren. Auch GBM wird bereits dahingehend behandelt (Wollmann et al., 2012). Verwendete Viren wie das HIV-1, oder auch das Zika-Virus können dazu genetisch verändert werden, um die Anforderungen einer Therapie zu erfüllen. Zu nennen sind hier die gezielte Bindung der Viren an die Tumorzellen und deren Infektion. Mit dieser Strategie könnten gezielt tumorhemmende Faktoren in die Zellen des GBM eingebracht werden.

1.2 Humanes Immundefizienzvirus Typ-1

Viren kommen in verschiedensten Formen vor. Einzelne Viruspartikel außerhalb einer Zelle werden als Virion bezeichnet. Diese befallen vom extrazellulären Raum Wirtszellen und nutzen deren Metabolismus zur Vervielfältigung. Die Wirtszellen besitzen spezifische Rezeptoren für die Virusanheftung in der äußeren Zellmembran. Durch spezifische Bindung viraler Hüllproteine an zelluläre Rezeptoren wird meist eine Endozytose initiiert (rezeptorvermittelte Endozytose). Die Viren gelangen in Form eines Vesikels oder Endosoms in das Cytoplasma der Zelle. Durch Transportmechanismen entlang des Zellgerüsts werden die viralen Genome nach dem Zelleintritt zum Ort ihrer Replikation transferiert. Synthetisierte virale Nukleinsäuren und Proteine werden in der Zelle zu Viruspartikeln verpackt. Über verschiedene Transportwege werden sie aus der Wirtszelle geschleust (Modrow et al., 2010; Tobler et al., 2016).

Eines der bekanntesten Viren ist das weltweit verbreitete Retrovirus, das Humane-Immunodeficiency-Virus-Typ-1 (HIV-1). Es besteht aus einem inneren Kern und der äußeren Hülle. Die Hülle besteht aus der Membran der Wirtszelle und eingelagerten viralen Hüllproteinen. Für die Virusbildung lagern sich Vorläufer Proteine an der Zellmembran an und werden durch ein zelluläres Transportsystem ausgeschleust (Abb. 1).

Nach dem Virusaustritt beginnt die sogenannte Reifung des Partikels. Dabei werden in einem autokatalytischen Prozess durch die HIV-1 Protease die Strukturproteine und die Enzyme aus den Vorläuferproteinen gebildet (Abb. 2). Das p24 Antigen z.B. ummantelt die eingeschlossenen Nukleinsäuren des Virus und bildet das Kapsid um die virale RNA vor Degradierung zu schützen (Roossinck, 2018).

Auf der Virusoberfläche befinden sich die beiden Glykoproteine gp41 und gp120 (Abb. 2). Diese, auch Hüllproteine genannten Strukturen, sind für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle entscheidend. Kodiert werden sie von der env-Region. Retroviren beinhalten drei maßgebliche strukturelle Genregionen. Die gag-Region kodiert die Strukturproteine. Die Expression der pol-Region erzeugt die drei Schlüsselenzyme zur Vermehrung der Viren, Reverse Transkriptase, Protease und Integrase. Darüber hinaus werden durch die tat, ref, nef, vif, vpr und vpu Regionen sechs weitere regulatorische Proteine exprimiert (Süd-West, 2013).

Der Infektionszyklus des HIV beginnt durch die Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an einen CD4-Oberflächenrezeptor der Wirtszelle. Der gp120-Komplex erfährt dadurch eine Konformationsänderung und die Corezeptor bindende Domäne, der V3 loop, wird exponiert. Die dadurch folgende Bindung des V3 loops an einen der beiden Corezeptoren CCR5 oder CXCR4 bringt das Virus näher an die Zellmembran heran. Durch die Annäherung öffnet sich das gp120 Trimer und die Membrandomäne des gp41, ein Helix-turn-Helix Motiv, dringt in die Membran der Zelle ein. Dadurch kommt es zur Fusion von Virus- und Zellmembran (Singer et al., 2001; Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996). Durch die Membranverschmelzung gelangt das Viruskapsid in das Cytoplasma der Zelle wo die Umschreibung, die reverse Transkription der viralen RNA in DNA, erfolgt. Die virale DNA wird in den Zellkern transportiert und in das Genom der Zelle, mit Hilfe der HIV-1 Integrase, eingebaut. Die Virusvermehrung beginnt mit der Transkription der viralen Gene und deren Translation in die Vorläuferproteine gag und gagpol. Der Hüllprotein Vorläufer

gp160 wird in die Zellmembran verankert und durch eine zelluläre Protease in die beiden Hüllproteine gp41 und gp120 gespalten. Nach Translation der Viruskomponenten gag und gagpol reichern sich diese an der Innenseite der Zellmembran an. Für die Anreicherung ist der sog. ESCRT-Komplex (endosomal sorting complexes required for transport) ESCRT I-III von entscheidender Bedeutung. Die Verbindung zu dem ESCRT-System wird durch das virale Protein p6 hergestellt. Die ESCRT-Proteinkomplexe transportieren synthetisierte Proteine der Zelle zur Zellmembran. Sie initiieren die Freisetzung gebundener Rezeptorproteine der Membran in das umgebende Medium (*budding*). Dieser Vorgang sorgt ebenfalls für die Freisetzung der synthetisierten Viruspartikel (Bieniasz, 2009; Carlson et al., 2008; Votteler & Sundquist, 2013). Der ESCRT-III-Komplex bewirkt durch Ausbilden sich verengender Spiralen das *budding* der unreifen Viruspartikel. Das noch unreife Partikel wird von einem Teil der lipidhaltigen-Zellmembran der Wirtszelle umhüllt und aus der Membran herausgelöst (Abb. 1). Es verlässt die Zelle in das äußere Zellmedium, der Infektionszyklus ist beendet. Die vollständige Reifung des Partikels erfolgt während, und kurz nach dem *budding* Prozess durch proteolytische Prozessierung (Bukrinskaya, 2004; Freed, 2015). Dabei spaltet die viruseigene Protease die gag- und gagpol Polyproteine in die Untereinheiten. Das Viruspartikel erhält dadurch seinen infektiösen Zustand mit dem charakteristischen kegelförmigen Viruskapsid und den drei Enzymen Protease, Reverse-Transkriptase und Integrase (Abb. 2).

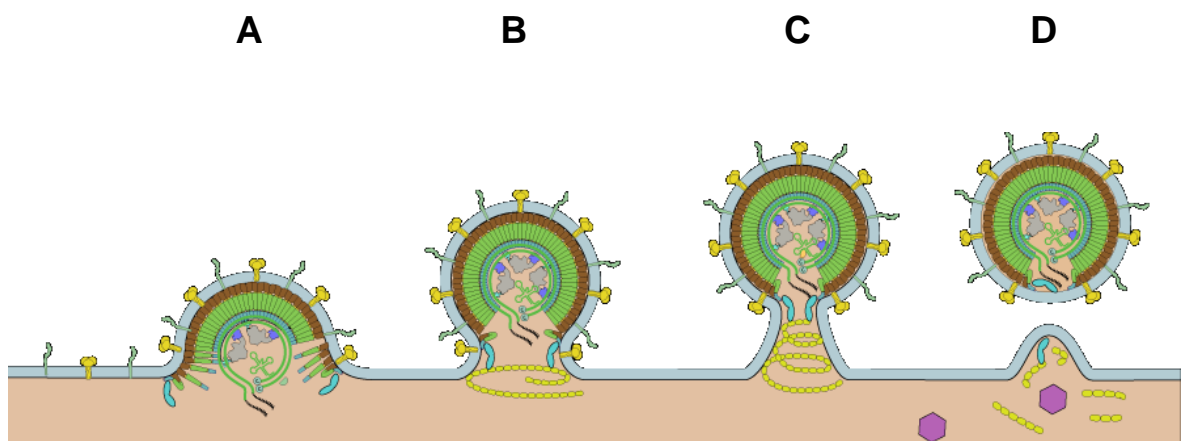


Abb. 1: Virus budding durch das wirtseigene ESCRT-System.

- A:** Das virale p6-Protein initiiert mit dem wirtseigenen ESCRT-I-Komplex die Anlagerung von der gag und gagpol Vorläuferproteine und der beiden dimerisierten RNA-Genome.
- B:** ESCRT-III-Komplexe binden das Vesikel und bilden sich verengende Spiralen aus.
- C:** Durch Schließen der Spiralen bildet sich ein Virion. Die Verengung in der Membran schließt sich.
- D:** Zellinterne VPS4-Komplexe katalysieren durch ATP-Verbrauch die Hydrolyse der ESCRT-III-Membran-Bindung. Die ESCRT-III-Komplexe lösen sich. Das Virion wird freigesetzt, und verlässt die Wirtszelle in das umgebende Medium.

Modifiziert aus: ViralZone o.J., <https://viralzone.expasy.org/1536>.

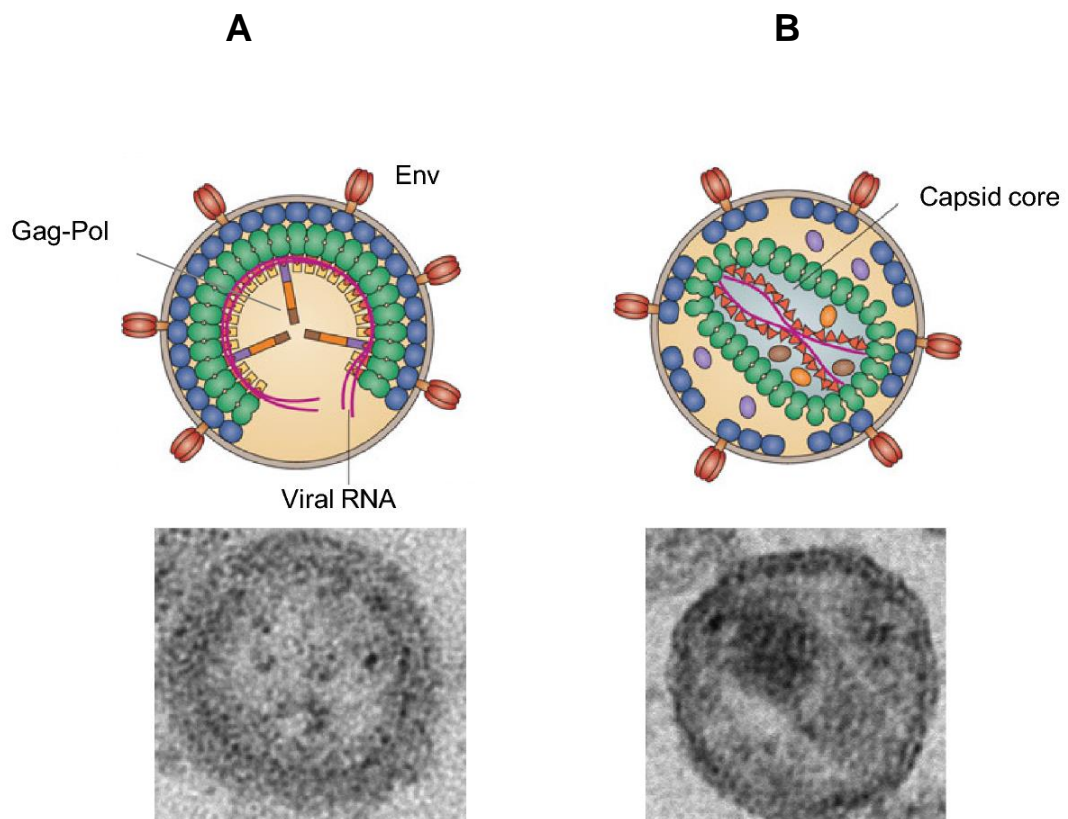


Abb. 2: Reifungsprozess des HIV-1-Virions

- A:** Unreifes (immature) HIV-Virion nach dem *budding* Prozess. Eine Lipidschicht der zuvor infizierten Wirtszelle schließt das gesamte Partikel ein. Es trägt die äußeren Hüllproteine, das Env-trimer (gp120 und gp41) und im Inneren die Vorläuferproteine gag (blau, grün) und gagpol (blau, grün, blau, orange und braun) sowie die beiden RNA Genome (rot). Aus dem gagpol Vorläufer schneidet sich die Protease autokatalytisch heraus und schneidet dann gag und gagpol in seine strukturellen und enzymatischen Bestandteile.
- B:** Gereiftes und infektiöses Viruspartikel. Das durch p24 gebildete Kapsid hat seine charakteristische Kegelform angenommen. Die virale RNA mit dem Nukleokapsidprotein, die Reverse-Transkriptase, und Integrase sind darin eingeschlossen. Unter der Membran befindet sich das Matrixprotein.

Modifiziert aus: (Novikova et al., 2019)

1.3 HIV-1-pseudotypisierte Viruspartikel

Genome des HIV-1 können durch etablierte molekularbiologische Verfahren genetisch verändert werden. Wird die Genregion die für die äußeren Hüllprotein kodiert entfernt, dann ist das entsprechende Genom *env*-deletiert. Ein Virus mit einem solchen Genom kann zwar Partikel bilden, diese besitzen allerdings keine Hüllproteine und sind daher nicht infektiös. Ergänzt man die Expression der Hüllproteine durch einen zweiten Expressionsvektor so können sich infektiöse Partikel bilden. Stammen die Hüllproteine von einer anderen HIV-1-Variante oder einem anderen Virus handelt es sich um einen entsprechenden *env*-HIV-1-Pseudotyp (Q. Li et al., 2018; Sanders, 2002).

Virale Pseudotypen bestehen somit aus der Kernstruktur des einen, und den Oberflächenproteinen (Hüllproteinen) eines anderen Virus. Dadurch sollen z.B. andere Zelllinien als die für das Virus üblichen Wirtszellen infizierbar werden. Die Kernstruktur des HIV-1-Pseudotypen wird von einem Plasmid, das das virale Genom beinhaltet produziert. Dessen Gensequenz ist *env* deletiert. In die dadurch freie Region im HIV-1-Genom können fremde Gene für bestimmte Reporter-Proteine oder Enzyme wie z.B. *mCherry*, GFP oder die *firefly lucifase* integriert werden. Nach Infektion mit dem Pseudotypen werden die Reporter expremiert und können dann durch verschiedene Verfahren, wie z.B. Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie oder Luminesz-messungen nachgewiesen werden (Hsu et al., 2003; Soezi et al., 2015). In dieser Arbeit wurden Sequenzen zur Expression des *mCherry*-Proteins und des Luciferase-Enzyms angewendet. Ein Nachweis erfolgreicher Infektionen durch pseudotypisierte HIV-1-Partikel wurde so ermöglicht. Die Gensequenzen zur Expression der Hüllproteine des Viruspartikels wurden durch einen zweiten Vektor (Expressionsvektor pME) eines anderen Virus komplettiert, ein 2-Plasmid-System.

Zur Herstellung viraler Pseudotypen werden etablierte Zelllinien wie COS-1 oder HEK293T verwendet. Durch transiente Transfektion können die Plasmide in die HEK293T-Zellen integriert werden (Bollin et al., 2011; Diefenbacher et al., 2014; Enlund et al., 2014). Die Zellen synthetisieren daraufhin anhand der zellfremden Gensequenzen Bestandteile der Viren. Virale Nukleinsäuren, expremierte Kapsid- Hüll- und regulatorische Proteine werden innerhalb der transfizierten Zellen zu Viruspartikeln (virale Pseudotypen) verpackt, und mittels *budding* aus der Zelle geschleust. Es können auch drei Plasmide eingesetzt werden. Dabei werden die für die Partikelbildung benötigten Gene für

gag und pol entfernt. Das verbleibende virale Genom besitzt dann nur noch die nötigen Sequenzen für die Umschreibung. Dimerisierung und Verpackung und das Reporter-gen. Gag und gagpol werden dann von einem zusätzlichen Expressionsvektor gebildet. Nach dem Freisetzen der Pseudotypen aus den Zellen reichern sich diese im umgebenden Kulturmedium an. Durch Zentrifugation können sie isoliert und für Infektionsexperimente verwendet werden. Da sich Pseudotypen nicht vermehren können wird die Infektion von Zellen auch als eine sog. *single round infection* bezeichnet. Eine weitere Infektion von Zellen ist aufgrund des deletierten viralen Genoms nicht möglich (Mascola et al., 2002).

1.4 Verwendung HIV-1-pseudotypisierter Viruspartikel

Pseudotypen werden seit Jahrzehnten in der Forschung eingesetzt (Sanders, 2002). Die Gentherapie, Impfstoffentwicklung und Krebsforschung sind einige der Anwendungsgebiete. Der Sicherheitsaspekt ist dabei ein wichtiger Vorteil bei der Verwendung von Pseudotypen. Entgegen pathogener Wildtypen besitzen Pseudotypen aufgrund deletierter Genome keine pathogenen Eigenschaften (Ogino et al., 2003). Arbeiten mit hochpathogenen Erregern wie Ebola oder Influenza-Viren können in Sicherheitslaboren der Stufe 2 (statt 4 oder 3) durchgeführt werden (Q. Li et al., 2018; Manicassamy et al., 2005; Qiu et al., 2013; Wool-Lewis & Bates, 1998). Auch HIV-1-Viren können als Pseudotypen durch *single round infection* ohne höchste Sicherheitsvorkehrungen eingesetzt werden (Mascola et al., 2002; Soezi et al., 2015; Suzuki et al., 2014). Im Hintergrund der Forschung und Entwicklung möglicher Heilungsmethoden werden HIV-pseudotypisierte Partikel darüber hinaus zum Studium des Zelleintritts verwendet (Aiken & Trono, 1995; Hsu et al., 2003; Nie et al., 2004; Sanders, 2002; Yonezawa et al., 2005). Möglich wird dies, wie erwähnt, durch die Gene des Reportervektors. Dessen erfolgreich eingebrachten, und von der Zelle expremierten Gene, resultieren unter anderem in Fluoreszenzproteinen (mCherry, GFP). Diese sind fluoreszenz-mikroskopisch erfassbar. Die Quantität lässt Rückschlüsse zur Effizienz des Viruseintritts zu.

Es haben sich einige Systeme zur Pseudotypisierung etabliert. Besonders von dem HIV-1 abstammende Vektoren haben sich als verlässliche Verpackungssysteme etablieren können (Q. Li et al., 2018). Sie werden häufig als virale Vektoren in 2- und 3-Plasmid-Systemen verwendet. die HIV-1-Gene konnten erfolgreich deletiert und andere Gene in diese

Vektoren kloniert werden. Durch Kotransfektion des viralen Vektors pNL LucAM mit einem Expressionsvektor (env+) können z.B. pseudotypisierte Partikel synthetisiert werden (2-Plasmid-System). Ein Reporter-gen ist bereits in den viralen Vektor in zuvor deletierte Genregionen integriert (Luciferase). Das Gen zur Expression der env Proteine gp41 und gp120 wurden entfernt. Der Vektor psPAX2 wurde ebenfalls auf Basis eines HIV-1-Isolats entwickelt. Dieser Vektor wird entgegen des pNL Luc AM Plasmids innerhalb eines 3-Plasmid-Systems eingesetzt. Hier sind keine Reportergene vorhanden. Darüber hinaus wurde der Einfluss des nef-Gens beschrieben. Pseudotypisierte HIV-1-Partikel scheinen mit expremiertem nef-Protein effektiver zu infizieren (Aiken & Trono, 1995; Chowers et al., 1994; Das & Jameel, 2005).

Ein genereller Nachteil des HIV-1 ist die begrenzte Möglichkeit Zellen zu infizieren. Es infiziert spezifisch Zellen mit CD4-Rezeptoren und CCR5 oder CXCR4 als Korezeptoren. Sofern die Zielzellen keine dieser Rezeptoren aufweisen, müssen geeignete Pseudotypen mit Hüllproteinen verwendet werden, mit denen eine Infektion möglich ist. Eine Kotransfektion mit dem etablierten Hüllprotein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) führte bereits vor Jahren zu infektiösen Pseudotypen. Einige Studien zeigten jedoch, dass andere Hüllproteine als das VSV-G für den jeweiligen Fall effizienter funktioniert haben (Sanders, 2002).

Weitere env Proteine zur Herstellung eines Pseudotyps mit einem HIV-1-Verpackungssystem sind in der Literatur beschrieben (Q. Li et al., 2018). Virale Hüllproteine der Viren VSV, Ebola (EBOV), Lassavirus (LASV), SARS-Virus-1 (SARS-CoV-1) und einige weitere wurden bereits mit einem HIV-1 viralen Vektor zu einem Pseudotypen Ko-transfiziert. Anhand der aktuellen Covid-Pandemie wurden ebenfalls HIV-1 Pseudotypen mit dem SARS-CoV-2 Erreger untersucht (B. Hu et al., 2020). Weiterhin bleibt die Ausbeute bei der Produktion von Pseudotypen eine Herausforderung (Q. Li et al., 2018). Pseudotypen müssen in ausreichendem Maße bei der Transfektion gebildet und isoliert werden. Diese Voraussetzung ermöglicht erst effiziente Infektionen der zu untersuchenden Zelllinien (Reiser, 2000).

Darüber hinaus muss jede neue Kombination an Vektoren für Pseudotypen auf Stabilität, und Reproduzierbarkeit getestet werden. Es wurden bereits einige Arbeiten zur Bildung

von HIV-1-Pseudotypen mit Hüllproteinen verschiedener Flaviviren veröffentlicht. Während das Dengue-Virus beispielsweise einige Male untersucht wurde, gibt es noch nicht viele Arbeiten zu HIV-1 basierenden Pseudotypen der Zikaviren (H.-P. Hu et al., 2007; Kadlubowska, 2019; Kretschmer, 2017). Im Hintergrund der bereits erwähnten Impf- und Krebsforschung könnten weitere Arbeiten mit Zikavirus pseudotypisierten HIV-1-Partikeln neue Erkenntnisse und Möglichkeiten hervorbringen.

1.5 Zikavirus Verbreitung und Struktur

Das Zikavirus ist seit den 1940er Jahren bekannt und heute in tropischen Regionen aller Kontinente vertreten. Es zählt aktuell neben Dengue und Gelbfieber mit zu den bedeutendsten Flaviviren (Familie Flaviridae) (Roossinck, 2018). Zu den meist nicht lebensbedrohlichen Symptomen zählen Fieber, Kopfschmerzen sowie auftretender Hautausschlag. Die Symptome der Patienten treten meist zwei bis sieben Tage nach der Infektion auf (Organization & others, 2016). Der Nachweis in Körperseren (Blut, Urin oder Sperma) durch die Kombination aus reverser-Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde erfolgreich etabliert. Darüber hinaus wird neben dem Guillain-Barré Syndrom (GBS) seit längerer Zeit das Auftreten der Zikavirus induzierten Mikrozephalie Erkrankung bei Neugeborenen beobachtet (Dos Santos et al., 2016; Organization & others, 2016; Rasmussen et al., 2016). Dabei kommt es zur Ausbildung eines geringen Kopfumfanges mit häufiger Behinderung. Die Infektion schwangerer Frauen mit dem Zikavirus steht in direktem Zusammenhang mit Hirnschädigungen bei Neugeborenen. Einige Studien befassen sich mit der Entwicklung eines Impfstoffes, den es aber bislang noch nicht gibt (Lin et al., 2018; Pérez et al., 2018).

Erstmals entdeckt wurde das Zikavirus 1947 in Uganda (Dick et al., 1952). Im namensgebenden Zika Wald wurde das Virus von einem Rhesus-Affen isoliert. Inzwischen haben sich zwei Subtypen herausgebildet, die in eine asiatische zwei afrikanische Gruppe unterschieden werden (Haddow et al., 2012). Übertragen wird es durch Stiche infizierter Mücken der Aedes-Gattung (Lanciotti et al., 2016). Eine sexuelle Übertragung wurde bereits länger diskutiert, da Zikavirus RNA im Sperma nachgewiesen wurde. In den USA wurden inzwischen sexuelle Übertragungen nachgewiesen (McCarthy, 2016; Musso et al., 2015; Oster et al., 2016). In den letzten Jahren wurde über Infektionen größeren Ausmaßes in Mikronesien (2007), Französisch-Polynesien (2013) sowie den USA (2018) berichtet

(Duffy et al., 2009; Ioos et al., 2014; Porse et al., 2018; Posen et al., 2016). Vor der Ausbreitung in der südlichen USA-Region konnte das Zikavirus erstmals 2015 in Seren einiger Patienten in Brasilien durch RT-PCR-Tests nachgewiesen werden (Campos et al., 2015). Möglicherweise hat es sich von dort in Amerika durch Mücken und infizierte Reisende verbreiten können. In Mittel- und Südamerika, Afrika sowie Regionen in Asien hat sich das Zika-Virus bis heute großflächig in Sub- und Tropenregionen ausgebreitet. Die WHO stuft 2016 die Zika-Ausbrüche als weltweites Gesundheitsproblem ein (Organization & others, 2016). Mögliche Begünstigungen der Mikrozephalie und mögliche höhere Infektionszahlen machen das Zikavirus zu einem wichtigen Erkrankungsfaktor für den Menschen.

Die erfolgreichen Infektionsmechanismen des Zikavirus, sein spezieller Neurotropismus, hat seine Verbreitung und in dem Zusammenhang schwere Hirnerkrankungen hervorgerufen. Möglicherweise könnten aber genau diese Eigenschaften dem Menschen zur Erforschung oder Therapie anderer Krankheiten verhelfen. Diverse virale Eigenschaften wurden wie bereits erwähnt in Form von pseudotypisierten Viruspartikeln genutzt, um Zelllinien zu infizieren. (Zhu et al., 2017) konnten beispielsweise nachweisen, dass Zika-Viren spezifisch Glioblastom-Stammzellen infizieren können.

