

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Infektionsmodell des Ebola Virus Glykoprotein-exprimierenden
rekombinanten Vesikulären Stomatitis-Virus (rVSV-EBOV-GP) in
humanen zerebralen Organoiden: Generierung eines BSL-2 *in vitro*
Systems zur Investigation der EBOV Persistenz im Gehirn**

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie B.Sc

vorgelegt von

Amena Sarwar



Hamburg, am 18. November 2025

Gutachter: Prof. Dr. Julien Béthune (HAW Hamburg)

Gutachter: Dr. rer. nat. Lina Widerspick (BNITM)

Der experimentelle Teil wurde im Labor des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin unter Betreuung von Frau Dr. rer. nat. Lina Widerspick durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungen	V
1 Zusammenfassung	2
2 Abstract	3
3 Einleitung	4
3.1 Ebola Virus	4
3.1.1 Ebola Virus und Ebola-Viruskrankheit	4
3.1.2 Behandlung der Ebola-Viruskrankheit	4
3.1.3 Ebola Virus Genom Organisation und Lebenszyklus	5
3.2 Ebola Virus Persistenz im menschlichen Gehirn	6
3.3 VSV als Basis für den Ebola Virus Impfstoff rVSV-EBOV-GP	8
3.3.1 rVSV-EBOV-GP als Model für Ebola Virus Infektionen	9
3.4 Gehirnnorganoide in der Infektionsforschung	10
3.4.1 Humane Gehirnnorganoide mit Mikroglia und Astrozyten	10
3.4.2 Infektion humaner Gehirnnorganoide mit Viren	11
3.4.3 Infektion humaner Gehirnnorganoide mit authentischem Ebola Virus	11
4 Materialien	13
5 Methoden	16
5.1 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)	16
5.2 Humane zerebrale Organoide	16
5.3 VeroE6 Zellkultur	17
5.4 Zellsystem Qualitätskontrolle	18
5.5 Viren	18
5.6 Infektion von Organoiden	18
5.6.1 Vorbereitung Organoide	18
5.6.2 Vorbereitung Virus	19
5.6.3 Infektion Organoide und Viruskinetik	19
5.7 Plaque Assay zur Virustitration	19
5.8 Vorbereitung der immunhistochemischen Proben	21
5.9 Immunofluoreszenz Mikroskopie	21
5.10 Virus RNA Aufreinigung und Sequenzieren	22
5.11 RNA Datenanalyse	23

6 Ziele dieser Bachelorarbeit	24
7 Ergebnisse	25
7.1 Herstellung der Virusstammlösung auf VeroE6 Zellen	25
7.1.1 VSV Indiana Stammlösungsherstellung	25
7.1.2 rVSV-EBOV-GP Stammlösungsherstellung	26
7.2 VSV und rVSV-EBOV-GP replizieren vergleichbar in humanen zerebralen Organoiden	30
7.2.1 Replikationsverlauf von VSV und rVSV-EBOV-GP in zerebralen Organoiden	30
7.2.2 Replikationsvergleich von VSV und rVSV-EBOV-GP mit authentischem EBOV	35
7.2.3 ZPE Vergleich von VSV und rVSV-EBOV-GP mit authentischem EBOV	39
7.2.4 Untersuchung der Infektionsproduktivität bei Langzeitinfektion	40
7.3 Zielzelltypen von VSV und rVSV-EBOV-GP	41
7.4 Genomische Analyse von VSV und rVSV-EBOV-GP nach Langzeitinfektion im zerebralen Organoid	46
8 Diskussion	48
8.1 Herstellung von humanen zerebralen Organoiden	48
8.2 Replikation von rVSV-EBOV-GP entspricht der des VSV anstatt des authentischen EBOV in humanen zerebralen Organoiden	48
8.3 Die Zielzellen des rVSV-EBOV-GP entsprechen denen des authentischen EBOV	50
8.4 rVSV-EBOV-GP bleibt bei der Langzeitinfektion von zerebralen Organoiden genetisch stabil	51
8.5 Bewertung von rVSV-EBOV-GP als Ersatzmodell für EBOV in ZNS Persistenzversuchen	53
9 Ausblick	54
10 Danksagung	55
Literaturverzeichnis	56
Anhang	62