Die Struktur des Zikavirus ist in der Literatur noch nicht vollständig, aber weitestgehend beschrieben. Seine gereifte Struktur ähnelt einer ikosaedrischen Kugel mit 50 nm im Durchmesser (Lindenbach & Rice, 2003, viralzone o. J.). In Linien angeordnet umgeben 90 E Proteine als Heterodimere das reife Virion. ME-Protein-Komplexe sind mit der darunter liegenden Membran (Lipidschicht) einer zuvor infizierten Wirtszelle verbunden. Die Membran umhüllt das Kapsid mit seinem für Flaviviren üblichen einzelsträngigen, positiv-orientiertem RNA-Genom (ss (+)-RNA) von etwa 11 kb (Ávila-Pérez et al., 2018; Roossinck, 2018; Smit et al., 2011). Das Kapsid wird aus Homodimeren des C-Proteins gebildet. Damit geht eine Einordnung in die Gruppe IV der Baltimore-Klassifizierung einher (Baltimore, 1971; Roossinck, 2018). Durch das offene Leseraster des (+)-RNA-Genoms wird ein etwa 3423 Aminosäuren langes Polyprotein translatiert (Ávila-Pérez et al., 2018; Lindenbach & Rice, 2003; Sirohi et al., 2016). Nicht kodierende Sequenzen schließen das 5' und 3' Ende des Genoms ab. Ähnlich dem beschriebenen HIV-1-Virus werden drei strukturgebende Proteine daraus prozessiert. Proteasen der Wirtszelle sowie

viruseigene Spaltungsenzyme schneiden das Polyprotein anhand spezifischer Bindungsstellen entlang der synthetisierten Aminosäurekette (Ávila-Pérez et al., 2018; Sirohi et al., 2016). Durch die Prozessierung entstehen Kapsid- (C), Hüll- (E, env) und vorläufige Membran-Proteine (prM). Neben den aufgezählten drei Strukturproteinen kodieren die Gensequenzen für sieben Nichtstrukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, und NS5). Sie regulieren unter anderem das Prozessieren und Verpacken neu synthetisierter Virusbestandteile zu neuen Viruspartikeln innerhalb des Zytoplasmas einer infizierten Wirtszelle (Abb. 3).

Der Zelleintritt leitet den Replikationszyklus ein. Das HIV-1-Virus bindet wie beschrieben spezifisch CD4-Rezeptoren. Das E-Protein eines Zika-Virions dagegen scheint wie andere Flaviviren verschiedene Rezeptoren unterschiedlicher Zelllinien zu binden (Smit et al., 2011). Bei dem Dengue-Virus konnte dies bereits untersucht werden. Verschiedene Bindungsfaktoren scheinen wesentlich für die rezeptorvermittelte Endozytose der Virionen mit der Zellmembran der Wirtszellen zu sein. Unter anderem scheinen clathrin-reiche Stellen (*clathrin coated pits*) eine Endocytose zu ermöglichen (M. Li et al., 2020; Smit et al., 2011). Die Virionen bewegen sich extrazellulär entlang der Zellmembran zu einem dortigen Rezeptor. Nach Bindung formen die zahlreichen zellulären clathrin-Proteine ein Vesikel um den Virion-Rezeptorkomplex. Das gebildete Vesikel wird in die Wirtszelle aufgenommen. Das sog. frühe Endosom gelangt als Spätendosom zur Membran des ER. Die clathrin-Schicht dissoziiert. Zusätzlich bewirkt der niedrige pH-Wert des Endosoms Konformationsänderungen der Viruspartikel. Die virale Membran fusioniert mit der des Endosoms und setzt das Kapsid mit den funktionellen Proteinen und der RNA frei. Innerhalb des ER vermehren Zellmechanismen die viralen Bestandteile. Verpackte, unreife Viruspartikel reichern sich im ER an. Nach Transport zum Golgi-Apparat folgen Prozessierungen bis zum äußeren trans-Bereich (Abb. 4). Die prM/E Komplexe werden durch das saure Milieu des Golgi-Aparats zu E-Homodimeren umstrukturiert. Das ermöglicht der Protease Furin das prM-Protein in seine pr- und M Bestandteile zu spalten. Das pr-Peptid dissoziiert in den extrazellulären Raum. Bislange hatte das pr-Protein diese Bindungsstelle blockiert, um eine zu frühe Prozessierung und Reifung zu verhindern. Das E Protein besteht aus 3 Domänen (ED1, ED2, ED3). ED1 (N-terminus tragend) bindet als strukturelle Domäne mit einer, bzw. vier Polypeptidketten, die ED2- und ED3-Domäne. ED2 initiiert die Fusion der viralen Membran mit der Wirtszelle. Vorangehende Bindung

des Zellrezeptors erfolgt durch die ED3-Domäne (Mukhopadhyay et al., 2005). Flaviviren wie das Zika-Virus beschreiten während ihres Replikationszyklus damit den sekretorischen Weg durch Endosomen und Vesikel vom ER und dem Golgi-Apparat zur Zellmembran der Wirtszelle.

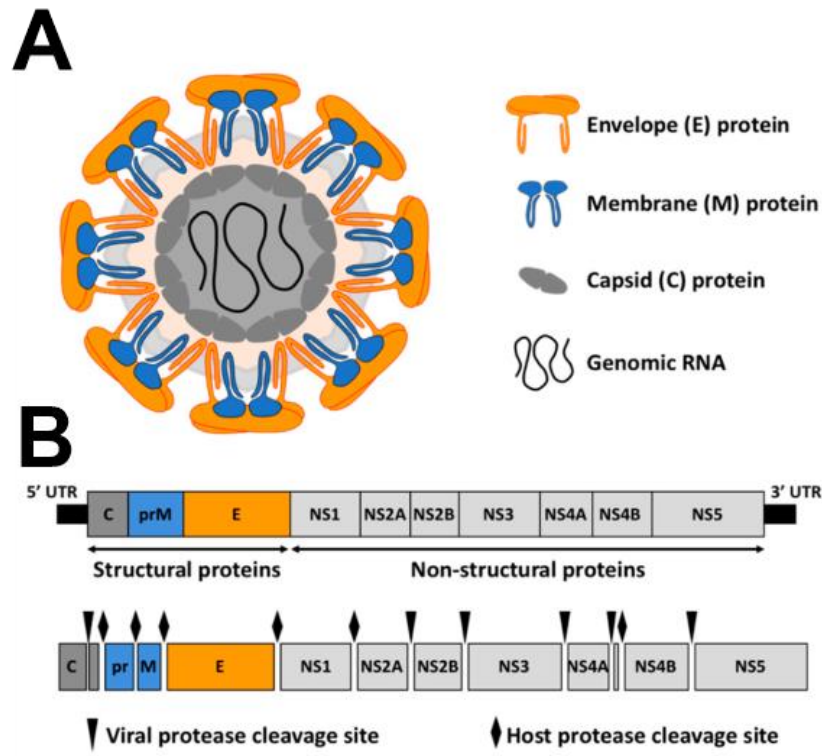


Abb. 3: Zika-Virion mit RNA-Genom.

- A:** Zweidimensionale Struktur eines gereiften Zika-Virions. Außen sind die Hüllproteinkomplexe der E und M Proteine abgebildet. Sie sind an die lipidhaltige Membran des ER der zuvor infizierten Wirtszelle gebunden. Darin eingehüllt befindet sich das von C-Proteinen zusammengesetzte Nukleokapsid mit dem viralen RNA-Genom.
- B:** Die Gensequenzen des Zika-Virus sind entlang des offenen Leserasters dargestellt. Der Translationsbereich beginnt am 5' Ende mit nicht- bzw. untranslatierten Regionen (UTR, untranslated region). Die drei strukturellen (C, prM und E) und nicht strukturellen (NS1 – NS5) Gene werden vom 5' Startcodon (hinter dem UTR) bis zum Stoppcodon vor dem UTR am 3' Ende zu einem Polyprotein translatiert. Wirtsspezifische und viruseigene Proteasen prozessieren das synthetisierte Polyprotein an den markierten Bindungsstellen (Rauten, Dreiecke).

Modifiziert aus: (Ávila-Pérez et al., 2018)

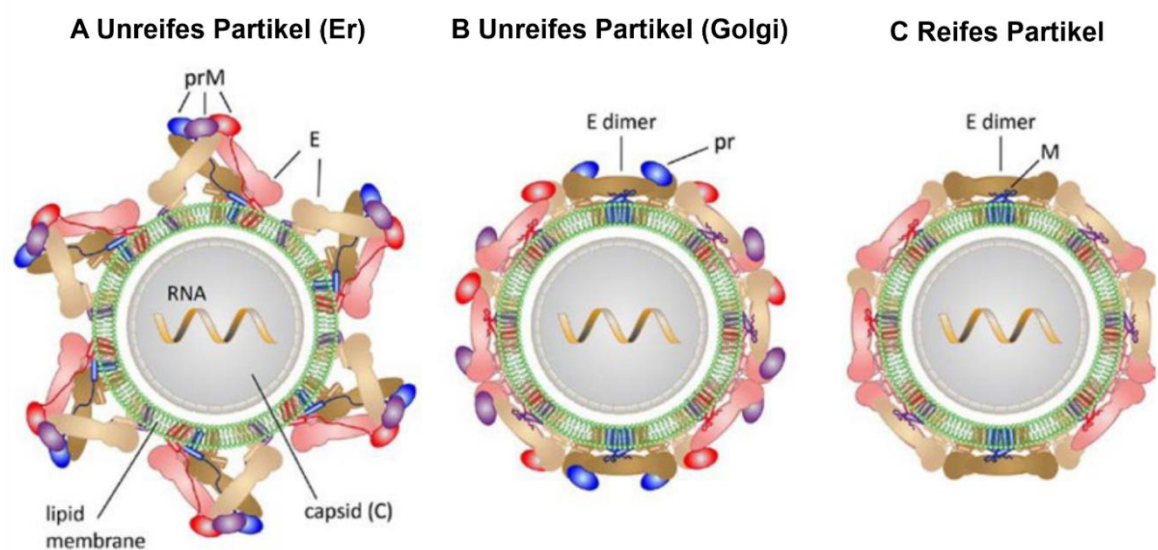


Abb. 4: Reifungsprozess des Zikavirus.

- A:** Ungereiftes Virion nach Anreicherung und Verpackung am ER. Eine Membran umschließt das innere Kapsid mit der dort lokalisierten RNA. Hüllproteine prM und E sind aufrecht gestellt an die Membran gebunden.
- B:** Ungereiftes Partikel nach Erreichen des Golgi-Apparats. Das pr-Peptid wird vom M-Protein gespalten. Die E-Hüllproteine lagern sich als Dimere durch induzierte Restrukturierung flach und parallel zur Membran an.
- C:** Gereiftes Virion. Nach Dissoziation des pr-Peptids befinden sich M- und E-Proteine im infektiösen Zustand.

Quelle: Abbildung modifiziert, (Rey et al., 2017).

1.6 Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen pseudotypisierte Viruspartikel hergestellt und für Infektionsexperimente eingesetzt werden. Die Hüllproteine prM/E des Zikavirus wurden mit etablierten Verpackungssystemen des HIV-1-Virus in drei experimentellen Abschnitten kombiniert. Die drei Teilabschnitte der Arbeit sind hier kurz beschrieben.

Das Zika-Plasmid pME-Z1 trägt die Gene der Hüllproteine des Zika-Isolats Dakar 41519. Virale Pseudotypen sollten mit einem 2-Plasmid-System bestehend aus dem HIV-1-Virusvektor pNL Luc AM und pME-Z1 hergestellt werden. Die hergestellten Pseudotypen sollten zur Infektion von VeroB4 und den beiden Glioblastom-Zelllinien Hg39 und U87 verwendet werden.

Vergleichend zu den Infektionsstudien des 2-Plasmid-Systems soll ein 3-Plasmid-System etabliert werden. Das Zika-Plasmid pME-Z1 soll zusammen mit dem Vektor psPAX2, sowie dem lentiviralen Vektor Lenti-luciferase-P2A-Neo zur Herstellung von Pseudotypen eingesetzt werden. Die Effizienz der Infektion von VeroB4-, U87- und Hg39-Zellen soll untersucht werden.

Im letzten Abschnitt soll ein neues 3-Plasmid-System zur Herstellung von Pseudotypen untersucht werden. Es sollen Pseudotypen basierend auf dem lentiviralen Vektor LentiCRISPRv2-mCherry, LentiCRISPRv2-CXCR4.1 und LentiCRISPRv2-CXCR4.2 hergestellt werden. Die entsprechenden Pseudotypen sollen für Infektionsstudien der drei Zelllinien VeroB4, U87 und Hg39 eingesetzt werden. Zur Kontrolle und zum Vergleich der Infektiosität der Zika-Pseudotypen sollen Pseudotypen mit dem VSV-G Hüllprotein des VSV-Virus hergestellt und benutzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Zentrifugenröhrchen 50 ml	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
Einwegspritzen	B. Braun Melsungen AG
Sterican Kanülen Gr. 1	B. Braun Melsungen AG
Klebeband für Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Zellkulturflaschen TC-T25	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
Zellkulturflaschen TC-T75	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
Zellkulturplatten 6-well	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
Zellkulturplatten 24-well	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
LumiNunc F96 MicroWell-Platten	ThermoFisher Scientific, 136102
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht

2.2 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Pipetten Mikroman	Gilson
Analysewaage KB1200-2	KERN & SOHN GmbH; Balingen
Bunsenbrenner CV 470 Plus	Camping Gaz GmbH; Hungen-Inheiden
Elektrophoresekammer	Gibco BRL
Inkubator INE500	Memmert GmbH & Co. KG
Inkubator CB 150	BINDER GmbH; Tuttlingen
Magnetrührer IKAMG RCT	IKA Werke GmbH & Co. KG
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
Mikroskop Diavert	Leitz; Wetzlar
Mikroskop Axio Imager 2	Carl Zeiss AG; Oberkochen
pH-Meter CG 840	Schott AG; Mainz
Rollinkubator	New Brunswick; USA
Schüttelinkubator 3031	GFL Burgwedel
Spektralphotometer NanoDrop	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Sterilwerkbank AterilGard III	The Baker Company Sanford; Maine, USA

2.3 Chemikalien und Reagenzien

2.3.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Adenosinmonophosphat	Carbolution chemicals GmbH; Ingbert
Adenosintriphosphat	Carbolution chemicals GmbH; Ingbert
Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH; Oldendorf
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Butanol	Merck KGaA; Darmstadt
Caesiumchlorid	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA
Chloroquindiphosphat Salz	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA
Dithiothreitol	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
d-Luciferin	Cayman chemicals company; USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA
Ethylendiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Merck KGaA; Darmstadt
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natronlauge	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethane	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA
Trypton	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe

2.3.2 Reagenzien

<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Coenzym A	Carbolution chemicals GmbH; Ingbert
EcoRI-HF, Xho-I	NEB GmbH; Ipswich, USA
GeneRuler 1 kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
ScreenFect A Reaqgenz	Incella GmbH; Eggenstein-Leopoldshafen
Trypsin-EDTA Lösung	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach

2.4 Plasmide

<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
pNL Luc AM	J.P.Moore; USA
pME-Z1	entspr. pME-Z41519 (Kadlubowska, 2019)
psPAX2	Addgene plasmid #12260
pMD2.G	Addgene plasmid #12259
Lenti-luciferase-P2A-Neo	Addgene plasmid #105621
LentiCRISPRv2-mCherry	Addgene plasmid # 99154
LentiCRISPR-CXCR4.1	# 99154 + gRNA (Kretschmer, 2017)
LentiCRISPR-CXCR4.2	# 99154 + gRNA (Kretschmer, 2017)
pHA-USU-BH65	BNITM (Kadlubowska, 2019)
pME-USU-BH85	identisch mit pHA-USU-BH85

2.5 Zelllinien

<u>Beschreibung</u>	<u>Herkunft</u>
HEK293T	CRL-11268, Friedrich-Löffler Institut
VeroB4	ACC-33 DSMZ; Braunschweig
Hg39	BNITM, T. Jacobs
U87	BNITM, NIH AIDS Reagent Program

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Medien und Agarplatten

Die Substanzen der verwendeten Medien wurden mit einer Feinwaage eingewogen und in einer Schottflasche auf einen Liter mit doppeltdestilliertem Wasser (ddH₂O) aufgefüllt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle Medien vor Gebrauch 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Nach Abkühlung wurden 4 ml sterilfiltriertes thermoinstabiles Ampicillin (60 g/l) einem Liter Medium zugegeben, und dieses in sterile Petrischalen gegossen. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank (37 °C) konnten Kontaminationen visuell auf unbewachsenen Agar-Platten ausgeschlossen werden. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

2.6.2 Kultivierung von *Escherechia coli*

Bakterienkulturen des *E. coli* Stammes DH5 α wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft. Zur Vermeidung von Kultivierung anderer Bakterienstämme wurden zunächst Zellen einer Flüssigkultur auf einer Agar-Platte ausgestrichen (YT-Medium). Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C waren vereinzelt Kolonien gewachsen. Das gezielte Abnehmen einer Einzelkolonie wurde dadurch möglich. Anschließend wurden 200 ml von z.B. YT-Medium in einen Schüttelkolben vorgelegt, und dieser mit einer isolierten Einzelkolonie angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Schüttelinkubator über Nacht. Das Medium der Agarplatte und des Kolbens enthielt das Antibiotikum Ampicillin. Dadurch konnte das gezielte Kultivieren von zuvor transformierten *E. coli* DH5 α mit der entsprechend hinzugefügten Resistenz sichergestellt werden.

2.6.3 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung von chemokompetenten *E. coli*-DH5 α -Bakterien wurde die etablierte CaCl₂-Methode angewendet. Eine Einzelkolonie von einer Agar-Platte wurde in ein Kulturröhrchen mit 3 ml YT-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C in einer Rollertrommel inkubiert. Zum Animpfen einer 100 ml Kultur (YT-Medium) wurde am nächsten Tag daraus 1 ml entnommen. Bei 37 °C und 180 rpm wurde die optische Dichte (OD) der Bakterien gemessen, bis diese eine OD₆₀₀ = 0,4 aufwies. Nach 10 min abkühlen auf Eis wurden die Zellen 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen und das Zellpellet in 40 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung (sterilfiltriert) resuspendiert. Es folgten 5 min Inkubation auf Eis und ein weiterer

Zentrifugationsschritt (15 min, 4 °C, 5000 rpm). Das Zellpellet wurde in 2 ml kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und über Nacht auf Eis gelagert. Am dritten Tag wurden zur Vermeidung von Eiskristallen 2 ml 50 %iger Glycerin-Lösung hinzupipettiert. Aliquots von 200 µl wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -70 °C gelagert.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 DNA-Extraktion durch Caesiumchlorid-Maxi-Präparation

Für die Transfektionen und Infektionen wurden pseudotypisierte Viruspartikel verwendet. Für deren Herstellung wurde Plasmid-DNA mit der CsCl-Methode in großem Maßstab isoliert. Zu Beginn wurden 200 ml autoklaviertes, herkömmlich genutztes dYT-Medium (4 ml Ampicillin (60 g/l)) in einem Schüttelkolben vorgelegt. Mit einer Einzelkolonie transformierter *E. coli* Zellen (siehe 2.6.1) wurde angeimpft (Kultivierung über Nacht, 37 °C und 180 rpm). Nach Zentrifugation des Mediums (15 min, 10.000 rpm) und Verwerfen des zellfreien Überstandes wurde das Zell-Sediment in 5 ml Lösung-1 resuspendiert (siehe unten). Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte nach Überführung in 50 ml Falconröhrchen durch Zugabe von 10 ml Lösung-2 und mehrmaliges Invertieren (Inkubation bei RT, 5 min). Anschließend erfolgte eine Neutralisation durch Zugabe von 7,5 ml saurer Lösung-3, mehrmaliges Invertieren und Inkubation auf Eis (10 min). Die Abtrennung der Zellrückstände erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 8.000 rpm, 4 °C) und Filterung des Überstandes mit Filterwatte aus Messpipetten. Zur Fällung der DNA wurden den Proben 0.7 Vol. Isopropanol zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 20 min bei 4000 g zentrifugiert (RT). Während eines Waschschriffs wurde das Zellsediment mit 10 ml Ethanol (70 %) resuspendiert, zentrifugiert (5 min, 4000 g) und in 4 ml TE-Puffer gelöst. Zur Isolierung der Plasmid-DNA von den restlichen Bestandteilen erfolgte eine Zugabe von 4,9 g Caesiumchlorid (CsCl) und 150 µl Ethidiumbromid (EtBr, 10 mg/ml). Mithilfe einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle wurde die gelöste Probe in ein Quick-Seal-Röhrchen überführt, das Gewicht aller Proben auf ± 50 mg austariert. Die Röhrchen wurden mithilfe eines Schweißgerätes drucksicher verschlossen. Zur Isolierung der Plasmid-Bande erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation in einer Ultrazentrifuge über Nacht bei 70.000 rpm (25 °C). Genomische DNA, RNA und Plasmid-DNA trennten sich aufgrund des Dichtegradienten in drei Phasen auf (Abb. 5). Die Entnahme der mittleren Plasmid-Bande erfolgte durch

Verwendung einer Spritze mit Kanüle. Das einmalige Durchstechen an einer Stelle im oberen Bereich des Röhrchens zu Beginn vermied einen Unterdruck. Anschließend wurde das Röhrchen unterhalb der Plasmid-Bande durchstoßen, und die Plasmid-DNA aufgesogen. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß wurde das restlich enthaltene EtBr durch drei Waschschriffe isoliert. Dazu wurden je 500 µl n-Butanol zugegeben, gevortext, 2 min inkubiert und die untere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Präzipitation erfolgte über Nacht (-20 °C) nach Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaOAc und 2 Vol. Ethanol (97 %). Anschließend wurde die DNA während 20-minütiger Zentrifugation (10000 rpm, RT) sedimentiert. Das Plasmid-DNA-Sediment wurde zwei Mal mit 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und in 200 µl doppeldestilliertem Wasser gelöst. Vor der Lagerung bei -20 °C erfolgte eine Inkubation bei 72 °C für 10 min zur Lyse möglicher Desoxyribonukleasen.

<u>Lösung 1:</u>	<u>Lösung 2:</u>	<u>Lösung 3:</u>	<u>TE-Puffer:</u>
50 mM Glucose	0,2 M NaOH	3 M Kaliumacetat	10 mM Tris (pH 7,5)
10 mM EDTA 1 % SDS		2 M Essigsäure	1 mM EDTA
25 mM Tris-HCl (pH 8,0)			

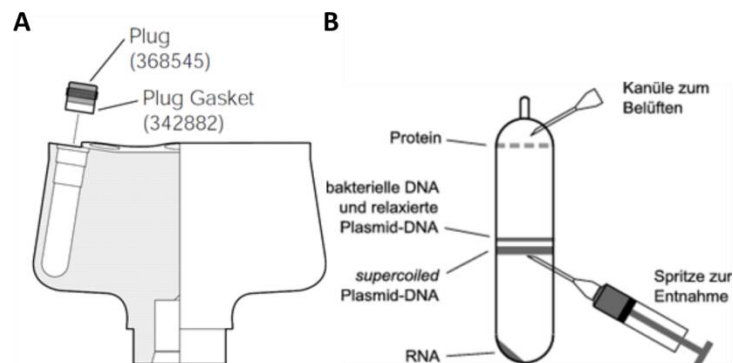


Abb. 5: Graphische Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation

- A:** Zeichnung des verwendeten NVT90-Rotors. Aufgrund des Neigungswinkels und des CsCl-Dichtegradienten trennt sich genomische- von Plasmid-DNA.
- B:** Zentrifugenröhrchen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die superspiralisierte Plasmid-DNA reichert sich als Bande unter der bakteriellen genomischen-DNA an. Die Entnahme der Plasmid-DNA erfolgte wie beschrieben mit Hilfe einer Kanüle.

(Quellen: A: NVT-90-Beckman-Rotor-Handbuch, B: (Müllhardt, 2009))

2.7.2 Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA

Zur Aufkonzentrierung der extrahierten Plasmid-DNA wurde eine Ethanol-fällung angewendet. Die DNA-haltige Probe wurde dazu mit 2 Vol. 98 %igem Ethanol und 1/10 Vol. 3 M NaOAc versetzt. Die DNA wurde über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefällt. Der Überstand wurde nach 20 min Zentrifugation (20 min, 10000 rpm, RT) verworfen und die pelletierte DNA zweifach mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde in 50-200 μl ddH₂O gelöst. Anhand folgender Bestimmung der DNA-Konzentrationen konnten Verdünnungen einer Sollkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA in ddH₂O angesetzt werden.

2.7.3 Restriktionsendonukleasespaltung

Durch Verwendung von Restriktionsendonukleasen ist es möglich gezielt DNA-Fragmente aufzutrennen. Diese Enzyme binden spezifisch Gensequenzen und hydrolysieren die DNA-Fragmente. In einem 30 μl Ansatz wurden 2 μl DNA (1 mg/ml), 24,5 μl ddH₂O und 3 μl eines Probenpuffers verwendet. Der Probenpuffer wurde nach Herstellerangaben für das jeweilige Enzym ausgewählt. 0,5 μl des Enzyms (NewEnglandBioLabs) wurden letztlich hinzu pipettiert und 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Bei Anwendung von 2 Restriktionsenzymen während einer Restriktion wurde ein entsprechender Puffer des Herstellers ausgewählt, der für beide Enzyme eine möglichst hohe Effizienz ermöglicht. Zur Analyse konnten die Gen-Fragmente durch ein Agarose-Gel aufgetrennt werden. Dazu wurde der gesamte Ansatz mit 8 μl 6x-Ladepuffer auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um DNA-Fragmente zu analysieren oder ggf. weiter zu sequenzieren wurde die herkömmliche Methode Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Dabei werden diese angefärbt und durch Anlegen eines elektrischen Feldes anhand ihrer Größe beim Durchlaufen einer Agarose-Matrix aufgetrennt.

Das 0,8 %ige Agarose-Gel wurde durch Aufkochen von 0,8 g Agarose (Biozym) in 100 ml 1 x TAE-Puffer in einer Mikrowelle gelöst. Vor dem Ausgießen kühlte die Lösung auf $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ab. 2 μl EtBr (2,5 mg/ml) als DNA-Färbemittel wurden auf den Gelschlitten pipettiert. Die noch flüssige Agarose-Lösung wurde in das Gelbett im Gelschlitten gegossen. Ein eingesetzter Kamm wurde nach Erstarren des Gels entfernt, wodurch Probentaschen im Gel entstanden. Das Agarosegel wurde mit dem Gelschlitten in eine

Elektrophoresekammer gelegt und anschließend mit 1 x TAE-Puffer bedeckt.

Vor Anlegen der Spannung wurden die Proben als Ansatz mit ddH₂O und 6-fach-Ladepuffer in die Geltaschen pipettiert. Zum Größenvergleich der DNA-Fragmente wurde der 1 kb Größenstandard „GeneRuler™ 1 kb DNA Ruler“ verwendet. Die Elektrophorese lief mit 100 V für 1 h. Zur Analyse wurden die Banden unter UV-Licht betrachtet und fotografisch gespeichert.

2.8 Zellbiologische Methoden

2.8.1 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurde diese zunächst in chemokompetente Bakterienzellen (*E. coli* DH5 α) transformiert. Dazu wurde die bewährte Hitzeschock-Methode angewandt. Die *E. coli* DH5 α -Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1,5 μ l (1 μ g/ μ l) DNA folgte eine Inkubation von 30 min auf Eis. Durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden und 2 min Abkühlung auf Eis wurde die Plasmid-DNA in die Zellen eingebracht. 800 μ l LB-Medium wurden zugegeben und anschließend 45 min bei 37 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Zuletzt wurden zum Ausstreichen 150 μ l mittig auf die LB-Agar-Platten pipettiert und ein zuvor desinfizierter Spatel verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Ausschließlich erfolgreich transformierte Bakterien enthielten des fremde Resistenzgen für das im Medium vorhandene Ampicillin. Folglich waren nach der Inkubation lediglich transformierte Bakterienzellen mit dem eingebrachten Plasmid auf der Agar-Platte gewachsen.

2.8.2 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Verschiedene eukaryotische Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen mit supplementiertem RPMI- oder DMEM-Medium kultiviert. Zugewetztes Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) in den verwendeten Medien ermöglicht mit dem konstant geregelten CO₂ Gasgehalt im Zellinkubator einen gepufferten pH-Wert der Medien. Dieser wird farblich durch enthaltenes Phenolrot angezeigt. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen je nach Zelldichte im Abstand von 3-5 Tagen rekultiviert. Nach einem Waschschrift mit d wurden die adhären angewachsenen Zellen dazu abgelöst. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA-Lösung 5 min inkubiert und anschließend mit etwas

Medium abgespült. Zur Rekultivierung wurde die Zellsuspension in frischem Medium verdünnt und erneut in einer Zellkulturflasche ausgesät.

2.8.3 Transfektion von HEK293T-Zellen

Für ein optimales Transfektionsergebnis wurden die Zellen vor dem ersten Versuchstag in einer 24-well-Platte ausgesät und solange kultiviert (37 °C, 5 % CO₂), dass zu Beginn 80 % der 24-well-Platte von Zellen bedeckt war. Die Medien und Reagenzien wurden bei 4 °C gelagert und vor Versuchsbeginn unter der Sterilwerkbank auf Raumtemperatur gebracht. Für den Luciferase-Nachweis wurden Plasmide nach Erfahrungswerten der Laborgruppe Schreiber (Kretschmer, Kadlubowska) im ersten Ansatz mit ScreenFect-A *dilution-buffer* auf 40 µl verdünnt. Die Reaktionsansätze sind in Tabelle 1 aufgelistet. Der zweite Ansatz enthielt je 20 µl ScreenFect-A *dilution-buffer* und die Transfektionsreagenz ScreenFect-A (SFA). Der zweite Reagenzienansatz wurde langsam in mehreren Schritten zu 6 µl mittig auf die Plasmidmischung (Ansatz 1, Tab. 1) pipettiert, und vorsichtig mit der Pipettenspitze eingerührt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die 24-well-Platte mit den Zellen aus dem Brutschrank genommen und das Zellkulturmedium verworfen. Die Transfektion erfolgte durch Vorlegen von 420 µl DMEM-Medium (10 % FCS) je well. Danach wurde je well die 80 µl der Plasmid/ScreenFect-A-Mischung gegeben. Nach einer weiterer Inkubation (37°C, 5 % CO₂) für 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit 1 ml DMEM (10 % FCS).

Die Pseudotyp, bzw. Viruspartikel enthaltende Zellkulturüberstände wurden nach insgesamt 48 h abgenommen. Dabei abgelöste oder im Zellkulturüberstand enthaltene Zellen wurden abzentrifugiert (Eppendorf Mikrozentrifuge, 10000 rpm, 5 min). Die zellfreien Zellkulturüberstände wurden bei 4 °C bis zur folgenden Infektion gelagert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die adhärent angewachsenen HEK293T-Zellen zunächst mit PBS gewaschen (1 ml). Mittels Zugabe von 50 µl Trypsin/EDTA je 24-well (5 min Inkubation, RT) und anschließendes Spülen mit PBS (1 ml) wurden die Zellen abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (10 min, 10.000 rpm, RT) wurden die Zellen bei –20 °C bis zur Luciferase-Messung gelagert.

Tab. 1: Transfektionsansätze für 24-well Zellkulturplatten*

Ansatz 1	<u>1 Plasmid</u>	<u>3 Plasmide</u>	<u>1 Plasmide</u>	<u>3 Plasmide</u>
pNL Luc AM	2,5 µl	2,5 µl	---	---
pME-Z1	---	12,5 µl	12,5 µl	---
pME-USU-BH85	---	---	---	12,5 µl
psPAX2	---	---	5,0 µl	5,0 µl
Lenti-luciferase-P2A-Neo	---	---	2,5 µl	2,5 µl
<u>Dilution-buffer</u>	<u>37,5 µl</u>	<u>25,0 µl</u>	<u>20,0 µl</u>	<u>20,0 µl</u>
Gesamtvolumen	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl
Ansatz 2				
ScreenFect-A				
<u>-dilution-buffer</u>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>
<u>-reagenz</u>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>	<u>20 µl</u>
Gesamtvolumen	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl

*, es wurden ein, zwei- und drei Plasmid-Kotransfektionen durchgeführt. Plasmide mit prM/E-Hüllproteinen des Zikavirus (Z41519) und Usutuvirus BH85 wurden verwendet.

Einige Plasmide enthielten nicht das Luciferase-Gen als Reporter sondern das mCherry Gen. Wie beschrieben wurde die Transfektion bei der Verwendung von mCherry Plasmiden in 8er-Zellkammern auf einem Glasobjektträger (*chamber slides*) durchgeführt. Wegen dem kleineren Volumen der Kammern entsprachen die Volumina des 8er-Ansatzes der Hälfte der 24-well-Ansätze für Zellkulturplatten (Tab. 2). Nach 48 h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände entnommen und die Zellen mittels Trypsin/EDTA abgelöst. In eine 8-er Zellkammer transferiert, wuchsen diese über Nacht adhärent an die beschichtete Glasoberfläche an. Dadurch konnten sie anschließend mit PBS gewaschen und mit 50 µl 4,6-Diamidino-2-phenylindol- (DAPI)-Lösung (300 nM) angefärbt werden. Die Färbelösung wurde verworfen, die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und das Zellkammergehäuse wurde danach von dem Objektträger entfernt. Durch Anregung mit einem Fluoreszenzmikroskop konnten mit DAPI-gefärbte Zellkerne und exprimiertes mCherry-Protein sichtbar gemacht werden.

Tab. 2: Transfektionsansätze für den mCherry Fluoreszenznachweis*

Ansatz 1	24-well-Zellkulturplatten		8er-Zellkammern	
	1 Plasmid	3 Plasmide	1 Plasmide	3 Plasmide
Lenti CRISPRv2-				
-mCherry	}	2,5 µl	1,25 µl	1,25 µl
--CXCR4.1				
--CXCR4.2				
pME-Z1	---	12,5 µl	---	6,25 µl
psPAX2	---	5,0 µl	---	2,50 µl
Dilution-buffer	37,5 µl	20,0 µl	18,75 µl	10,00 µl
Gesamtvolumen	40,0 µl	40,0 µl	20,00 µl	20,00 µl
Ansatz 2				
ScreenFect-A				
- <i>dilution-buffer</i>	20,0 µl	20,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
- <i>reagenz</i>	20,0 µl	20,0 µl	10,0 µl	10,0 µl
Gesamtvolumen	40,0 µl	40,0 µl	20,0 µl	20,0 µl

*, es wurden in 24-well-Zellkulturplatten und 8er-Zellkammern (chamber slides) Trans- bzw. Koftransfektionen mit einem oder drei Plasmiden durchgeführt.

2.8.4 Infektion eukaryotischer Zelllinien mit viralen Pseudotypen

Eukaryotische Zellen können mit partikelhaltigen Zellkulturüberständen aus Transfektionen infiziert werden. Infizierungen wurden mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln aus den Zellkulturüberständen der durchgeführten Transfektionen durchgeführt. In 96-well-Platten (Sarstedt) wurden 100 µl der Zelllinien VeroB4 (Nierenzellen Grüner Meerkatzen), HG39 und U87 (menschliche Gliosblastom Zelllinien) in supplementiertem RPMI-Medium (enthält 10 % FCS) ausgesät. Zuvor wurden diese dicht bewachsen von Zellkulturflaschen (Sarstedt) abgelöst und in RPMI-medium aufgenommen. Bezogen auf 200 µl Endvolumen wurden durch Zugabe der jeweiligen Zellkulturüberstände

entsprechende Verdünnungen in den Zellkulturplatten angesetzt. Dazu wurden aus den ersten Verdünnungen stetig 100 µl in die nächstgelegenen Wells transferiert. Dadurch enthielt jedes Well 100 µl zellhaltiges Medium und Zellkulturüberstand aus den Transfektionen. Die Infektion der Zellen erfolgte über 3 Tage im Brutschrank (CB 150) bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Erfolg der Infektion wurde mit dem Luciferase-Assay analysiert.

2.8.5 Luciferase-Assay

Die Effizienz der Transfektionen wurde mithilfe des Luciferase-Assays bestimmt. Die verwendeten Zelllinien VeroB4, Hg39 und U87 wurden mit pseudotypisierten Partikeln infiziert. Die Effizienz der Infektionsexperimente wurde ebenfalls mit dem Luciferase-Assays bestimmt.

Einige Plasmid-Kombinationen bei der Transfektion enthielten das Gen für das Enzym Luciferase. Das synthetisierte Enzym bildet die Grundlage für die lichtemittierende Reaktion des Luciferase-Assays (Abb. 6). Bei diesem wurden aufgetaute Zellen aus der Transfektion mit 100 µl Lysepuffer für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden diese in eine unbeschichteten 96-well-Platte vorgelegt. Analog wurde das Medium der Infektionsproben verworfen und die Zellyse ebenfalls durch Zugabe des Lysepuffers erreicht. Im Verhältnis 1:1 wurden 100 µl Luciferase-Puffer in die Kavitäten der 96-well-Platte pipettiert. Anschließend wurde für 5 Sekunden ein einzelnes Well mit dem Mikroplattenluminometer Centro LB 960 und dem Programm MikroWin2000 gemessen. Dabei werden sog. RLU/s (Lichtimpulse, relative light units) von dem integrierten Detektor erfasst. Die Anzahl der gemessenen RLU/s hängt maßgeblich von den vorhandenen Luciferase-Enzymen in der Probe ab. Sie ist der Menge des emittierten Lichtes proportional. Die Lichtemissionen werden aufgrund der Umsetzung des d-Luciferins in dem Luciferase-Puffer zu Oxiluceferin hervorgerufen.

Zur Untersuchung der Transfektions- und Infektionseffizienz der verschiedenen Plasmid-Kombinationen, wurde der hier verwendete Luciferase-Puffer zunächst mit der kommerziellen Bright-GloTM-Reagenz verglichen. Das Ziel waren vergleichbare Messergebnisse zu der Bright-GloTM-Reagenz zu generieren. Neben der Zusammensetzung nach (Quelle: GoldBio d-Luciferin *in vitro* Protocol) wurden dazu einige Variationen der Zusammensetzung vorgenommen. Neben dem doppeltdestillierten Wasser stellte das TRIS-HCl eine puffernde Wirkung sicher. Das enthaltene MgCl₂ sowie ATP ermöglichen die stattfindende Enzymreaktion der Luciferase. Das Coenzym A soll ein rapides Ende der Enzymreaktion verhindern und eine längere Lichtemission ermöglichen. Nach Auftauen

auf Raumtemperatur konnten die Substanzen entnommen und mit einer Feinwaage abgemessen in vorgelegtem ddH₂O gelöst werden. Nach Auffüllen auf 50 ml wurde der angesetzte Puffer lichtgeschützt bei -20 °C in Reaktionsgefäßen bis zur Verwendung gelagert. Aufgelistet sind die Konzentrationen der Substanzen des Luciferase-Puffers. Die Substanzen und angesetzter Puffer (zusätzlich lichtgeschützt) wurden bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Angepasster GoldBio-Luciferasepuffer:

100 mM	TrisHCl
5 mM	MgCl ₂
11,5 mM	AMP
250 µM	CoA
150 µM	ATP
7,5 mg	d-Luciferin
auffüllen auf 50 ml	ddH ₂ O

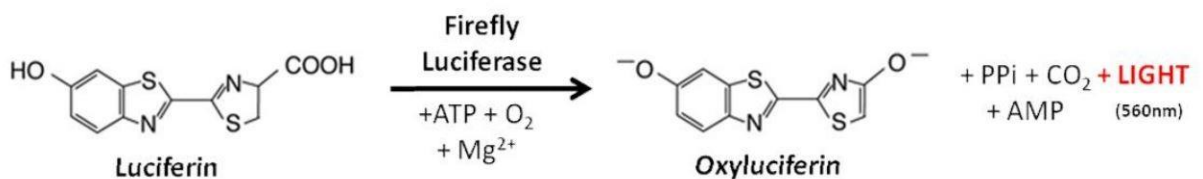


Abb. 6: Reaktionsschema der lichtemittierenden Luciferase-Reaktion

Während des Luciferase-Assays wird das zugegebene d-Luciferin in der Probe zu Oxyluciferin und den Nebenprodukten AMP, Kohlenstoffdioxid und emittiertes Licht umgesetzt. Katalysiert wird die Reaktion durch Luciferase-Enzyme in der Probe mittels Co-Faktoren ATP, Sauerstoff und Magnesiumionen.

Quelle: <https://www.goldbio.com/articles/article/a-crash-course-on-luciferase-assays>

2.8.6 Fluoreszenzmikroskopie (mCherry-Nachweis)

Einige der verwendeten Plasmide (pLenti CRISPR V2-mCherry) trugen kein Gen zur Synthese des Luciferase-Enzyms. Anstatt des Luciferase-Assays wurde die Effizienz der Transfektion und Infektion mittels Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Plasmide LentiCRISPR-CXCR4.1, LentiCRISPR-CXCR4.1 und LentiCRISPRv2-mCherry beinhalten Gene zur Synthese des herkömmlich verwendeten mCherry Leuchtproteins. Die Transfektion wurde wie beschrieben mit ScreenFect-A-Reagenz in einer 24- und zusätzlich acht Kavitäten fassenden Zellkammer durchgeführt. Deren Oberflächen sind für adhären wachsende Zellen vorbehandelt. Die Infektion der VeroB4 Zellen erfolgte ebenfalls in einer 8-well-Zellkammer. Zur Visualisierung wurden die Zellen nach Beendigung des Experiments zwei Mal mit 100 µl PBS Puffer gewaschen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch 5 min abgedunkelte Inkubation mit 100 µl 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (300 nM) bei RT. Anschließend wurde diese durch erneutes zweimaliges waschen mit PBS-Puffer entfernt und die Zellkammer von dem Objektträger mithilfe der mitgelieferten Schablone entfernt. Die Zellen wurden unter blauem (DAPI-Lösung) und rotem (mCherry-Protein) Fluoreszenzlicht mikroskopiert.

3 Ergebnisse

3.1 Produktion und Charakterisierung der Plasmide für die Herstellung der Pseudotypen

In dieser Arbeit wurden acht verschiedene Plasmide verwendet, um prM/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel herzustellen (siehe 2.4). Für die geplanten Versuche musste die Plasmid-DNA zunächst in größerem Maßstab produziert werden (0,5-1 mg). Dazu wurden die Plasmide mittels der Hitzeschock-Methode in chemokompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien transformiert. Durch eine CsCl-Maxipräparation aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit der Methode der Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 7). Ziel war es eine möglichst hohe Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhalten. Die Ausbeute an Plasmid-DNA fiel unterschiedlich hoch aus. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDropTM 2000/2000c Photometer gemessen. Aus 200 ml einer Bakterienkultur wurden etwa 400 μ l wässrige DNA-Lösung erhalten. In der Regel lag die DNA-Konzentration zwischen 1 μ g/ μ l und 3,5 μ g/ μ l. Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 1 μ g/ μ l konnten daher in größerem Maßstab angesetzt werden. Aufgrund der vorliegenden DNA-Ausbeute erfolgten nur wenige Aufkonzentrierungen anhand von Ethanol-fällungen, sofern die Plasmid Aufreinigung 500-900 ng/ μ l betrug. Die Reinheit der Plasmide und deren Fragmentgröße wurde anhand eines Agarosegels mit den Literaturwerten verglichen und stimmten wie erwartet überein.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Restriktionsendonukleasespaltungen durchgeführt. Hier wurde beispielhaft das pNL Luc AM-Plasmid anhand von Restriktionsenzymen geschnitten. Den Plasmidschemata (siehe Anhang) sind neben den Genregionen auch die Fragmentgrößen der Plasmide, sowie die Bindungsstellen der Restriktionsenzyme zu entnehmen. Das unverdaute Plasmid zeigte die erwartete superspiralisierte- und lineare-Form. Das Schneiden durch beide Enzyme resultierte in den erwarteten DNA-Fragmenten.

Alle verwendeten Plasmide wurden außerdem durch partielle DNA-Sequenzierungen bestätigt (LGC-Genomics, Berlin).

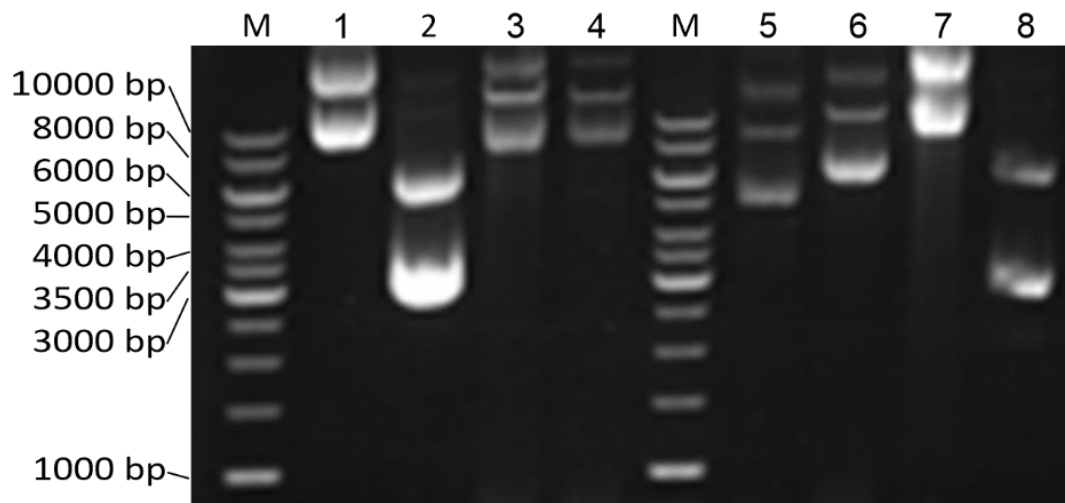


Abb. 7: Agarose-Gelelektrophorese der verwendeten Plasmide

Die Plasmid-Proben wurden nach der CsCl-Maxipräparation aufgetragen. Der Fragmentgrößenvergleich erfolgte anhand eines kommerziellen DNA-Größenstandards (GeneRuler™ 1 kb). Die Elektrophorese lief eine Stunde bei einer Spannung von 100 Volt. Probenansatz: 3 μ l Probenpuffer, 2 μ l ddH₂O, 1 μ l Plasmid-DNA, DNA-Größenstandard 10 μ l

M	Marker, GeneRuler™ 1 kb		
1	pNL Luc AM	Größe	12,4 kb
2	pME-Z1	Größe	5,3 kb
3	LentiCRISPRv2-CXCR4.1	Größe	15,0 kb
4	LentiCRISPRv2-CXCR4.2	Größe	15,0 kb
5	Lenti-luciferase-P2A-Neo	Größe	8,8 kb
6	psPAX2	Größe	10,7 kb
7	LentiCRISPRv2-mCherry	Größe	15,0 kb
8	pME-USU-BH85	Größe	5,3 kb

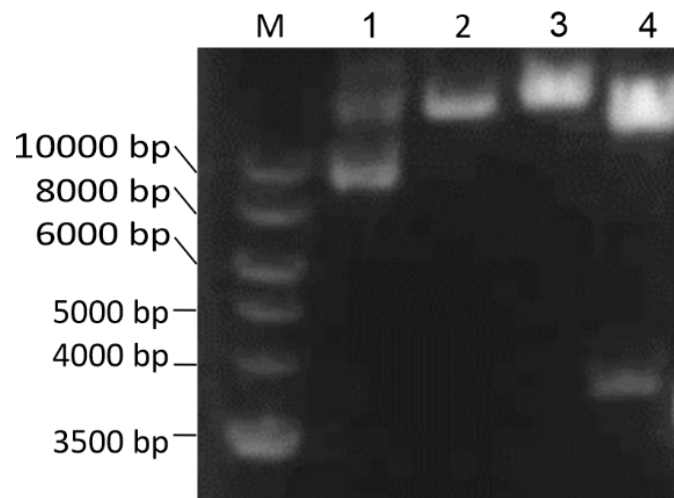


Abb. 8: Restriktionsverdau des HIV-1-Plasmids pNL Luc AM

Das Plasmid wurde mit zwei Restriktionsenzymen von NEB verdaut. Der Ansatz mit beiden Verdauungsenzymen resultierte in den erwarteten zwei Fragmenten der Größe 3810 bp und 10614 bp (Nummer 4). Der Fragmentgrößenvergleich erfolgte durch den DNA-Marker GeneRuler™ 1 kb. Dauer Elektrophorese: Eine Stunde, Spannung: 100 Volt, Probenansatz: 1 µl DNA, 3 µl Puffer, 0,5 µl Restriktionsenzym, 25,5 µl ddH₂O, gesamter Ansatz aufgetragen mit 8 µl Probenpuffer

M	Marker, GeneRuler™ 1 kb
1	pNL Luc AM ohne Puffer, Größe 12,4 kb
2	pNL Luc AM, Eco RI, KpnI geschnitten
3	pNL Luc AM, Xho I geschnitten, Puffer 3.1 (NEB)
4	pNL Luc AM, Eco RI, Xho I geschnitten, Puffer 2 (NEB)

3.2 Etablierung eines Puffers zum Luciferase-Nachweis

Die Anzahl vorhandener Luciferase Enzyme in zu untersuchenden Proben kann mit dem Luciferase-Assay durch RLU/s gemessen werden. Für die Auswertung der Transfektionen und Infektionen wurde dazu zunächst die kommerziell genutzte Bright-GloTM-Reagenz mit dem angesetzten Luciferase-Puffer verglichen. Der Luciferase-Puffer basiert auf der Beschreibung von Quelle (GoldBio d-Luciferin in vitro protocol). Während die Bright-GloTM-Reagenz zusätzlich zur Fluoreszenz eine Zellyse ermöglicht, muss vor dem Gebrauch des Luciferase-Puffers ein Puffer zur Zellyse hinzugegeben werden. Die Zellyse setzt die in den Zellen vorhandene Enzyme frei und ermöglicht so die Messung. Eine Besonderheit der Bright-GloTM-Reagenz liegt in der Halbwertszeit der Fluoreszenzmessung. Die Lichtemissionen nehmen anhand Herstellerangaben um 10 % je 5 min seit Zugabe der Reagenz ab (Promega). Mit diesem konstanten Verlauf sind vergleichbare Messungen über mehrere Minuten in einer 96-Kavitäten fassenden Well-Platte mit einem Plattenluminometer durchführbar. Das Ziel war es, möglichst konstante und reproduzierbare Messungen über mehrere Minuten mit dem angesetzten Luciferase-Puffer durchführen zu können.