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung des EBOV Genoms	5
2	Ebola Virus Lebenszyklus	7
3	Schematische Darstellung des VSV Genoms	9
4	Schematische Darstellung rVSV-EBOV-GP	9
5	Zeitliche Darstellung der Erzeugung und Entwicklung humaner zerebraler Organoide aus den induzierten pluripotenten Stammzellen HMGU-1 und SCTi003-A	17
6	Grafische Darstellung des Infektionsversuchs	20
7	Grafische Darstellung der Probenentwässerung	21
8	Arbeitsablauf der Virus RNA Datengewinnung, -verarbeitung und -analyse .	23
9	Lichtmikroskopische Aufnahmen der VeroE6 Zellen vor und nach der Infek- tion mit VSV	26
10	VSV Konzentration nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen	26
11	Lichtmikroskopische Aufnahmen der VeroE6 Zellen vor und nach der Infek- tion mit rVSV-EBOV-GP	27
12	rVSV-EBOV Viruskonzentration nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen für den entsprechenden Zeitraum	29
13	VSV und rVSV-EBOV-GP infizierte zerebrale Organoide der Linie HMGU-1 .	31
14	VSV und rVSV-EBOV-GP Replikation in zerebralen Organoiden der Linie HMGU-1	32
15	VSV und rVSV-EBOV-GP Replikation in zerebralen Organoiden	34
16	Virusreplikation der EBOV für Organoidenlinie SCTi0003-A und HMGU-1 nach Tagen der Infektion	36
17	Replikationsvergleich von VSV, rVSV-EBOV-GP mit EBOV	37
18	ZPE VSV, rVSV-EBOV-GP, EBOV nach Tag 41 nach der Infektion	39
19	% Produktiv (≥ 5 PFU/mL) infizierte Organoide pro Zeitpunkt.	40
20	Immunhistochemische Färbung MAP2 (Neuronen)	42
21	Immunhistochemische Färbung GFAP (Astrozyten)	44
22	Immunhistochemische Färbung CD68 (Mikroglia)	45
23	Bildaufnahme Platten mit unterschiedlich großen Plaques	46

Tabellenverzeichnis

1	Liste der verwendeten Zelllinie	13
2	Verwendete Viren und deren Herkunft	13
3	Übersicht der Antikörper	13
4	Verwendete Chemikalien und Reagenzien	14
5	Übersicht der verwendeten Lösungen und ihrer Zusammensetzung	14
6	Übersicht der verwendeten Geräte	15
7	Übersicht der verwendeten Kits	15
8	Verwendete Software und Anwendungsbereiche	15
9	Virusarten mit Infektionsdosen pro Organoid für Infektionsversuche	19
10	Übersicht der verwendeten Antikörper	22
11	VSV Viruskonzentration nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen	25
12	rVSV-EBOV-GP Viruskonzentration nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen	28
13	Infektionsdosen des Organoidversuchs	30
14	Mutationen in Proben aus rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 mit Dosis A	47

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
BNITM	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BSL	biologische Schutzstufe (engl. <i>Biosafety Level</i>)
CiMUS	center for molecular medicine and chronic diseases research
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	embryonale Körperchen engl. <i>Embryoid bodies</i>
EBOV	Ebola Virus
ESC	embryonale Stammzelle
EVD	Ebola-Viruskrankheit engl. <i>Ebola virus disease</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FFU	<i>focus forming unit</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein engl. <i>green fluorescent protein</i>
h	Stunden
iPSCs	induzierte pluripotente Stammzellen engl. <i>induced pluripotent stem cells</i>
mABS	monoklonale Antikörper
<i>Mean±SD</i>	Mittelwert ± Standardabweichung engl. <i>mean ± standard deviation</i>
min	Minuten
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion engl. <i>polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin, Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque-bildende Einheiten <i>plaque forming unit</i>