Für die Messungen wurde der Bright-GloTM-Puffer nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst taute dieser auf Raumtemperatur auf, bei der alle Messungen stattfanden. 100 µl Bright-GloTM-Puffer wurden im Verhältnis 1:1 zu den Zellen mit Medium zugegeben. Um die vollständige Zellyse mit resultierender Freisetzung der in den Zellen expremierten Luciferase-Enzymen zu gewährleisten, erfolgte die Messung nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Alternativ wurde bei dem angesetzten Luciferase-Puffer das Medium von den Zellen entnommen und 100 µl Lysepuffer hinzupipettiert. Nach 10 min Inkubation erfolgte die Zugabe des Luciferase-Puffers und die Messung.

Die angegebene Zusammensetzung von GoldBio führte zunächst zu einem hohen Peak zu Beginn der Messung nach wenigen Sekunden. Im Gegensatz zu der Bright-GloTM-Reagenz fielen die Messwerte schnell ab, die konstantere Messwerte über einige Minuten ermöglichte. Einige Versuche mit veränderter Pufferzusammensetzung führten schließlich zu dem angegebenen Ansatz. Neben dem von GoldBio erwähnten Coenzym A schien hinzugegebenes AMP das frühe Enden der Lichtreaktion zu verzögern. Eine exemplarische Messung mit transfizierten HEK293T-Zellen ist in der folgenden Abbildung 9 dargestellt. Insgesamt waren die Messwerte deutlich kleiner als die Messwerte derselben Probe mit

Bright-Glo™. In der Regel lagen die Bright-Glo™-Werte in einem Bereich um das Vierfache über den Messwerten mit dem angesetzten GoldBio-Puffer. Der angesetzte GoldBio-Puffer ermöglichte damit relativ konstante Messwerte in den ersten fünf bis 8 Minuten nach dessen Zugabe (Abb. 9). Etwa 8 Minuten dauert eine Messung einer 96-well-Platte bei 5 Sekunden je well. Aufgrund der relativ konstanten Luciferase-Messwerte über diesen Zeitraum, wurde der angesetzte Puffer für die folgenden Messungen dieser Arbeit verwendet.

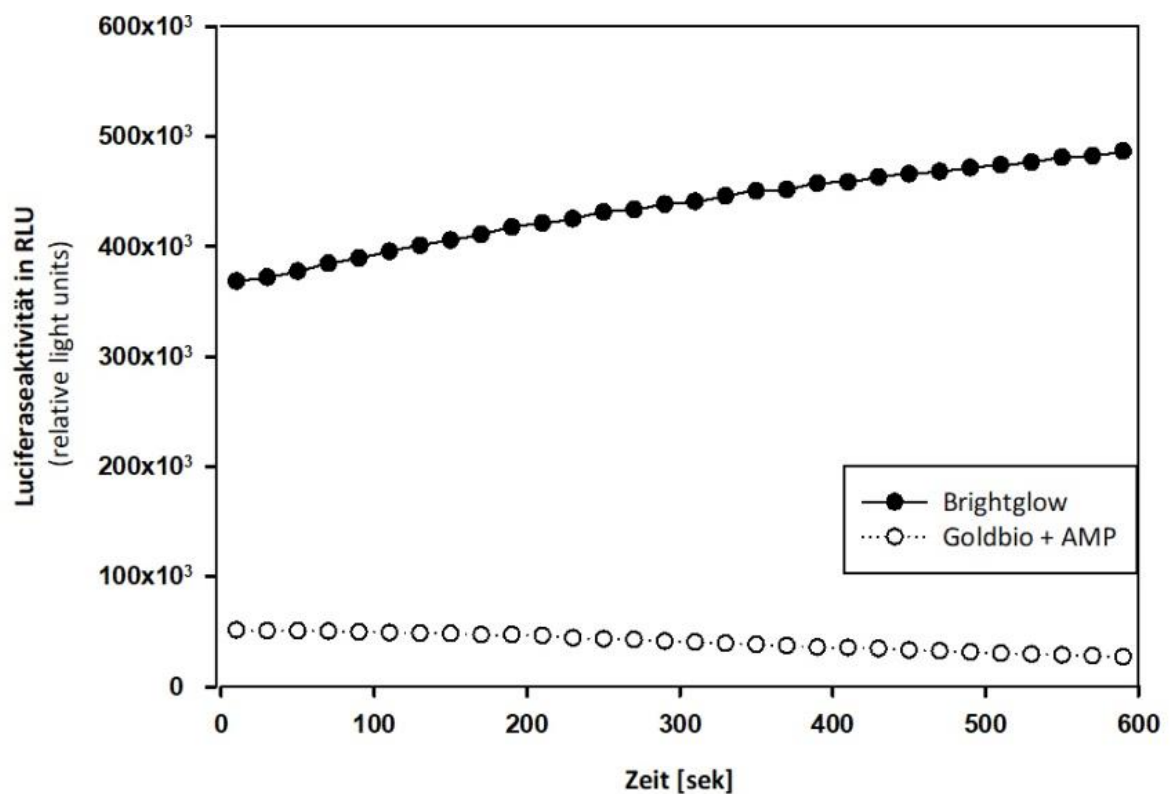


Abb. 9: Vergleich des angesetzten Luciferasepuffers mit dem kommerziellen Bright-Glo™-Reagenz

Das Bright-Glo™-Reagenz wurde ohne Lysepuffer zur unlysierten Zellprobe gegeben. Die Messung der Luciferaseaktivität erfolgte nach 5 min Inkubation. Transfizierte HEK293T-Zellen derselben Probe wurden 10 min durch den Lysepuffer lysiert und direkt nach Zugabe durch den angesetzten Puffer gemessen. Der GoldBio-Puffer wurde mit zugesetztem AMP angepasst. Messwerte in RLU/s.

3.3 Nachweis von Infektionen durch Luciferase-Assay

3.3.1 Herstellung von ZIKA- und Usutu-prM/E-pseudotypisierten Viruspartikeln

Die Herstellung der pseudotypisierten Viruspartikel konnte durch Transfektionen und Kotransfektionen durchgeführt werden. Hierbei werden Plasmide, bzw. mehrere Plasmide gleichzeitig durch etablierte Verfahren in das Zellinnere eingeschleust. Pseudotypisierte Viruspartikel werden in transfizierten Zellen gebildet und durch die Zellmembran an das Kulturmedium abgegeben. Die Laborgruppe Schreiber hat bereits mit DENV-prM/E- und ZIKA prM/E-pseudotypisierten HIV-1 Partikeln Arbeiten über Flaviviren durchgeführt (Auerswald, 2016; Kadlubowska, 2019; Kretschmer, 2017). Ziel dieser Arbeit war unter anderem der Vergleich einer zwei-Plasmid mit einer 3-Plasmid-Kotransfektion.

Die Versuchsdurchführung ist in Abschnitt 2.8.3 detaillierter beschrieben. Zum einen wurde eine Kotransfektion mit dem Expressionsvektor prM/E und dem HIV-Virusvektor pNL Luc AM angewendet. Letzterer besitzt eine deletierte *env*-Region. Zur Vermehrung essenzielle Genfragmente der viralen Hüllproteine sind entfernt, und durch Luciferase-Fragmente ersetzt worden. Eine Vervielfältigung des HIV-1-Virus ist damit nicht möglich. Viruspartikel dieser Kotransfektion können Zellen nur einmalig infizieren, eine sog. *single round infection*. Dadurch bildeten transfizierte Zellen Pseudotypen mit dem HIV-1-Kapsid aus, das Hüllproteine des ZIKA-Virus (prM/E) aufwies. Zellen mit erfolgreich integriertem Luciferase-Plasmid konnten durch dessen Genfragmente das Enzym Luciferase exprimieren. Dieses reicherte sich demnach in den Zellen an. Das Luciferase Assay nutzt die synthetisierten Enzyme zum Nachweis erfolgreicher Transfektionen. Die Kotransfektion verschiedener Plasmide und Bildung diverser Pseudotypen ist demnach messbar.

Insgesamt konnten bei allen Transfektionen nach Anwendung des Luciferase-Assays mit dem angepassten Puffer positive Luciferase-Werte ermittelt werden. Diese lagen im Bereich von $1 \cdot 10^6$ RLU/100 μ l bis $1 \cdot 10^9$ RLU/100 μ l Zelllysat. Nicht transfizierte Zellen und Transfektionen mit Plasmiden ohne Luciferase-Fragmente (z.B. CXCR4.1) resultierten in Messwerten von einigen hundert RLU/100 μ l Zelllysat. Andere Luciferase-freie Substanzen wie PBS-Puffer und Wasser ergaben ebenfalls Messwerte in diesem Bereich.

Daher wurden sie in dieser Arbeit als Nullwerte behandelt. Die höchsten Messwerte wurden wiederholt von dem Ansatz mit nur einem Plasmid ermittelt (10^8). Jeweils eine Potenz geringer fielen im Schnitt wie zu erwarten die Kotransfektionen mit zwei (10^7) und drei Plasmiden aus (10^6 - 10^7).

Tab. 3: Luciferaseaktivitäten in transfizierten HEK293T-Zellen*

1 Plasmid	2 Plasmide	3 Plasmide	3 Plasmide
pNL Luc AM	pNL Luc AM pME-Z1	Lenti-luciferase-P2A-Neo psPAX2 pME-Z1	Lenti-luciferase-P2A-Neo psPAX2 pME-USU-BH85
	Pseudotyp: <i>Z1-HIVluc</i>	Pseudotyp: <i>Z1-LENTIluc</i>	Pseudotyp: <i>Z1-LENTIluc</i>
$1,02 \cdot 10^8$	$1,00 \cdot 10^8$	$1,66 \cdot 10^6$	$1,25 \cdot 10^7$
$2,15 \cdot 10^9$	$4,00 \cdot 10^7$	$5,45 \cdot 10^7$	$2,25 \cdot 10^7$
$3,50 \cdot 10^7$	$5,98 \cdot 10^7$	$4,61 \cdot 10^7$	$8,18 \cdot 10^7$
$7,60 \cdot 10^8$	$6,60 \cdot 10^7$	$3,40 \cdot 10^7$	$3,90 \cdot 10^7$
Mittelwert: $1,02 \cdot 10^8$	Mittelwert: $1,00 \cdot 10^7$	Mittelwert: $1,66 \cdot 10^7$	Mittelwert: $1,25 \cdot 10^7$

*, Messwerte angegeben in RLU/s

Die Zika-prME-Pseudotypen basierend auf dem Zikavirus Isolat Dakar41519 wurden zur Vereinfachung als *Z1-HIVluc* (2-Plasmid-System) und *Z1-LENTIluc* (3-Plasmid-System) bezeichnet. Die Bezeichnung der Pseudotypen orientiert sich an der entsprechenden Publikation (Kretschmer et al., 2020).

Kotransfektionen dreier Plasmide mit dem ZIKA-Expressionsvektor pME-Z1, psPAX2 und Lenti-luciferase-P2A-Neo produzierte den *Z1-LENTIluc* Pseudotyp der ähnlich hohe Messwerte wie der Usutu BH85 prME-Pseudotyp zeigte.

3.3.2 Infektion von VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen mit Z1-HIV*luc* und Z1-LENT*luc* Pseudotypen.

Zur Infektion der Zellen wurde die aus Abschnitt 3.3.1 hergestellten ZKÜ der 2- und 3-Plasmid-Transfektionen verwendet. Die Pseudotypen Z1-HIV*luc* und Z1-LENT*luc* sollten für Infektionen von VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen verwendet werden. Alle Versuche wurden in vierfacher Ausführung durchgeführt. Drei Tagen nach der Infektion wurde die Luciferaseaktivität in den Zellen gemessen.

Bei den Experimenten konnten insgesamt deutlich geringere Messwerte als bei der Transfektion registriert werden. Diese lagen im Bereich von 200 bis 320000 ($3,2 \cdot 10^5$) RLU/100 μ l Zelllysate. Das 2-Plasmid-System zeigte insgesamt höhere Werte als das 3-Plasmid-System. Dabei traten Schwankungen in den Messwerten um das Vierfache auf. Die höchsten Infektionswerte durch den 2-Plasmid Pseudotypen Z1-HIV*luc* wurden bei den VeroB4- ($8,3 \cdot 10^4$ RLU/s) und Hg39- ($2,7 \cdot 10^4$ RLU/s) Zellen bei einer Verdünnung der ZKÜ bei 1:4 gemessen. Die U87-Zellen zeigten geringere Werte von $7,0 \cdot 10^3$ RLU/s (Abb. 10). Als Kontrolle wurden ZKÜ von pNL Luc AM transfizierten HEK293T-Zellen verwendet. Dabei wurden RLU-Werte von 200 bis 1000 RLU/s gemessen. Alle Experimente wurden in 96-well Mikrotiterplatten durchgeführt (vierfach Bestimmung). Die gemessenen Luciferaseaktivitäten der infizierten Zellen lagen damit deutlich über diesem negativen Bereich. Zur Kontrolle verwendete prME-Pseudotypen des Usutuvirus BH85 zeigten ausschließlich negative Messwerte.

Der Pseudotyp Z1-LENT*luc* wurde durch Kotransfektion hergestellt (2,5 μ g Lenti-luciferase-P2A-Neo (Lenti-luc), 5 μ g psPAX2 und 12,5 μ g pME-Z1). Einheitlich wurden die Zelllinien, wie bei dem Pseudotypen Z1-HIV*luc*, in 96-well-Platten für 3 Tage mit den ZKÜ infiziert. In vierfacher Bestimmung wurde die Luciferaseaktivität der Infektionen gemessen. Der Pseudotyp Z1-LENT*luc* führte zu geringeren Messwerten in den drei Zelllinien VeroB4, Hg39 und U87. Wie in der Abb. 10 zu sehen, wurden die höchsten Messwerte bei der Infektion der VeroB4-Zellen gemessen ($3,5 \cdot 10^4$ RLU/s). Die U87-Zellen lieferten RLU-Werte im Bereich von $2,8 \cdot 10^4$ RLU/s. Am geringsten waren die Werte der Hg39-Infektionen mit $5,8 \cdot 10^3$ RLU/s. Alle Luciferasewerte waren damit deutlich höher als der negative Bereich von 200-1000 RLU/s der Kontrollen.

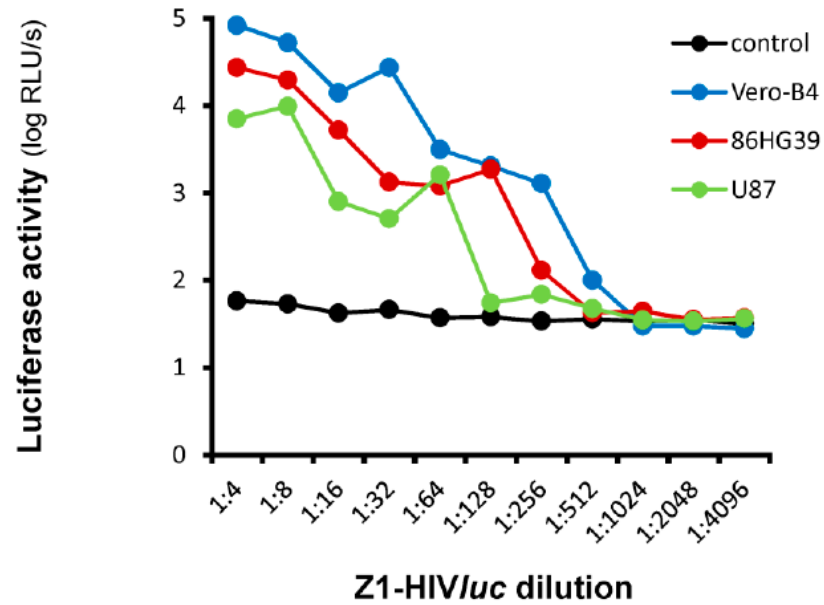


Abb. 10: Luciferaseaktivitäten in infizierten VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen. Die Infektionen wurden mit dem Pseudotypen Z1-HIV/luc, enthalten in den ZKÜ aus der Transfektion mit pNL Luc AM und pME-Z1, durchgeführt. Nach 3 Tagen Inkubation erfolgte die Messung. ZKÜ transfizierter HEK293T-Zellen mit pNL Luc AM dienten als Negativkontrolle. Messwerte in RLU/s.
Abbildung aus Kretschmer et al., 2020, Fig. 3.

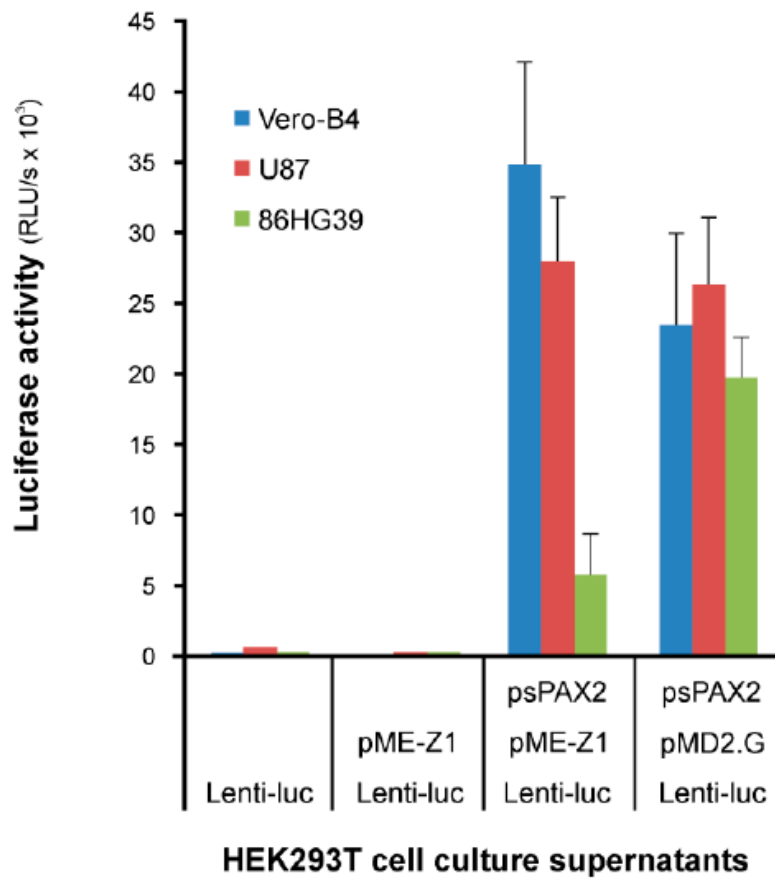


Abb. 11: Luciferaseaktivitäten in infizierten VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen.

ZKÜ transfizierter HEK293T-Zellen wurden zur Infektion verwendet. Der in den ZKÜ enthaltene Pseudotyp Z1-*LENTI*luc wurde durch Kotransfektion der Plasmide pME-Z1, psPAX2 und Lenti-luciferase-P2A-Neo (Lenti-luc) hergestellt. Nach 3 Tagen wurden die Infektionen gemessen. ZKÜ mit dem einzelnen Lenti-luciferase-P2A-Neo und Lenti-luciferase-P2A-Neo + pME-Z1 dienten als Negativkontrolle. Alle Messwerte in RLU/s x 10³.

Abbildung aus Kretschmer et al., 2020, Fig. 4.

3.4 Infektionen von Zellen mit Pseudotypen die im Genom das CRISPR/Cas9 System tragen

3.4.1 Transfektion von Zellen mit den für die Pseudotyp-Produktion verwendeten Plasmiden

Die Plasmide LentiCRISPRv2-CXCR4.1 und LentiCRISPRv2-CXCR4.2 enthalten anstatt der Luciferase-Abschnitte jene für das fluoreszierende Protein mCherry. Diese Lenti-Vektoren wurden für das 3-Plasmid-System verwendet zur Herstellung des Z1-LENTI $_{luc}$ -Pseudotypes verwendet. Zur Beurteilung der Transfektionen mit diesen Plasmiden wurden die Zellen zunächst wie beschrieben in 8- und 24-Kavitäten fassenden-Zellkammern kultiviert und transfiziert. Die transfizierten HEK293T-Zellen der 24-well-Zellkammer wurden mittels Trypsins (50 μ l) abgelöst und in eine *chamber slide* Kammer transferiert. So konnten diese auf dem dort angebrachten Objektträger 24 Stunden adhärent anwachsen und nach dem Anfärben mikroskopiert werden. Zum Anregen der Absorptionsmaxima wurden die Zellen mit Licht der Wellenlängen 590 nm und 358 nm angeregt. Zum Vergleich wurden Pseudotypen mit dem G-Protein des VSV-Virus (VSV-G) hergestellt.

Bei allen Plasmid-Kombinationen konnten transfizierte HEK293T-Zellen anhand der roten mCherry-Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Transfektionen in der 24-well Platten hatten sich als effizienter herausgestellt, da rot fluoreszierende Zellen zahlreicher zu erkennen waren. Die mCherry-Fluoreszenzen sind in Abb. 12, Abb. 13 und Abb. 14 in der linken Spalte dargestellt. Die Negativkontrolle, ohne Plasmide transfizierte- und kultivierte HEK293T-Zellen zeigte wie zu erwarten keine rötlich fluoreszierenden Zellen. Die Färbung der Zellkerne erfolgte durch den Farbstoff DAPI (mittlere Spalte). Zum Vergleich sind die beiden Bilder in der rechten Spalte überlagert. Transfektionen mit nur einem Plasmid (Abb. 12) zeigten mit 4-10 transfizierten Zellen auf 20-30 Zellen eine etwas höhere Transfektionsrate als jene mit den drei Plasmiden (Abb. 13 und Abb. 14). Hier sind aufgrund der roten Fluoreszenz im Durchschnitt 3-6 Zellen erfolgreich transfiziert. Diese enthielten neben dem mCherry-tragenden lentiviraler Vektor und Viralvektor jeweils den Hüllprotein-Expressionsvektor des Zika- oder VSV-Virus. Einzelne, kleine rot-fluoreszierende Punkte waren in allen Proben zu erkennen. Diese wurden als Hintergrund-Fluoreszenz interpretiert. Ausschließlich vollständig rot leuchtende Zellen wurden als transfizierte Zellen gewertet.

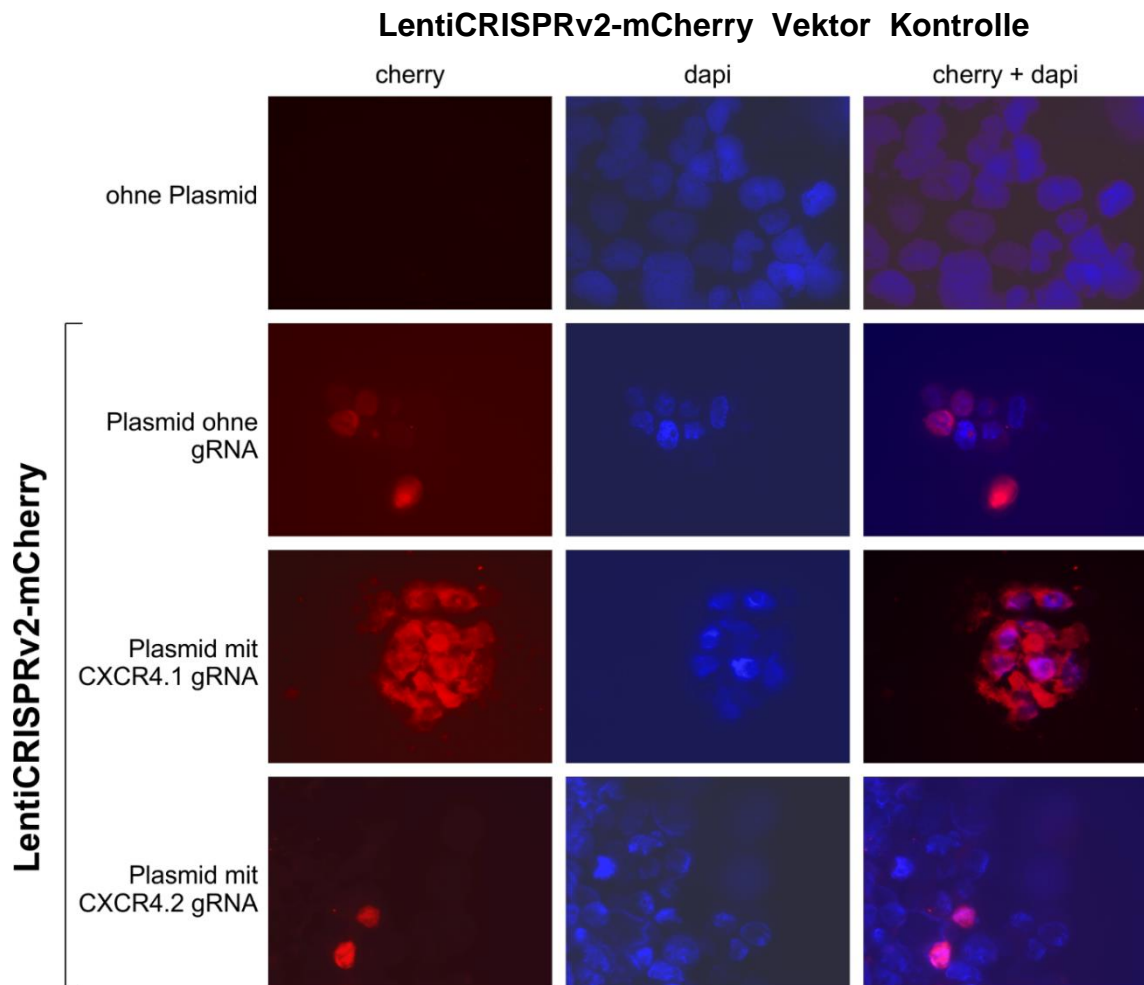


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme mit LentiCRISPRv2-mCherry transfizierten HEK293T-Zellen (Kontrolle).

Die verwendeten Plasmide wurden in HEK293T-Zellen transfiziert (24-well Format). Die Pseudotyp-haltigen ZKÜ wurden nach 3 Tagen abgenommen. Die HEK293T-Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst und über Nacht in eine Kammer eine 8er chamber slides überführt. Nach zweimaligem Waschen (PBS) wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt und mikroskopiert. Jede horizontale Reihe zeigt dieselbe Probe, angeregt mit 590 nm (rot) oder 358 nm (blau). Rot, mCherry Fluoreszenz; Blau, DAPI Fluoreszenz (63er Objektiv, Mikroskop, Axio Imager 2) Verwendete Plasmide:

Plasmid ohne gRNA: LentiCRISPRv2-mCherry

CXCR4.1 gRNA: LentiCRISPR-CXCR4.1

CXCR4.2 gRNA: LentiCRISPR-CXCR4.2

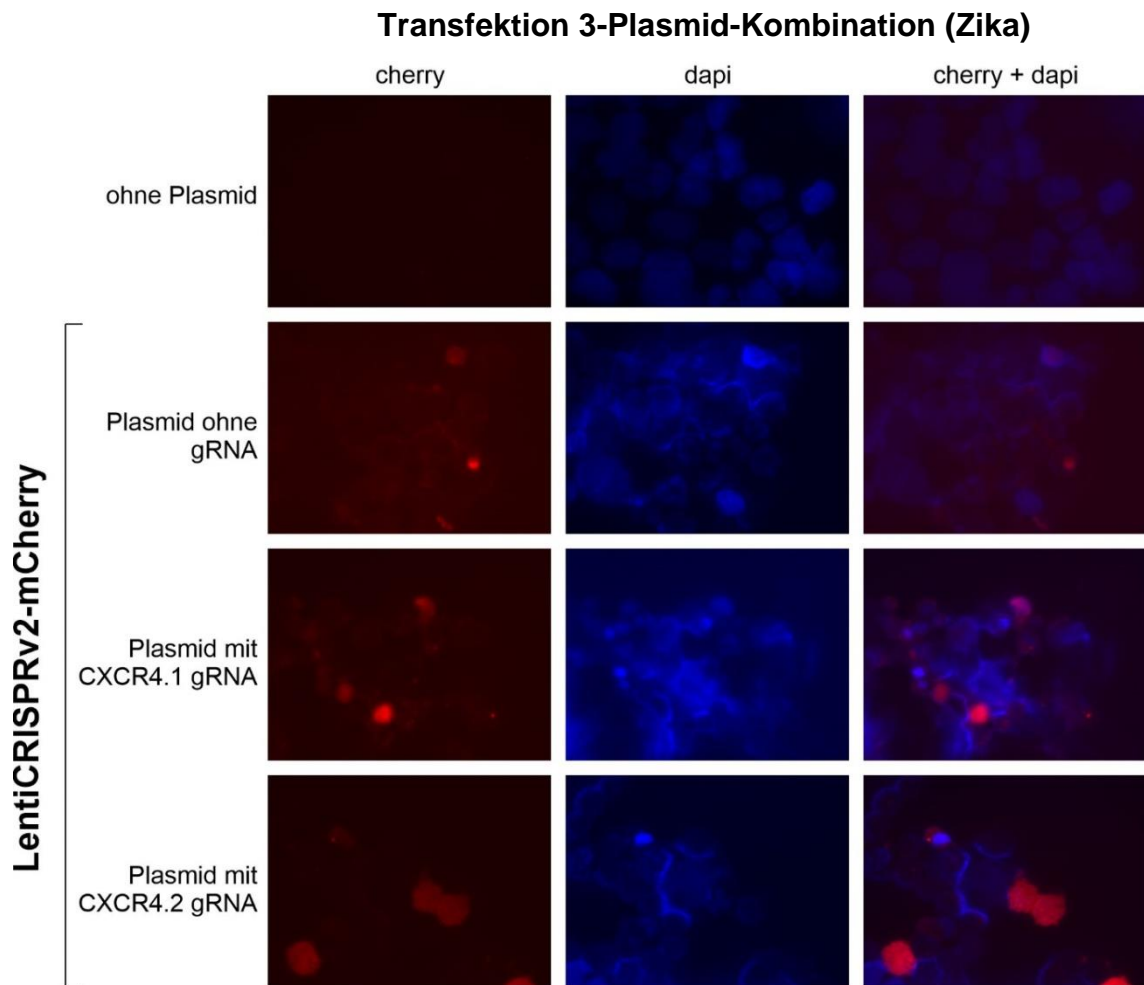


Abb. 13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme transfizierter HEK293T-Zellen durch 3-Plasmid Kombinationen.

Die Zellen wurden wie in Abb. 12 beschrieben kultiviert und gefärbt. Für die Transfektion der HEK293T-Zellen wurden folgende drei Plasmidkombinationen verwendet:

Plasmid ohne gRNA: LentiCRISPRv2-mCherry + psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.1 gRNA: LentiCRISPR-CXCR4.1 + psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.2 gRNA: LentiCRISPR-CXCR4.2 + psPAX2 + pME-Z1

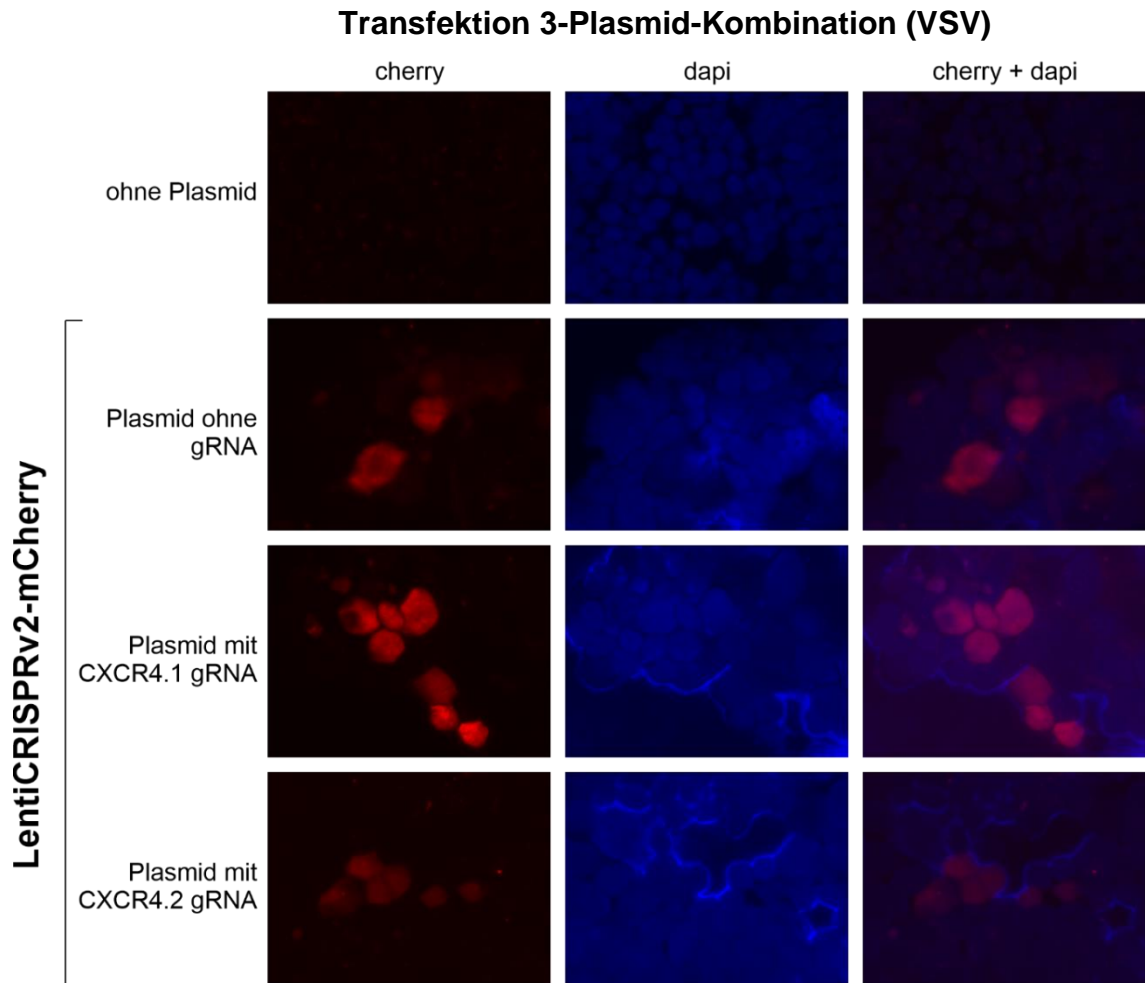


Abb. 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme transfizierter HEK293T-Zellen durch drei Plasmide mit VSV-Hüllproteinen.

Die Zellen wurden wie in Abb. 12 beschrieben kultiviert und gefärbt. Für die Transfektion der HEK293T-Zellen wurden folgende drei Plasmidkombinationen verwendet:

Plasmid ohne gRNA: LentiCRISPRv2-mCherry + psPAX2 + pMD2.G
 CXCR4.1 gRNA: LentiCRISPR-CXCR4.1 + psPAX2 + pMD2.G
 CXCR4.2 gRNA: LentiCRISPR-CXCR4.2 + psPAX2 + pMD2.G

3.4.2 Infektion von VeroB4-, Hg39- und U87-Zellen durch Z1-LENTI luc

Die in Abschnitt 3.4.1 hergestellten Zellkulturüberstände wurden für Infektionsexperimente von VeroB4-, Hg39- und U87- Zellen eingesetzt. Als vergleichende Kontrolle wurde ein Pseudotyp mit dem VSV-G-Protein verwendet (VSV-G-LENTI $cherry$).

Für die Infektion wurden Zellsuspensionen hergestellt. Je Zellsuspension wurden 250 μ l der Zellen mit 250 μ l der Pseudotyp-haltigem ZKÜ gemischt und in ein well eines 8er *chamber slides* gegeben. Nach drei Tagen wurden die Kammern mit PBS gewaschen und die Zellen mit DAPI gefärbt. Nach weiterem Waschen mit PBS wurden die slides von den Kammern getrennt und die Objektträger wurden mikroskopiert. Ergebnisse der Infektionen sind in den Abbildungen 15-21 dargestellt.

Bezeichnung der verwendeten Pseudotypen und die zur Herstellung benötigten Vektoren:

<u>Pseudotyp</u>	<u>Vektor für HIV-1 Gnom</u>	<u>gag, pol</u>	<u>env</u>
Z1-LENTI luc	Lenti-luciferase-P2A-Neo	psPAX2	pME-Z1
Z1-LENTI $cherry$	LentiCRISPRv2-mCherry	psPAX2	pME-Z1
Z1-LENTI-CXCR4.1	LentiCRISPR-CXCR4.1	psPAX2	pME-Z1
Z1-LENTI-CXCR4.2	LentiCRISPR-CXCR4.2	psPAX2	pME-Z1
VSV-G-LENTI $cherry$	LentiCRISPRv2-mCherry	psPAX2	pMD2.G

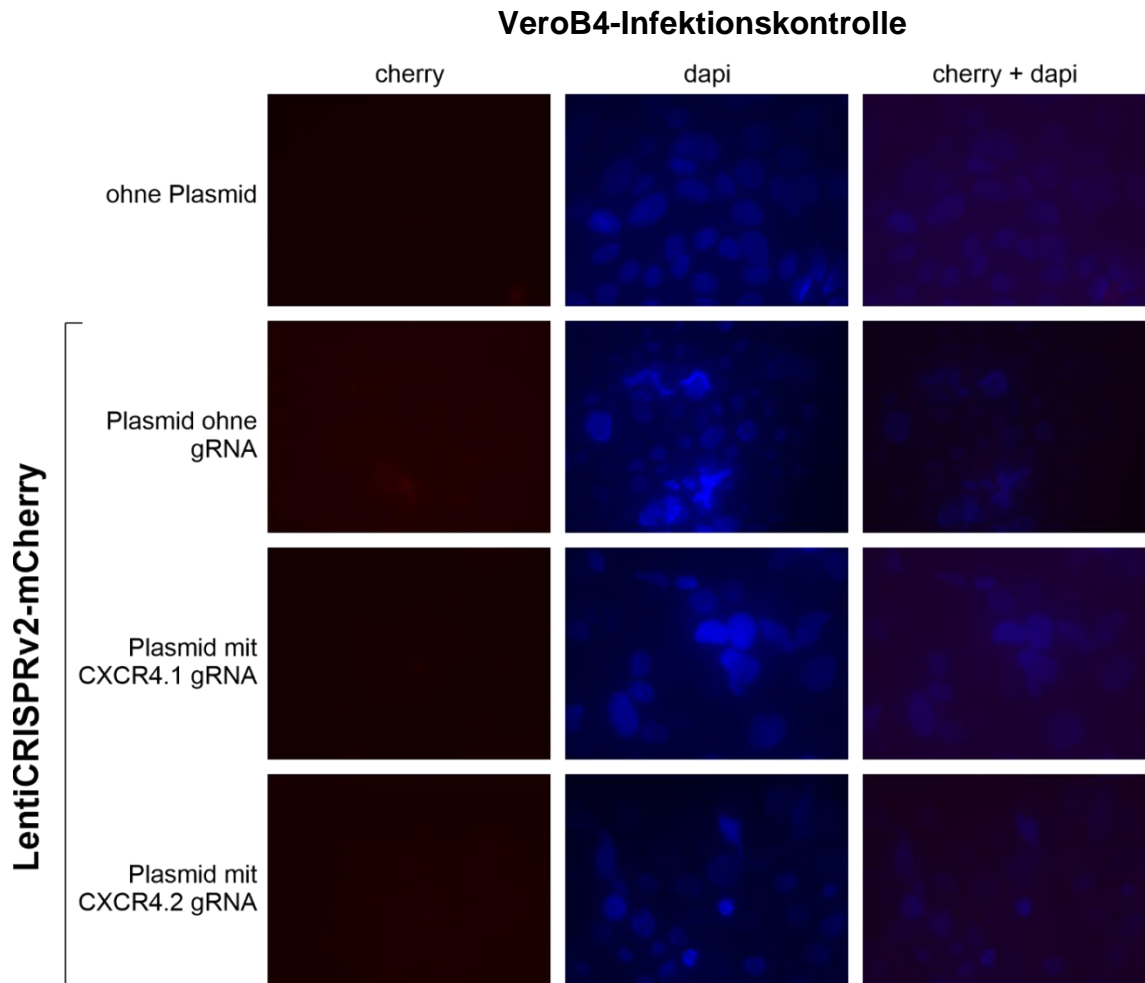


Abb. 15: VeroB4-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen LentiCRISPRv2-mCherry transfizierter HEK293T-Zellen (Kontrolle).

VeroB4-Zellen wurden in ein well eines 8er chamber slides mit 250 µl Pseudotyp-haltigem ZKÜ ausgesät. Die Pseudotyp-haltigen ZKÜ entstammten den zuvor durchgeführten Transfektionen. Nach 3 Tagen Inkubation bei 37 °C (5 % CO₂) wurde das Medium verworfen. Zur Zellfärbung wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Objektträger mikroskopiert. Jede horizontale Reihe zeigt dieselbe Probe, angeregt mit 590 nm (rot) oder 358 nm (blau). Rot, mCherry Fluoreszenz; Blau, DAPI Fluoreszenz (63er Objektiv, Mikroskop, Axio Imager 2).

Verwendete Zellkulturüberstände von HEK293T-transfizierten Zellen:

Plasmid ohne gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPRv2-mCherry

CXCR4.1 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.1

CXCR4.2 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.2

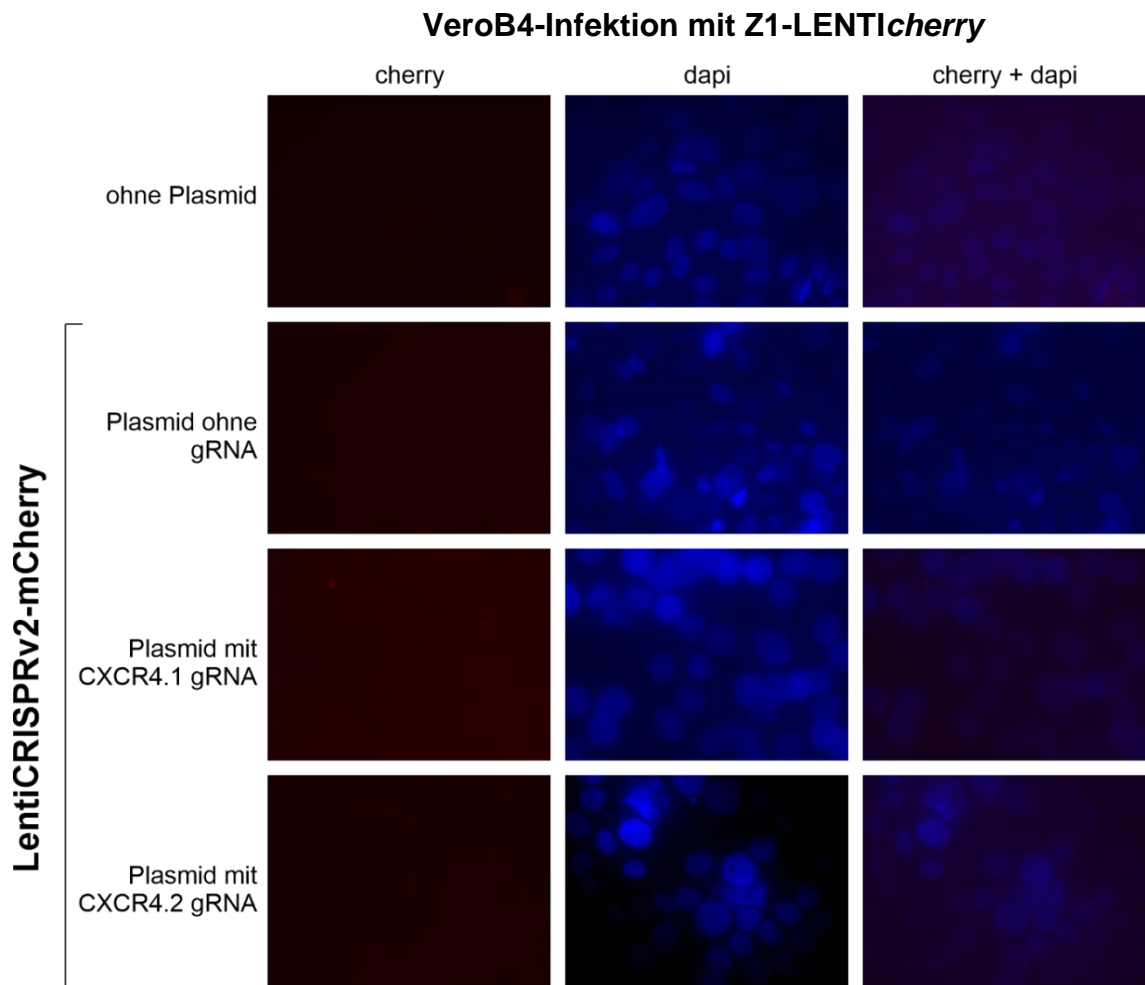


Abb. 16: VeroB4-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen 3-Plasmid transfizierter HEK293T-Zellen.

Die Experimente wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.

Verwendete Zellkulturüberstände von HEK293T- transfizierten Zellen:

Plasmid ohne gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPRv2-mCherry + psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.1 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.1 + psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.2 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.2 + psPAX2 + pME-Z1

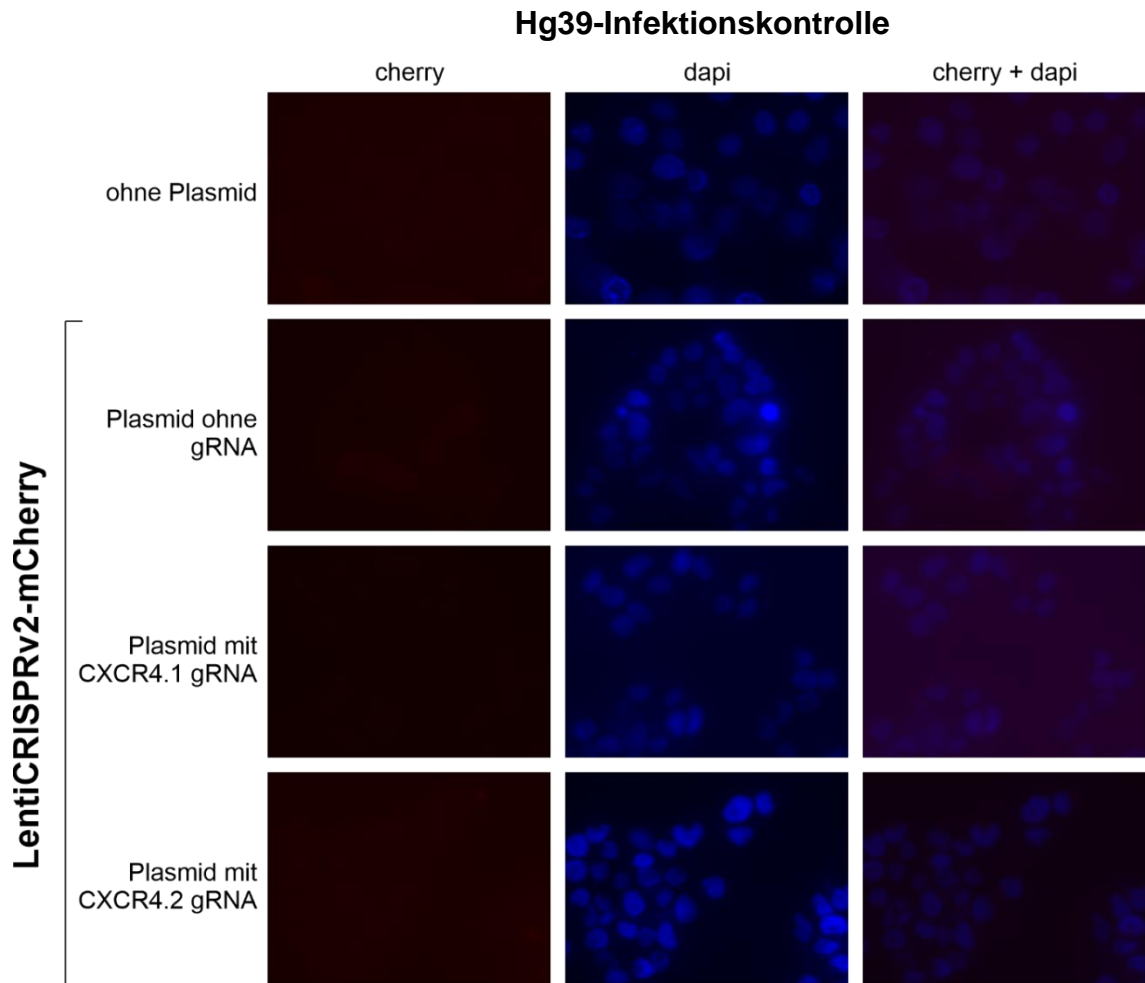


Abb. 17: Hg39-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen LentiCRISPRv2-mCherry transfizierter HEK293T-Zellen (Kontrolle).

Die Experimente wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.

Verwendete Zellkulturüberstände von HEK293T-transfizierten Zellen:

Plasmid ohne gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPRv2-mCherry

CXCR4.1 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.1

CXCR4.2 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.2

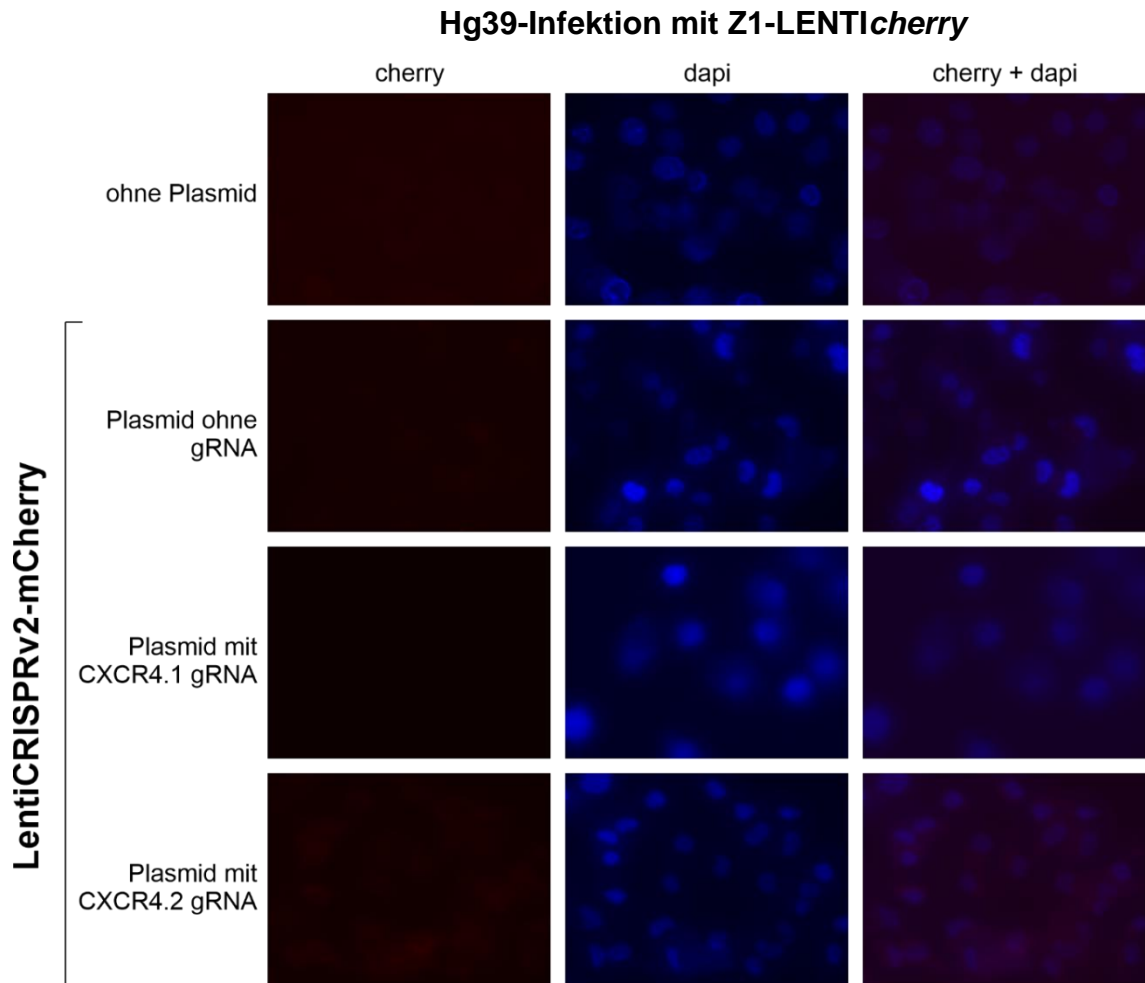


Abb. 18: Hg39-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen 3-Plasmid transfizierter HEK293T-Zellen.