Abkürzung	Bedeutung
rcf	relative Zentrifugalkraft engl. <i>relative centrifugal force</i>
RNA	Ribonukleinsäure engl. <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute engl. <i>revolutions per minute</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. <i>real-time reverse transcription polymerase chain reaction</i>
rVSV-EBOV-GP	rekombinantes Vesikuläres Stomatitis-Virus engl. <i>recombinant Vesicular Stomatitis virus vectored Ebola vaccine</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus Indiana Stamm engl. <i>Vesicular Stomatitis virus Indiana strain</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation engl. <i>World Health Organization</i>
ZNS	zentrale Nervensystem
ZPE	zytopathische Effekt

1 Zusammenfassung

Das Ebola Virus (EBOV) ist ein negativ-strängiges RNA Virus und verursacht die Ebola-Viruskrankheit (EDV), eine schwere und akute systemische Erkrankung mit hoher Sterblichkeitsrate.

In dieser Arbeit wurden humane Gehirnorganoide mit Vesikulärem Stomatitis Virus Indiana Stamm (VSV) sowie mit dem EBOV Impfstoff rVSV-EBOV-GP (rekombinanten Vesikulären Stomatitis-Virus) basierend auf VSV infiziert, um zu untersuchen, ob rVSV-EBOV-GP ein angemessenes BSL-2 Ersatzmodell für EBOV Persistenzversuche ist. Die Gehirnorganoide wurden in einem Zeitraum von 100 Tagen generiert und diese danach für 41 Tagen mit VSV und rVSV-EBOV-GP infiziert und mit bereits durchgeführten, authentischen EBOV Infektion verglichen. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass bei der Langzeitinfektion im Gehirnorganoid rVSV-EBOV-GP einen VSV ähnlichen Virusinfektionsverlauf aufweist, und somit für die Untersuchung im Hinblick auf die ebolavirale Replikationskinetik kein geeignetes Ersatzmodell darstellt. Des Weiteren wurden die neuronalen Zielzellen von rVSV-EBOV-GP bzw. VSV untersucht und mit den des EBOV verglichen. Dies hat gezeigt, dass rVSV-EBOV-GP die gleichen zellulären Angriffspunkte, Mikroglia, Neuronen und Astrozyten, wie EBOV hat und somit diesen Aspekt modellieren kann. Im dritten Ziel dieser Arbeit wurde untersucht, ob während einer Langzeitinfektion mit rVSV-EBOV-GP genomische Mutationen auftreten, wie bei der Anpassung von EBOV an die persistente Gehirninfection im Organoidmodell. Die Ergebnisse zeigten, dass im Verlauf einer 41 Tage andauernden rVSV-EBOV-GP Infektion lediglich eine Mutation detektiert wurde, welche sich im VSV Teil des rVSV-EBOV-GP befand. EBOV-GP blieb in diesem Zeitraum stabil. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass rVSV-EBOV-GP als BSL-2 kompatibles Ersatzmodell für EBOV Gehirnpersistenz begrenzt geeignet ist. Während rVSV-EBOV-GP durch die Expression des EBOV-GP für Identifizierung der Zielzellen eignet, entspricht der generelle Verlauf der Infektion dem des VSV. Daher sollte für die Abklärung einer viralen Langzeitkinetik von EBOV das authentische Virus verwendet werden.

2 Abstract

Ebola virus is a negative-strand RNA virus, which causes outbreaks of Ebola virus disease (EVD). EVD is characterized by fever and multiple organ dysfunction syndrome.

In this study, human brain organoids were infected with vesicular stomatitis virus, Indiana strain (VSV), as well as with the EBOV vaccine rVSV-EBOV-GP (recombinant vesicular stomatitis virus vectored Ebola vaccine) based on VSV to investigate whether rVSV-EBOV-GP represents a suitable BSL-2 surrogate model for EBOV persistence studies.