Die Experimente wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.

Verwendete Zellkulturüberstände von HEK29- transfizierten Zellen:

Plasmid ohne gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPRv2-mCherry +
psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.1 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.1 +
psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.2 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.2 +
psPAX2 + pME-Z1

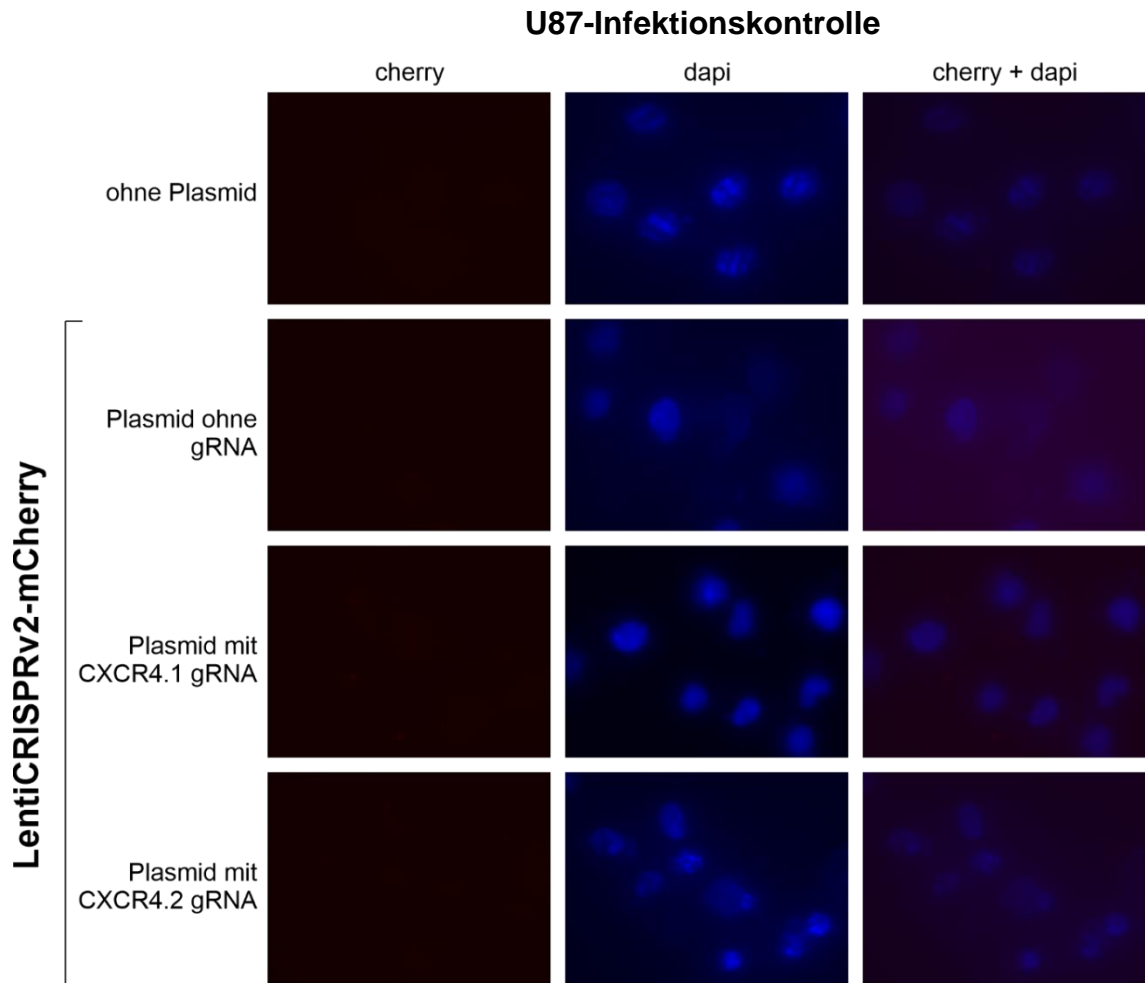


Abb. 19: U87-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen LentiCRISPRv2-mCherry transfizierter HEK293T-Zellen (Kontrolle).

Die Experimente wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.

Verwendete Zellkulturüberstände von HEK293T-transfizierten Zellen:

Plasmid ohne gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPRv2-mCherry

CXCR4.1 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.1

CXCR4.2 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.2

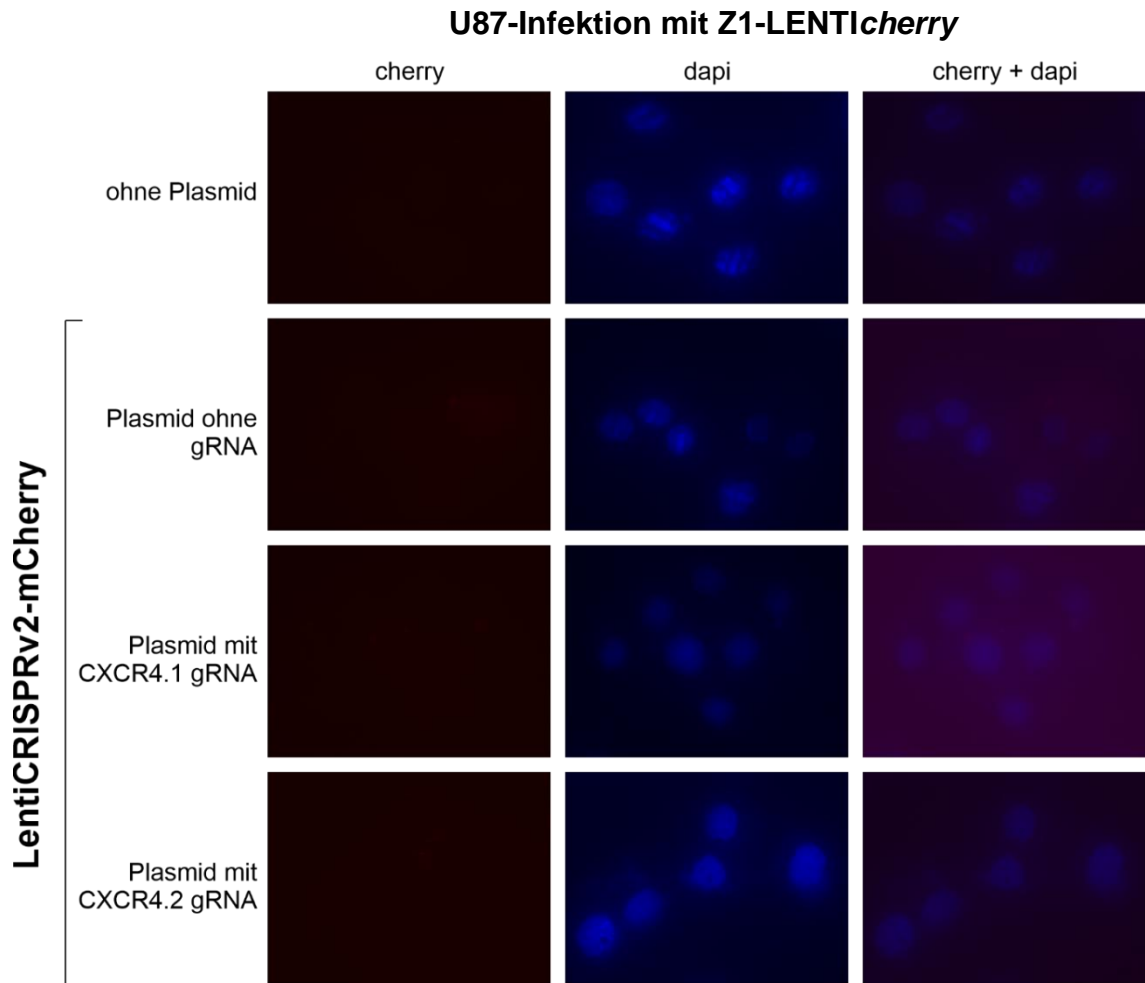


Abb. 20: U87-Zellen inkubiert mit Zellkulturüberständen 3-Plasmid transfizierter HEK293T-Zellen.

Die Experimente wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.

Verwendete Zellkulturüberstände von HEK293T-transfizierten Zellen:

Plasmid ohne gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPRv2-mCherry +
psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.1 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.1 +
psPAX2 + pME-Z1

CXCR4.2 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.2 +
psPAX2 + pME-Z1

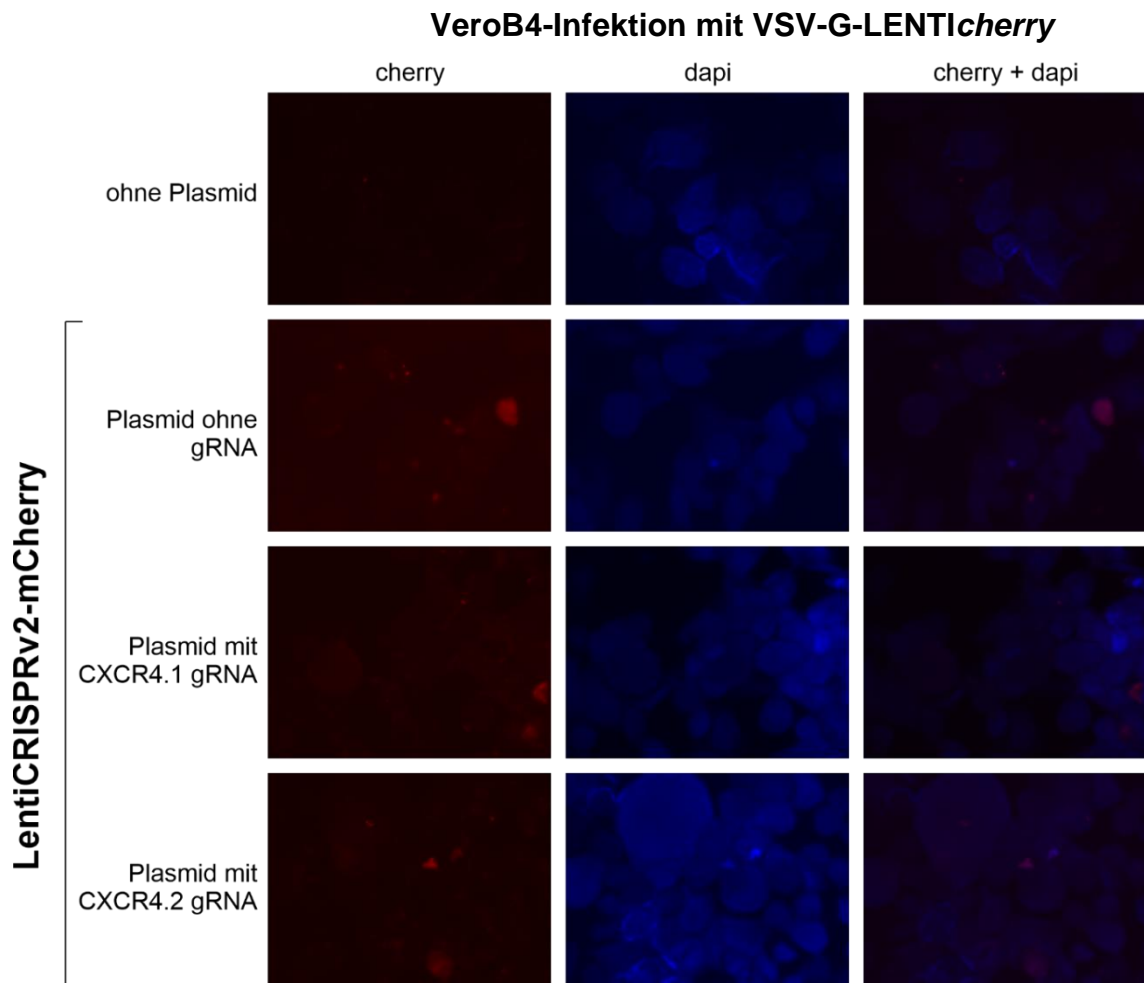


Abb. 21: VeroB4-Zellen inkubiert mit VSV-G-Pseudotyp (VSV-G-LENTI*uc*) haltigen HEK293T-Zellkulturüberständen.

Die Experimente wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.

Verwendete Zellkulturüberstände von HEK293T-transfizierten Zellen:

Plasmid ohne gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPRv2-mCherry + psPAX2 + VSV-G Plasmid pMD2.G

CXCR4.1 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.1 + psPAX2 + VSV-G Plasmid pMD2.G

CXCR4.2 gRNA: ZKÜ von HEK293T /LentiCRISPR-CXCR4.2 + psPAX2 + VSV-G Plasmid pMD2.G

Entsprechend den Luciferase-Versuchen waren negative Ergebnisse bei den infizierten Zellen mit nur einem Plasmid erwartet worden. Dies konnte bei allen drei Zelllinien beobachtet werden. Obwohl bei allen Zellen ein leichtes rötliches Hintergrundschimmern zu beobachten war, zeigten sich keine Rotfärbungen über ganze Zellen (Abb. 15, Abb. 17 und Abb. 19), wie es vergleichend bei der Transfektion zu sehen war (Abb. 10).

Dies war ebenfalls bei den Infektionen mit drei eingesetzten Plasmiden und dem Zika-Hüllproteinen zu beobachten. Als Negativ-Kontrolle wurden hier VeroB4, Hg39 oder U87 Zellen mit Zellkulturüberständen aus den Negativ-Kontrollen der Transfektion infiziert. Auch nach Wiederholen der Versuche konnte keine rote Fluoreszenz beobachtet werden. Die blaue Zellfärbung war bei den Zelllinien VeroB4 und Hg39 insgesamt schärfer zu sehen als bei der U87-Zelllinie.

Dagegen zeigten Infektionen mit dem etablierten Plasmid der VSV-Hüllproteine scheinbar erfolgreich infizierte Zellen. Ähnlich der Transfektionen fluoreszierten hier ganze Zellen rötlich. Die Anzahl lag mit ein bis zwei infizierten Zellen auf 20-30 Zellen deutlich unter der Ausbeute bei den Transfektionsexperimenten (Abb. 21).

4 Diskussion

4.1 Verwendung pseudotypisierter Viruspartikel

Pseudotypisierte Viruspartikel werden häufig in der virologischen Forschung verwendet (Li et al., 2018). Die Entwicklung von Impfstoffen, Untersuchung des viralen Zelleintritts, oder die Behandlung von Tumoren sind wichtige Anwendungsgebiete. Interessant ist die Tatsache, dass Glioblastome und deren Stammzellen permissiv für Flaviviren wie das Zika-Virus sind (Zhu et al., 2017). Onkolytische Viren und pseudotypisierte Partikel werden bereits in einigen Studien untersucht. Pseudotypen können im Gegensatz zu hochpathogenen Virus-Wildtypen in Laboren ohne hohe Sicherheitsvorkehrungen der Stufen 3 und 4 verwendet werden. Pathogene Genfragmente für Zelleintritt oder Replikation sind in den verwendeten Vektoren deletiert. Dadurch können solche Pseudotypen nur in Zellen eindringen, aber dann keine neuen infektiösen Partikel bilden. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als *single round infection* (einmalige Infektion ohne weitere Replikation). Dennoch gleichen die Hüllproteine pseudotypisierter Viruspartikel denen eines normalen Virustyps. Pseudotypen enthalten neben den zur Infektion erforderlichen äußeren Hüllproteinen ein mutiertes Genom, welches als Minimalvoraussetzung Hüllprotein deletiert ist (env^-). Anstelle des nicht mehr vorhandenen env -Gens können nun Reportergene integriert werden. Einige Studien verwenden hier etablierte Verfahren wie das GFP, mCherry oder Luciferase (Kadlubowska, 2019; Soezi et al., 2015). Der Vorteil eines solchen Systems ist, dass alle viralen Bestandteile von Expressions- und viralen Vektoren rekombinant produziert werden. Die Herstellung pseudotypisierter Viruspartikel erfolgt in der Regel durch Transfektion der Zelllinie HEK293T oder COS-1. In Vorarbeiten hatten H. Auerswald (Auerswald, 2016) und Enlund (Enlund et al., 2014) nach Vergleich mehrerer liposomaler Reagenzien das SFA als zuverlässig und effizient beschrieben. Auch in dieser Arbeit haben sich Transfektionen mit dem kommerziellen SFA von Vorteil erwiesen.

In den vergangenen Jahren haben sich aufgrund der Möglichkeiten und Vorteile einige Systeme zur Herstellung diverser Pseudotypen etablieren können. Li et al. (2018) haben aktuelle Systeme vergleichend zusammengefasst. Dabei wurde festgestellt, dass das Verpackungssystem HIV-1 derzeit zu den am häufigsten eingesetzten Verpackungssystemen zählt. Wie in der Einleitung erwähnt, existieren bereits einige Arbeiten zu pseudotypisierten Dengue- und Flaviviren mit dem HIV-1 (Hu et al., 2007; Kretschmer,

2017; Li et al., 2018). Entgegen der Arbeit von Hu et al. (2007) konnte Auerswald (2016) mehrere Dengue-Pseudotypen mit hohen Infektionswerten durch das hier verwendete virale Plasmid pNL Luc AM herstellen. Das vorhandene (nef+) Gen des pNL Luc AM Vektors erwies sich dabei als vorteilhaft gegenüber dem pNL4-3-R^E nef- Virusvektor der in der Arbeit von Hue et al. (2007) verwendet wurde. Auf den Ergebnissen des Denguevirus aufbauend konnte die Laborgruppe Schreiber bereits erste Untersuchungen zu HIV-1-Pseudotypen durchführen die prM/E-Hüllproteine von vier verschiedenen Zikaviren tragen (Kadlubowska, 2019). Dabei erwies sich der Z1-HIV-1-Pseudotyp als sehr effizient (Kretschmer et al., 2020). Daher wurden in dieser Arbeit ausschließlich Experimente mit dem pME-Z1 Expressionsvektor durchgeführt. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal Laborzelllinien die von einem humanem Glioblastom abstammen mit zwei verschiedenen Z1-HIV-1-Pseudotypen infiziert werden (Z1-HIV_{luc} und Z1-LENTI_{luc}).

Allgemein wurden für Anwendung in der Krebstherapie einige Viren untersucht. Wollmann et al., 2012 haben berichtet, dass mehr als 20 Viren die Fähigkeit besitzen, an Glioblastome zu binden und diese zu infizieren. Einige onkolytische RNA- (HIV, Reovirus, VSV) und DNA-Viren (Adenovirus, Vacciniavirus) befinden sich zur Zeit der Veröffentlichung von M. Kretschmer (2020) in klinischen Studien (Phase I, II). Ein untersuchter VSV-Pseudotyp mit dem Lymphozytäre Choriomeningitis-Virus hatte beispielsweise eine höhere Infektiosität für Glioblastome gezeigt als das VSV selbst (Muik et al., 2011). Pseudotypen des Zikavirus waren dagegen noch nicht in der Literatur beschrieben. In dieser Arbeit ist die Infektion von den beiden Glioblastomzelllinien Hg39 und U87 durch Zika-prM/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel beschrieben, sowohl mit dem 2-Plasmid als auch mit dem 3-Plasmid-System. Pseudotypen, dargestellt durch das 2-Plasmid-System (pME-Z1 + pNL Luc AM) zeigten die höchsten Infektionsraten, was ein Vorteil darstellt. Der Nachteil ist allerdings, dass nur Infektionsstudien oder Neutralisationsexperimente durchgeführt werden können, da sich auf dem viralen Genom gag und pol sowie ein Reporter gen befinden. Mit diesem viralen Vektor könne daher keine bzw. nur sehr eingeschränkt anti-Tumor-Faktoren, als Genabschnitte auf dem viralen Genom, in Zellen eingeschleust werden. Der lentivirale Vektor Lenti-luciferase-P2A-Neo wurde verwendet um das 3-Plasmid-System zu testen. Zusammen mit psPAX2 und pME-Z1 wurden für VeroB4-, U87- und Hg39-Zellen infektiöse Pseudotypen (Z1-LENTI_{luc}) produziert. Die Z1-HIV_{luc}- und Z1-LENTI_{luc}-Daten aus dieser Arbeit wurden als Fig 3 und Fig 4 in der Veröffentlichung von M. Kretschmer, P. Kadlubowska,

D. Hoffmann, B. Schwalbe, H. Auerswald und M. Schreiber im Journal Cancers im April 2020 publiziert (Kretschmer et al., 2020).

4.2 Luciferase-Messungen

Erfolgreich mit pNL Luc AM, Lenti-luciferase-P2A-Neo oder LentiCRISPRv2-mCherry transfizierte HEK293T-Zellen produzieren das eingebrachte Reporterenzym Luciferase. Der Luciferasenachweis eignet sich daher zur Kontrolle der Transfektionseffizienz. Die Menge an freigesetzten Luciferase-Enzymen der transfizierten Zellen entspricht dabei der Effektivität der Transfektion bzw. Kotransfektion. In dieser Arbeit wurde ein Luciferasepuffer als Alternative zum kommerziell genutzten Bright-Glo™-Puffer angesetzt. Der Luciferasepuffer beruht im Wesentlichen auf der Zusammensetzung die von der Firma GoldBio publiziert worden war. Durch zusätzlich zugefügtes AMP sollte die Lichtreaktion von wenigen Sekunden auf einige Minuten ausgedehnt werden. Eine Messung einer ganzen 96-well Platte dauert bei zweifach-Messungen ca 5-10 Minuten. In diesem Zeitraum sollte sich Luciferasereaktion konstant ablaufen. Zur Messung wurden transfizierte und infizierte Zellen verwendet. Vor der Messung wurde (nur bei dem Luciferasepuffer) für 10 min ein Zell-Lysepuffer zu den Proben gegeben. Nach folgender Zugabe von Bright-Glo™ oder dem Luciferasepuffer wurde direkt gemessen. Dabei sollten vergleichbare Messergebnisse erzielt werden. Die Messwerte des Luciferasepuffers waren in der Regel drei- bis vierfach geringer als die des Bright-Glo™. Nach Betrachtung des zeitlichen Verlaufes beider Messreihen zeigte sich bei der gewählten Substratmischung, dass der Luciferasepuffer über den Zeitraum von 10 min relativ konstant war. Daher wurden alle Messungen in dieser Arbeit mit der in Abschnitt 2.8.5 beschriebenen Methode durchgeführt. Aufgrund des verlässlich wiederholbaren parallelen Verlaufes der Messkurven, war eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben. Damit bietet der Luciferasepuffer eine kostengünstigere Alternative zu der kommerziellen Bright-Glo™-Reagenz.

4.3 Infektion von Hg39- und U87-Zellen mit Z1-HIV $_{luc}$

Für das erste Ziel dieser Arbeit wurden Z1-HIV $_{luc}$ Pseudotypen mit einem 2-Plasmid-System hergestellt. Dazu wurde das pME-Z1 (Dakar 41519) Plasmid mit dem HIV-1-Vektor pNL Luc AM in HEK293T-Zellen Kotransfiziert. Das pNL Luc AM Plasmid ist env deletiert. Die Transfektion wurde in 24-well-Zellkulturplatten durchgeführt. 2,5 µg pNL Luc AM und 12,5 µg pME-Z1 Plasmid-DNA wurden durch das

Transfektionsreagenz SFA in die HEK293T-Zellen eingebracht. Die ZKÜ wurden nach 3 Tagen für Infektionen der Glioblastom-Zelllinien Hg39 und U87 verwendet. Die dritte Zelllinie VeroB4 entstammt einer Affeniene und dient als Referenz, da Zika-Viren bereits in einigen Studien diese Zelllinie erfolgreich infizieren konnten. Am dritten Tag nach der Infektion wurde die Luciferase-Aktivität in den Zellen mit dem angepassten Puffer (siehe 4.2) gemessen. Die Quantität gilt dabei als Indikator der Effizienz der Infektionsexperimente. Die gemessene Luciferase-Aktivität der Transfektionen zeigte Messwerte von $1 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^8$ RLU/s. Die untersuchten Kontrollen ergaben dagegen einheitliche Messwerte im ausgemachten negativen Bereich (Messwerte < 200 – 800 RLU/s). Damit hatten die Transfektionen wie bei bisherigen Arbeiten verlässlich funktioniert. Die Infektion von Zellen wurde mit den ZKÜ der Transfektionen in Vierfachbestimmungen durchgeführt. Dabei wiesen die Infektionen in VeroB4-Zellen die höchsten Werte auf ($8,3 \cdot 10^4$ RLU/s). Dahinter folgten die Hg39-Zellen ($2,7 \cdot 10^4$ RLU/s) und U87 mit den geringsten Messwerten ($7 \cdot 10^3$ RLU/s), aber deutlich über dem negativen Messbereich. Positive Infektionen der VeroB4-Zellen, als Referenz für Flaviviren, waren wie erwähnt erwartet worden. Interessant sind die Messwerte im vergleichbaren Bereich der Glioblastom-Zelllinien. Auch wenn die Messwerte der U87-Linie deutlich unter denen der Hg39-Linie lagen, konnten bei beiden klare Infektionen nachgewiesen werden. Kadlubowska, 2019 konnte bereits VeroB4-Zellen mit hohen Luciferase-Werten durch das hier verwendete Zika-Plasmid infizieren. Der Z1-HIV luc Pseudotyp scheint nach Kotransfektion durch die beiden Plasmide pME-Z1 und pNL Luc AM (nef+) besonders für Glioblastom-Zelllinien infektiös zu sein, da die Messwerte im vergleichbaren Bereich mit der Referenz-Zelllinie VeroB4 liegen. Die verminderten RLU-Werte bei dem 3-Plasmid-System mit Z1-LENTI luc könnte an dem nef $^-$ Phenotyp des psPAX2 Expressionsvektors für gag und pol liegen. Daher sollten in Zukunft 3-Plasmid Experimente mit nef+ HIV-1 gag und pol Expressionsvektoren durchgeführt werden um zu untersuchen welche Rolle der HIV-1 nef-Faktor bei der Infektion von Gliomazelllinien spielt.

4.4 Infektion von Hg39- und U87-Zellen mit Z1-LENTI luc

Die Erkenntnisse des 2-Plasmid-Systems sollten im nächsten Abschnitt dieser Arbeit auf ein 3-Plasmid-System erweitert werden. Durch die Verwendung von 3 Plasmiden zur Transfektion anstatt nur zweien, ist es möglich, weitere Gensequenzen in den freien Bereich des viralen Genoms zu klonieren. Für die Verpackung des Pseudotypen Z1-LENTI luc wurde das weit verbreitete HIV-1 Plasmid psPAX2 von Addgene

verwendet. Durch die externe Expression der HIV-1 Proteine können virale Vektoren verwendet werden die nicht nur Reportergene kodieren, sondern auch anti-Tumor-Gene oder das CRISPR/Cas9 System besitzen. Als lentiviraler Vektor mit einem einfachen Reporter gen wurde der lentivirale Vektor Lenti-luciferase-P2A-Neo verwendet. Dieser trägt das Luciferase-Gen und die beiden Antibiotika Resistenzen Neomycin (Neo^R) und Kanamycin (Kan^R). Die Hüllproteine des Pseudotypen stellte wie beim 2-Plasmid-System das Plasmid pME-Z1 für Zika prM/E und pMD2.G für VSV-G. Die Transfektionen wurden wie beim 2-Plasmid-System einheitlich in 24-well-Zellkulturplatten durchgeführt (2,5 µg Lenti-luciferase-P2A-Neo, 5 µg psPAX2 und 12,5 µg pME-Z1 bzw. pMD2.G). Die Ergebnisse zeigen, dass die Messwerte bei Transfektionen und Infektionen deutlich geringer ausfielen als die des 2-Plasmid-Systems. Die Transfektion mit drei Plasmiden gleichzeitig im Unterschied zu zwei Plasmid läuft wahrscheinlich schon allein aufgrund statistischer Wahrscheinlichkeiten wesentlich ineffizienter ab. Zudem nutzen die HIV-1 und Zika-Viren mit dem ESCRT-Komplex, bzw. dem sekretorischen Weg über das ER, zwei unterschiedliche Wege für das *assembly* und *budding*, um aus der Wirtszelle freigesetzt zu werden. Das Verpacken der viralen Bestandteile und Anlagerung der Zika-Hüllproteine könnte daher mit drei Plasmiden weniger effizient ablaufen als mit zwei Plasmiden. Nicht komplette env⁺ Partikel könnten bei der Produktion der Partikel dominieren. Auch bilden sich von prM/E-exprimierenden Zellen virusähnliche Partikel (VLP). Solche VLPs tragen in der Membran die Hüllproteine der Zikaviren, besitzen aber keine interne HIV-1-Struktur und könnten dadurch intakte Partikel verdrängen. Dadurch würde bei der Zellverschmelzung kein virales Genom übertragen und damit auch kein Reporter gen aktiviert. Zu beobachten war allerdings, dass mit steigender Menge an Plasmid DNA die Infektiosität der ZKÜ zunahm, während die produzierenden Zellen geringere Luciferase-Werte zeigten. Die von Kretschmer (2017) bereits diskutierte These, dass die Luciferase Werte mit größerer Menge Plasmid-DNA bei den Transfektionen abnehmen, zeigte sich demnach auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten für Zikavirus prM/E.

Wie schon erwähnt fehlt dem psPAX2-Plasmid das nef-Gen. Bereits (Auerswald, 2016) schrieb dem regulatorischen Protein eine entscheidende Rolle bei der Infektion von VeroB4-Zellen zu. Das Flavivirus charakterisierende E Protein des Zikavirus ist entscheidend für Rezeptorbindung und Zelleintritt des Pseudotypen. Doch wurde bereits die infektionssteigernde Wirkung des HIV-1-Virus durch das nef-Gen nachgewiesen. Das

HIV-1-Plasmid pNL Luc AM des infektiöseren 2-Plasmid-Systems ist entgegen psPAX2 nef+. Es ist daher zu vermuten, dass das fehlende nef-Gen ein entscheidender Faktor für die geringeren Infektionswerte des 3-Plasmid-Systems sein könnte. Eine Möglichkeit wäre ein bereits existierendes nef-Plasmid zu benutzen um nef zuzufügen. Ob ein solches 4-Plasmid-System von Vorteil sein könnte ist zu bezweifeln, da die Wahrscheinlichkeit, dass sich alle vier Plasmide in einer Zelle befinden immer geringer wird. Die erzeugten Pseudotypen könnten auch eine wilde Mischung darstellen, was die Experimente nicht besonders aussagekräftig machen würde. Daher ist zu empfehlen die Vektoren Lenti-luciferase-P2A-Neo und LentiCRISPRv2-mCherry mit einem zweiten Plasmidkonstrukt einzusetzen was sowohl den internen HIV-1-Kern produziert als auch das externe Hüllprotein Z1-prM/E. Ein solches Konstrukt steht aber bisher nicht zur Verfügung.

Die höchsten Infektionswerte von Z1-LENTI*luc* infizierten Zellen zeigten sich bei den VeroB4-Zellen mit $3,5 \cdot 10^4$ RLU/s. Die Zelllinie U87 zeigte mit $2,8 \cdot 10^4$ RLU/s ähnliche Werte. Die Hg39 Zellen wiesen die geringsten Luciferase-Aktivitäten auf ($5,8 \cdot 10^3$ RLU/s). Der Pseudotyp Z1-LENTI*luc* konnte damit die beiden Glioblastomzelllinien Hg39 und U87 infizieren. Die Werte lagen dabei deutlich über den negativen Messwerten der Kontrollen. Zudem lagen zumindest die Messwerte der U87-Zelllinie nahe denen der Referenz-Zelllinie für Flaviviren (VeroB4). Auch hier muss noch einmal auf den nef-Faktor eingegangen werden. U87-Zellen sind in der HIV-1-Forschung häufig verwendete Zellen und es gibt sie mit CD4, CXCR4, CCR5 und anderen HIV-1 Korezeptoren. Als sogenannte Reporterzelllinien werden sie benutzt um den Korezeptor-Phänotyp der verschiedenen zu bestimmen. Diese Zelllinie lässt sich mit HIV-1 sehr effizient infizieren. Besonders wichtig, im Rahmen der Interpretation der Z1-LENTI*luc* Experimente, ist die Tatsache, dass sich U87-Zellen auch sehr gut mit HIV-env Pseudotypen basierend auf dem nef- viralen Vektor pNL4-3-R-E- infizieren lassen. Für die U87 Infektion scheint der nef-Faktor keine große Rolle zu spielen. Das könnte bei den Hg39-Zellen anders sein, was die niedrigeren RLU-Werte erklären würde. Daher sind weitere Experimente um die nef-Abhängigkeit der Z1-Pseudotypen zu untersuchen nötig. Trotz der unterschiedlichen Effektivität konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass beide Pseudotypen (Z1-LENTI*luc*, Z1-HIV*luc*) eine Infektion der untersuchten Glioblastomzelllinien ermöglichen. Die Herstellung infektiöser Partikel für Glioblastome durch Transfektion des 2- und 3-Plasmid-Systems scheint daher mit dem Zikavirus prinzipiell möglich zu sein wenn auch die Ausbeuten sehr unterschiedlich sein können.

4.5 Infektion von Hg39- und U87-Zellen LENTIcherry Pseudotypen

Im dritten Abschnitt der Masterarbeit wurde ein weiteres 3-Plasmid-System untersucht. Anstatt des reinen Reportervektors Lenti-luciferase-P2A-Neo wurden die Vektoren LentiCRISPRv2-mCherry, LentiCRISPR-CXCR4.1 und LentiCRISPR-CXCR4.2 verwendet. Als Reportergen zur Messung der Infektion diente das mCherry Fluoreszenzprotein. Als Vektor für die interne HIV-1 Struktur und für die Zikavirus prM/E-Proteine wurden die Plasmide psPAX2 und pME-Z1 verwendet. Außerdem wurde zur Kontrolle für die Bildung der Pseudotypen das VSV-G Protein verwendet. Das G-Protein des VSV-Virus ist sehr effizient und besitzt ein breites Wirtsspektrum. Es existiert praktisch keine Zelllinie die sich nicht mit VSV infizieren lässt. Daher wurden hier zusätzlich VSV-G pseudotypisierte HIV-1-Partikel mit den drei CRISPR Lentivektoren hergestellt. Die resultierenden VSV-G-Pseudotypen (VSV-G-LENTIcherry, -CXCR4-4.1, -CXCR4-4.2) dienten als Referenz zur Infektion von VeroB4 Zellen mit Z1-LENTIcherry, -CXCR4-4.1 und -CXCR4-4.2. Im Vergleich zu den bisherigen Versuchen mit Z1-LENTIluc und Z1-HIVluc wurden die Zelllinien Hg39 und U87 mit VSV-G-LENTIcherry etc. infiziert (Abb. 21). Im Unterschied zu den Infektionsexperimenten mit Z1-LENTIluc und Z1-HIVluc waren die Infektionsexperimente mit den LentiCRISPRv2-mCherry basierenden Vektoren nicht erfolgreich. Dies galt für alle drei verwendeten Zelllinien, VeroB4, U87 und Hg39. Die Transfektionen aller Plasmid-Kombinationen zeigten rot fluoreszierende HEK293T-Zellen. Die Kontrollen waren eindeutig negativ (Abb. 15, 17 und 19). Die folgenden Infektionen durch ZKÜ mit nur einem verwendeten Plasmid fielen daher wie erwartet negativ aus, da unter anderem die env-Proteine fehlten. Die Infektionen hatten allerdings nicht funktioniert da keine rot gefärbten Zellen in den infizierten Kulturen beobachtet werden konnten (Abb. 16, 18 und 20). Kontrollexperimente mit dem VSV-G-LENTImcherry Pseudotyp waren erfolgreich, die Ausbeute war allerdings mit 2 infizierten Zellen aus 20–30 deutlich geringer als die der Transfektionen (4–10 infizierte Zellen aus 20–30 Zellen). Die Methode, die Herstellung LentiCRISPRv2-mCherry basierender Pseudotypen scheint daher prinzipiell zu funktionieren. Wäre aber die Ausbeute bei Z1-LENTImcherry Pseudotypen um den Faktor 10 geringer dann würden infizierte Zellen, in diesem System, nicht zu erwarten sein.

Die infektionssteigernde Wirkung des nef-Gens wurde bereits erwähnt. Das 3-Plasmid-System des Z1-LENTIluc hatte geringere Luciferase gezeigt als der nef+

Pseudotyp Z1-HIV luc (2-Plasmid-System). Dennoch wurden Zellen anhand der Luciferase-Aktivitäten scheinbar durch beide Systeme erfolgreich infiziert. Das aufwendigere Verpacken mittels dreier Plasmide könnte bei den mCherry-tragenden Plasmiden weniger effizient funktioniert haben als mit dem Lenti-luciferase-P2A-Neo Vektor, oder bei dem Z1-HIV luc Pseudotyp. Weitere Experimente mit einem optimierten 2-Plasmid-System könnten hier produktive Infektionen mit LentiCRISPRv2-mCherry basierenden Pseudotypen ermöglichen.

4.6 Ausblick

Es konnten einige Erkenntnisse aus der Arbeit abgeleitet werden. Zum einen wurde gezeigt, dass der 2-Plasmid Pseudotyp Z1-HIV luc alle drei untersuchten Zelllinien infizieren konnte. Anhand der hohen Luciferase-Aktivitäten muss ein sicherer Transfer des viralen Genoms stattgefunden haben. Interessanterweise zeigte sich dies neben den für Zikaviren permissiven VeroB4 Zellen auch bei den beiden Glioblastomzelllinien U87 und Hg39. Zum anderen konnte das 3-Plasmid-System erstmals mit dem Zika Plasmid pME-Z1 neben den VeroB4-Zellen auf die Glioblastomzellen erfolgreich angewendet werden. Auch wenn die Luciferasewerte geringer waren verglichen mit dem 2-Plasmid-System, konnten stabile Infektionen gemessen werden. Damit existiert neben dem Z1-HIV luc eine zusätzliche Alternative für zukünftige Infektionsexperimente. Hier sind allerdings weitere Optimierungen empfehlenswert. Die Effektivität des Pseudotyps Z1-LENTI luc könnte im Vergleich zum Z1-HIV luc noch weiter optimiert werden. Auch bleibt zu beachten, dass die Messschwankungen bei Transfektionen und Infektionen beider Systeme bis um das Vierfache vorlagen. Die Stabilität der Pseudotypen könnte dabei eine Rolle spielen. (Auerswald, 2016) konnte beispielsweise höhere Infektionswerte nach Verwendung von COS-1- statt HEK293T-Zellen bei der Pseudotyp Herstellung beobachten. Ein weiterer Vergleich mit den zwei Pseudotypen Z1-HIV luc und Z1-LENTI luc in HEK293T- und COS-1-Zellen könnte weitere Erkenntnisse liefern. Durch die pseudotypisierten Partikel mit den mCherry-tragenden Expressionsvektoren konnten keine erkennbaren Zellen infiziert werden. Möglicherweise muss das Protokoll zum Nachweis überarbeitet werden. Eine frühere Analyse der infizierten Zellen als 3 Tage könnte denkbar sein. Die Verwendung weiterer Plasmide ist ebenfalls eine Alternative.

Dennoch lässt sich festhalten, dass der Gentransfer durch das 2- und 3-Plasmid-System mit dem Zika-Plasmid pME-Z1 in Glioblastomzellen funktioniert hat. Durch Klonierung

könnten weitere Gene für tumorhemmende Proteine in den viralen Vektor kloniert werden. Der Gentransfer dieser Faktoren in Glioblastome durch Zika-Pseudotypen wäre eine neue Methode zur Darstellung wirksamer onkolytischer Viren. Anwendung könnte dies in einem nächsten Schritt bei primären Tumorzellen finden. Die untersuchten Linien Hg39 und U87 entstammen ursprünglich primärem Gewebe, und dienen seither als Modelllinien zur Forschung. Untersuchungen zur Permissivität von frisch entnommenen Glioblastomzellen eines Patienten könnte ein nächster Schritt sein, um die Verwendbarkeit von Zika-prM/E-HIV-1-Pseudotypen für eventuelle anti-Tumor-Anwendungen zu zeigen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden VeroB4-Affennierzellen und die beiden humanen Glioblastomzelllinien U87 und Hg39 mit Zikavirus prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln infiziert. Einige der Daten wurden publiziert in Kretschmer et al. (2020).

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein 2-Plasmid-System mit pNL Luc AM, als viralen HIV-1-Vektor und pME-Z1, als prM/E-Hüllprotein Expressionsvektor eingesetzt. Durch Transfektion von HEK293T-Zellen mit beiden Plasmiden wurde der Pseudotyp Z1-HIV*luc* hergestellt. Infektionsexperimente zeigten, dass sich die VeroB4 am effizientesten infizieren ließen. VeroB4-Zellen sind die Standardzellen für die Kultivierung von Dengue und Zikaviren und dienten daher als Vergleich zu Infektionen mit humanen U87 und Hg39 Zellen. Beide Zelllinien wurden durch Z1-HIV*luc* infiziert (Abb. 10).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein 3-Plasmid-System mit Lenti-luciferase-P2A-Neo (lentiviraler Vektor für das HIV-1 RNA Genom), psPAX2 (HIV-1 gag, pol Expression), und pME-Z1 verwendet um Zikavirus prM/E-pseudotypisierte HIV-1-Partikel herzustellen. Diese Partikel wurden als Z1-LENTI*luc* Pseudotyp bezeichnet. Als Kontroll-Pseudotyp wurde ein VSV-G-LENTI*luc*-Pseudotyp verwendet. Wie zu erwarten zeigte VSV-G-LENTI*luc* bei allen drei Zelllinien Infektionsraten von 20.000-28.000 RLU/s. Der Z1-LENTI*luc* Pseudotyp zeigte für VeroB4- und U87-Zellen RLU/s Werte von 35000 und 28000. Die RLU-Werte für Hg39-Zellen waren dagegen deutlich geringer und lagen bei 5500 RLU/s. Negative Werte der Kontrollen waren <500 RLU/s (Abb. 11).

Im dritten Teil der Arbeit wurde ein neues 3-Plasmid-System für Zika-prM/E-Pseudotypen untersucht. Im Gegensatz zu dem Z1-LENTI*luc* Pseudotyp wurde hier ein lentiviraler Vektor mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry verwendet der außerdem das CRISPR/Cas9-System trägt (LentiCRISPRv2-mCherry). Zwei Vektoren trugen gRNA-Sequenzen zum Schneiden des CXCR4-Gens. Die entsprechenden Pseudotypen heißen Z1-LENTImCherry, -CXCR4.1 und -CXCR4.2. Zur Z1-Vergleichskontrolle wurde auch hier ein VSV-G-LENTImCherry-Pseudotyp eingesetzt. Transfektionsexperimente in VeroB4, U87 und Hg39 zeigten die Funktionalität des LentiCRISPRv2-mCherry Vektors. In allen drei Zelllinien konnten mit den Z1-LENTImCherry-Pseudotypen keine Infektionen beobachtet werden. Die VSV-G-LENTImCherry Kontrollexperimente zeigten in allen drei Zelllinien positive Resultate.

6 Literaturverzeichnis

- Aiken, C., & Trono, D. (1995). Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *Journal of Virology*, *69*(8), 5048–5056.
- Ávila-Pérez, G., Nogales, A., Martín, V., Almazán, F., & Martínez-Sobrido, L. (2018). Reverse genetic approaches for the generation of recombinant zika virus. *Viruses*, *10*(11), 597.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, *35*(3), 235.
- Barnes, B., Kraywinkel, K., Nowossadeck, E., Schönfeld, I., Starker, A., Wienecke, A., & Wolf, U. (2016). *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*.
- Bieniasz, P. D. (2009). The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host & Microbe*, *5*(6), 550–558.
- Bollin, F., Dechavanne, V., & Chevalet, L. (2011). Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expression and Purification*, *78*(1), 61–68.
- Bukrinskaya, A. G. (2004). HIV-1 assembly and maturation. *Archives of Virology*, *149*(6), 1067–1082.
- Campos, G. S., Bandeira, A. C., & Sardi, S. I. (2015). Zika virus outbreak, bahia, brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(10), 1885.
- Carlson, L.-A., Briggs, J. A. G., Glass, B., Riches, J. D., Simon, M. N., Johnson, M. C., Müller, B., Grünewald, K., & Kräusslich, H.-G. (2008). Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host & Microbe*, *4*(6), 592–599.
- Chowers, M. Y., Spina, C. A., Kwok, T. J., Fitch, N. J., Richman, D. D., & Guatelli, J. C. (1994). Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *Journal of Virology*, *68*(5), 2906–2914.
- Das, S. R., & Jameel, S. (2005). Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res*, *121*(4), 315–332.
- Dick, G. W. A., Kitchen, S. F., & Haddow, A. J. (1952). Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *46*(5), 509–520.
- Diefenbacher, M. E., Reich, D., Dahley, O., Kemler, D., Litfin, M., Herrlich, P., & Kassel, O. (2014). The LIM domain protein nTRIP6 recruits the mediator complex to AP-1-regulated promoters. *PLoS One*, *9*(5), e97549.
- Dos Santos, T., Rodriguez, A., Almirón, M., Sanhueza, A., Ramon, P., de Oliveira, W. K., Coelho, G. E., Badaró, R., Cortez, J., Ospina, M., & others. (2016). Zika virus and the Guillain-Barré syndrome—case series from seven countries. *New England Journal of Medicine*, *375*(16), 1598–1601.
- 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., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M., & Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, *360*(24), 2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Enlund, E., Fischer, S., Handrick, R., Otte, K., Debatin, K.-M., Wabitsch, M., & Fischer-Posovszky, P. (2014). Establishment of lipofection for studying miRNA function in human adipocytes. *PLoS One*, *9*(5), e98023.
- Freed, E. O. (2015). HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews*

- Microbiology*, 13(8), 484–496.
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2012). Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>
- Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., & McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7271–7276.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 1–14.
- Hu, H.-P., Hsieh, S.-C., King, C.-C., & Wang, W.-K. (2007). Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology*, 368(2), 376–387.
- Ioos, S., Mallet, H.-P., Goffart, I. L., Gauthier, V., Cardoso, T., & Herida, M. (2014). Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 44(7), 302–307.
- Johnson, D. R., & O’Neill, B. P. (2012). Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era. *Journal of Neuro-Oncology*, 107(2), 359.
- Kadlubowska, P. (2019). *Darstellung und Untersuchung von ZIKV-prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln*. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg.
- Kretschmer, M. (2017). *Optimierung eines Infektionsmodells für Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel*. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg.
- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S., & Signor, L. del C. C. (2016). Phylogeny of Zika virus in western hemisphere, 2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 933.
- Li, M., Zhang, D., Li, C., Zheng, Z., Fu, M., Ni, F., Liu, Y., Du, T., Wang, H., Griffin, G. E., & others. (2020). Characterization of Zika virus endocytic pathways in human glioblastoma cells. *Frontiers in Microbiology*, 11, 242.
- Li, Q., Liu, Q., Huang, W., Li, X., & Wang, Y. (2018). Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Reviews in Medical Virology*, 28(1), e1963.
- Lin, H.-H., Yip, B.-S., Huang, L.-M., & Wu, S.-C. (2018). Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*, 36(1), 47–53.
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 59, 23–62.
- Manicassamy, B., Wang, J., Jiang, H., & Rong, L. (2005). Comprehensive analysis of ebola virus GP1 in viral entry. *Journal of Virology*, 79(8), 4793–4805.
- Mascola, J. R., Louder, M. K., Winter, C., Prabhakara, R., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Hill, B. J., Gabuzda, D., & Roederer, M. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. *Journal of Virology*, 76(10), 4810–4821.
- McCarthy, M. (2016). Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. *BMJ: British Medical Journal (Online)*, 352.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., & Schätzl, H. (2010). *Molekulare virologie*. Springer-Verlag.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), 13–22.

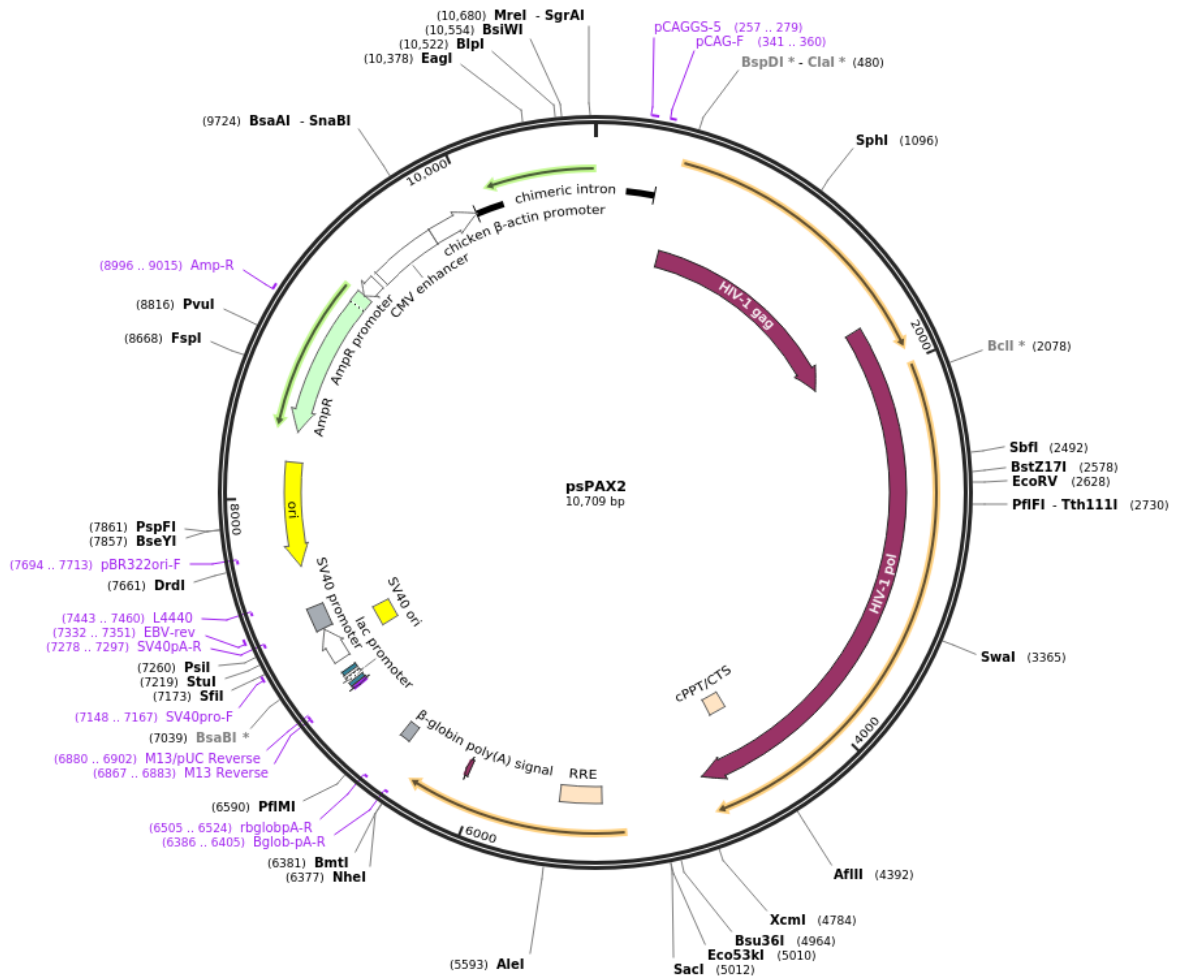
- Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics* (Vol. 5). Springer.
- Musso, D., Roche, C., Robin, E., Nhan, T., Teissier, A., & Cao-Lormeau, V.-M. (2015). Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(2), 359.
- Nie, Y., Wang, P., Shi, X., Wang, G., Chen, J., Zheng, A., Wang, W., Wang, Z., Qu, X., Luo, M., & others. (2004). Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *321*(4), 994–1000.
- Novikova, M., Zhang, Y., Freed, E. O., & Peng, K. (2019). Multiple roles of HIV-1 capsid during the virus replication cycle. *Virologica Sinica*, *34*(2), 119–134.
- Ogino, M., Ebihara, H., Lee, B.-H., Araki, K., Lundkvist, Å., Kawaoka, Y., Yoshimatsu, K., & Arikawa, J. (2003). Use of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing hantaan or seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *10*(1), 154–160.
- Organization, W. H., & others. (2016). *Zika situation report: neurological syndrome and congenital anomalies*.
- Oster, A. M., Russell, K., Stryker, J. E., Friedman, A., Kachur, R. E., Petersen, E. E., Jamieson, D. J., Cohn, A. C., & Brooks, J. T. (2016). Update: interim guidance for prevention of sexual transmission of Zika virus—United States, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, *65*(12), 323–325.
- Pérez, P., Marín, M. Q., Lázaro-Frías, A., de Oya, N. J., Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Sorzano, C. Ó. S., Ortego, J., Saiz, J.-C., Esteban, M., & others. (2018). A vaccine based on a modified vaccinia virus ankara vector expressing zika virus structural proteins controls zika virus replication in mice. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–15.
- Porse, C. C., Messenger, S., Vugia, D. J., Jilek, W., Salas, M., Watt, J., & Kramer, V. (2018). Travel-associated Zika cases and threat of local transmission during global outbreak, California, USA. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(9), 1626.
- Posen, H. J., Keystone, J. S., Gubbay, J. B., & Morris, S. K. (2016). Epidemiology of Zika virus, 1947--2007. *BMJ Global Health*, *1*(2).
- Qiu, C., Huang, Y., Zhang, A., Tian, D., Wan, Y., Zhang, X., Zhang, W., Zhang, Z., Yuan, Z., Hu, Y., & others. (2013). Safe pseudovirus-based assay for neutralization antibodies against influenza A (H7N9) virus. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(10), 1685.
- Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A., & Petersen, L. R. (2016). Zika virus and birth defects—reviewing the evidence for causality. *New England Journal of Medicine*, *374*(20), 1981–1987.
- Reiser, J. (2000). Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Therapy*, *7*(11), 910–913.
- Rey, F. A., Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2017). Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. *Current Opinion in Virology*, *24*, 132–139.
- Roossinck, M. J. (2018). *Viren!: Helfer, Feinde, Lebenskünstler-in 101 Porträts*. Springer-Verlag.
- Salcman, M. (1980). Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery*, *7*(5), 435–439.
- Sanders, D. A. (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(5), 437–442.
- Singer, I. I., Scott, S., Kawka, D. W., Chin, J., Daugherty, B. L., DeMartino, J. A., DiSalvo, J., Gould, S. L., Lineberger, J. E., Malkowitz, L., & others. (2001). CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human

- macrophages and T cells. *Journal of Virology*, 75(8), 3779–3790.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, 352(6284), 467–470.
- Smit, J. M., Moesker, B., Rodenhuis-Zybert, I., & Wilschut, J. (2011). Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*, 3(2), 160–171.
- Soezi, M., Memarnejadian, A., Aminzadeh, S., Zabihollahi, R., Sadat, S. M., Amini, S., Hekmat, S., & Aghasadeghi, M. R. (2015). Toward the development of a single-round infection assay based on EGFP reporting for anti-HIV-1 drug discovery. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 4(1), 1.
- Stensj oen, A. L., Solheim, O., Kvistad, K. A., H aberg, A. K., Salvesen,  ., & Berntsen, E. M. (2015). Growth dynamics of untreated glioblastomas in vivo. *Neuro-Oncology*, 17(10), 1402–1411.
- S ud-West, H.-A. (2013). *HIV und AIDS: Ein Leitfaden f ur  rzte, Apotheker, Helfer und Betroffene*. Springer-Verlag.
- Suzuki, R., Ishikawa, T., Konishi, E., Matsuda, M., Watashi, K., Aizaki, H., Takasaki, T., & Wakita, T. (2014). Production of single-round infectious chimeric flaviviruses with DNA-based Japanese encephalitis virus replicon. *Journal of General Virology*, 95(1), 60–65.
- Tobler, K., Ackermann, M., & Fraefel, C. (2016). *Allgemeine Virologie* (Vol. 4516). UTB.
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., & Moore, J. P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature*, 384(6605), 184–187.
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmids, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme--an overview. *Contemporary Oncology*, 18(5), 307.
- Votteler, J., & Sundquist, W. I. (2013). Virus budding and the ESCRT pathway. *Cell Host & Microbe*, 14(3), 232–241.
- Wollmann, G., Ozduman, K., & van den Pol, A. N. (2012). Oncolytic virus therapy of glioblastoma multiforme--concepts and candidates. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 18(1), 69.
- Wool-Lewis, R. J., & Bates, P. (1998). Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *Journal of Virology*, 72(4), 3155–3160.
- Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., & others. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature*, 384(6605), 179–183.
- Xu, Y., Milazzo, J. P., Somerville, T. D. D., Tarumoto, Y., Huang, Y.-H., Ostrander, E. L., Wilkinson, J. E., Challen, G. A., & Vakoc, C. R. (2018). A TFIID-SAGA perturbation that targets MYB and suppresses acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*, 33(1), 13–28.
- Yonezawa, A., Cavrois, M., & Greene, W. C. (2005). Studies of ebola virus glycoprotein-mediated entry and fusion by using pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 virions: involvement of cytoskeletal proteins and enhancement by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Virology*, 79(2), 918–926.
- 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., & others. (2017). Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. *Journal of Experimental Medicine*, 214(10), 2843–2857.

7 Anhang

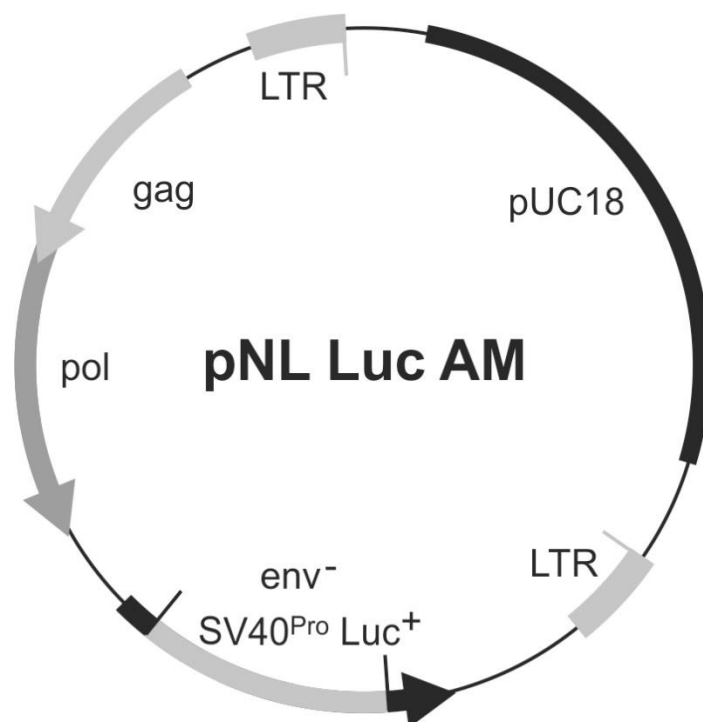
7.1 Plasmid psPAX2

Expressionsvektor für HIV-1 gag und HIV-1 pol. Addgene # 12260.



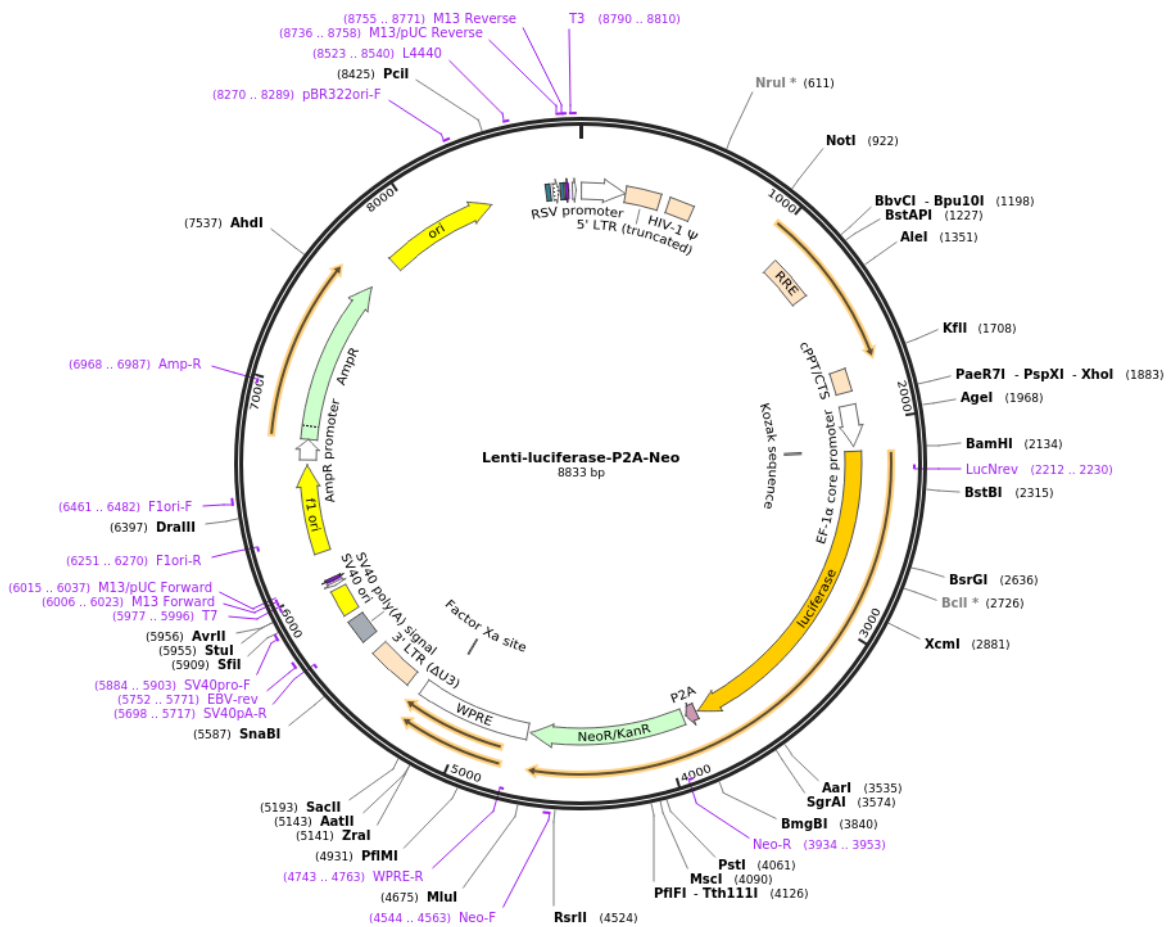
7.2 Plasmid pNL Luc AM

Viraler HIV-1 Vektor. Verpackungssystem zur Herstellung von HIV-1 Pseudotypen (gag⁺, pol⁺, env⁻, Luc⁺, nef⁺). Von: J. P. Moore; USA.



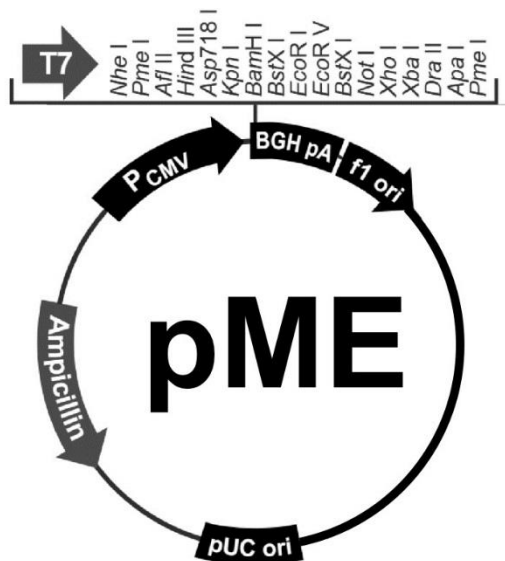
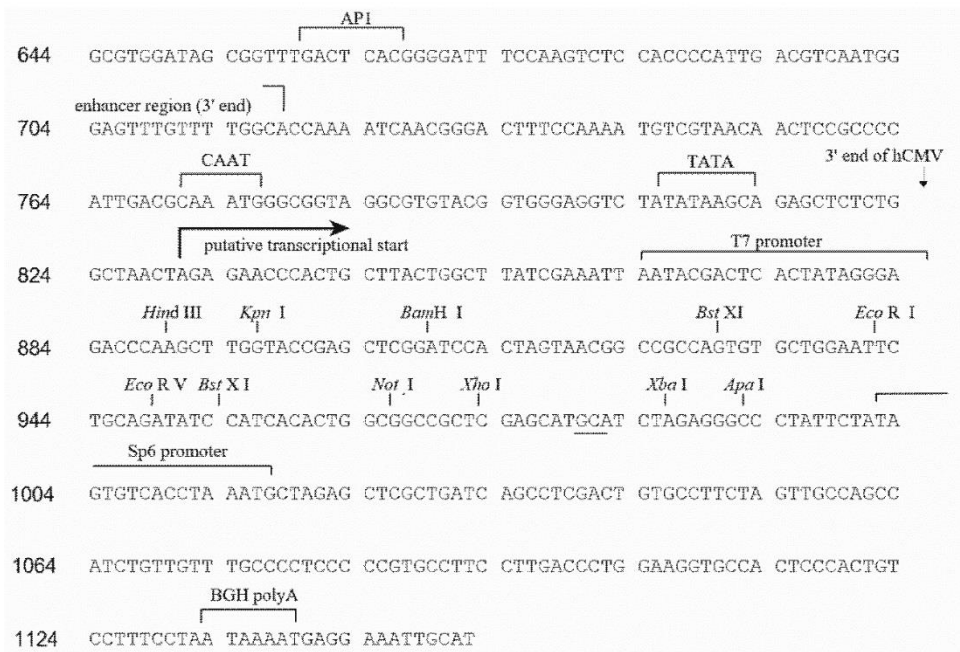
7.3 Plasmid Lenti-luciferase-P2A-Neo

Lentiviraler Vektor der dritten Generation für die Produktion des HIV-1 Genoms (gag^- , pol^- , env^- , Luc^+ , KanR , NeoR), Addgene #105621. Bildet zusammen mit psPAX2 (gag^+ , pol^+) HIV-1- Δenv -Partikel.



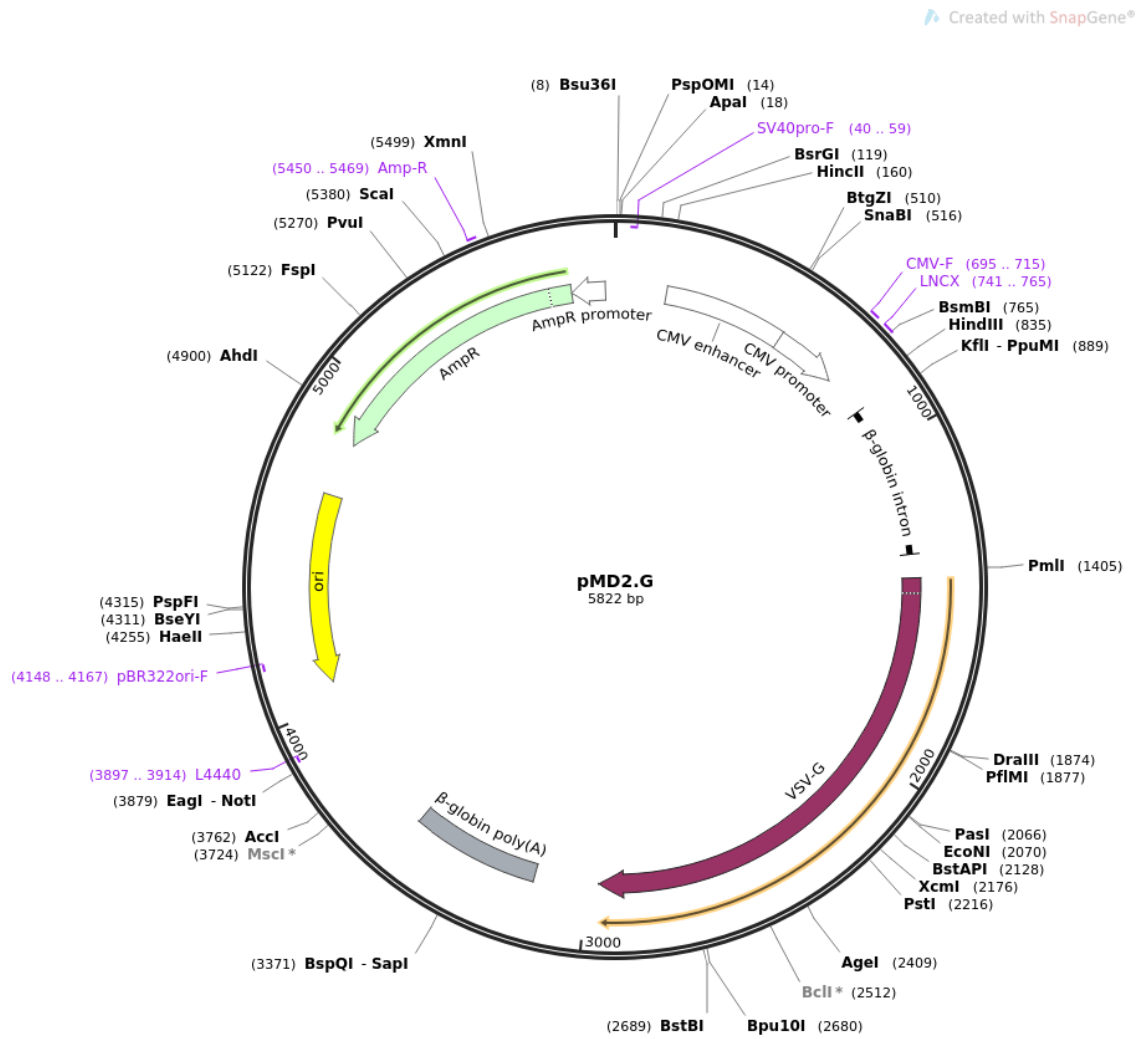
7.4 Plasmid pME

Expressionsvektor für pME. pME-Z1 kodiert für prM/E des Zikavirus Isolates Dakar41519 (Kadlubowska 2017).



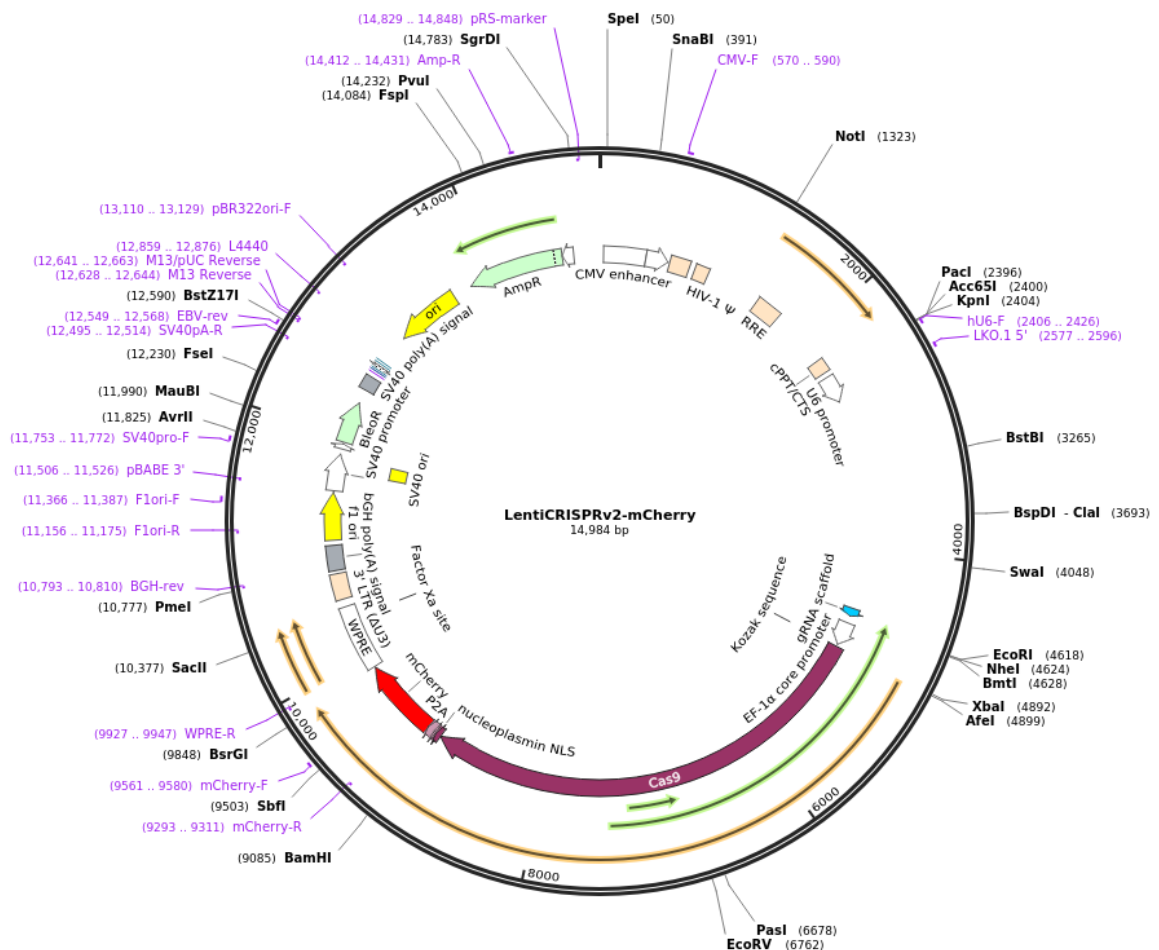
7.5 Plasmid pMD2.G

Expressionsvektor für VSV-G. Das äußere Hüllprotein des Vesicular stomatitis virus. Addgene # 12259.



7.6 Plasmid LentiCRISPRv2-mCherry

Lentiviraler Vektor für die Produktion des HIV-1 Genoms (gag^- , pol^- , env^- , $mCherry^+$), codiert auf dem HIV-1-Genom für das CRISPR/Cas-9 System. Addgene #99154. Bildet zusammen mit psPAX2 (gag^+ , pol^+) HIV-1- Δenv -Partikel.



7.7 Plasmide LentiCRISPR-CXCR4.1 und LentiCRISPR-CXCR4.2

Basieren auf dem LentiCRISPRv2 mCherry Plasmid. Die unten dargestellten Sequenzen CXCR4.1 und CXCR4.2 wurden von M. Kretschmer (2018) in die BsmBI-Schnittstelle des LentiCRISPRv2 mCherry Vektors kloniert.

CXCR4.1 5' - CACCGGCTTCTACCCCAATGACTTG - 3'
3' - CCGAAGATGGGGTTACTGAACCAA - 5'

CXCR4.2 5' - CACCGGTTCCAGTTTCAGCACATCAG - 3'
3' - CCAAGGTCAAAGTCGTGTAGTCAA - 5'

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Masterarbeit mit dem o. a. formulierten Thema ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Datum:

Unterschrift: _____

Daniel Hoffmann