For this purpose, brain organoids were generated over a period of 100 days and subsequently infected for 41 days with VSV or rVSV-EBOV-GP. These infections were compared with a corresponding previously performed authentic EBOV infection. The results demonstrated that, during long-term infection in brain organoids, rVSV-EBOV-GP exhibits VSV like infection dynamics and therefore does not constitute an appropriate surrogate model for studying ebolaviral replication kinetics. Furthermore, the neural target cells of rVSV-EBOV-GP and VSV were examined and compared with those of EBOV. This analysis revealed that rVSV-EBOV-GP targets the same cellular populations (microglia, neurons, and astrocytes) as EBOV, thereby adequately modeling this aspect of EBOV infection. In the third aim of this study, it was investigated whether genomic mutations arise during long-term infection with rVSV-EBOV-GP, similar to the adaptive mutations observed in EBOV during persistent brain infection in the organoid model. The results showed that during a 41-day rVSV-EBOV-GP infection only a single mutation was detected, which was located in the VSV gen portion of the rVSV-EBOV-GP genome.

Based on these findings, it can be concluded that rVSV-EBOV-GP is only of limited suitability as a BSL-2 compatible surrogate model for EBOV brain persistence. While rVSV-EBOV-GP, through expression of EBOV-GP, is appropriate for identifying target cell types, the overall course of infection resembles that of VSV. Therefore, authentic EBOV should be used to investigate long-term viral kinetics in the context of EBOV persistence.

3 Einleitung

3.1 Ebola Virus

3.1.1 Ebola Virus und Ebola-Viruskrankheit

Ebola Virus (spezies *Orthoebolavirus zairense*) (EBOV) ist ein negativ-strängiges Ribonukleinsäure engl. *ribonucleic acid* (RNA) Virus, das zur Familie der Filoviren (*Filoviridae*) gehören und in Regionen West- und Äquatorialafrikas endemisch ist. EBOV stellen eine bedeutende Gesundheitsgefahr dar und wird hauptsächlich durch direkten Kontakt zwischen Menschen über infektiöse Körperflüssigkeiten und Leichname übertragen. Das Virus verursacht eine schwere und akute systemische Erkrankung, die Ebola-Viruskrankheit engl. *Ebola virus disease* (EVD) mit hoher Sterblichkeitsrate [1]. Die EVD ist durch hämorrhagisches Fieber, gastrointestinale Symptome und multiples Organversagen gekennzeichnet. Seit der Entdeckung des EBOV im Jahr 1976 in der Demokratischen Republik Kongo (ehemaliges Zaire) wurden mindestens 17 Ebola-Viruskrankheit Ausbrüche in Gabun, Guinea, der Republik Kongo oder Demokratische Republik Kongo dokumentiert [2]. Der Ebola Ausbruch in Westafrika 2013–2016 ist der bislang größte registrierte Ausbruch, mit 28 616 bestätigten, wahrscheinlichen und vermuteten Fällen sowie 11 310 offiziell verzeichneten Todesfällen bis zum Juni 2016. Die tatsächliche Krankheitslast dürfte deutlich höher liegen [3]. Aufgrund der hohen Pathogenität, Infektiosität und Sterblichkeitsrate ist EBOV als der biologische Schutzstufe (engl. *Biosafety Level*) (BSL)-4 eingestuft, wodurch Laborarbeiten mit infektiösem Virusmaterial unter diesen höchsten Sicherheitsbedingungen durchgeführt werden müssen [4]. Die Arbeit unter strengen Sicherheitsstandards erschwert die Arbeit und Forschung mit Ebola Virus. Diese wird dadurch ressourcenintensiv und schränkt zudem die Geschwindigkeit der wissenschaftlichen Entwicklung neuer Impfstoffe und Therapien deutlich ein [5, 6]. Die Diagnose EVD basiert auf einer Kombination aus klinischer Falldefinition und Labortests, in der Regel erfolgt der Nachweis der viralen RNA durch engl. *real-time reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) oder durch schnelle immunbasierte Diagnosetests zum Nachweis von EBOV Antigenen [2].

3.1.2 Behandlung der Ebola-Viruskrankheit

Die Patienten mit EVD erhalten eine gezielte unterstützende Behandlung mit intravenösen Flüssigkeitszufuhr, kristalloiden Vollelektrolytlösungen und gegebenenfalls den Einsatz von Vasopressoren, um die Entwicklung eines hypovolämischen Schocks infolge eines schweren intravasalen Flüssigkeitsverlusts und/oder eines septischen Schocks mit Gefäßlecksyndrom zu verhindern [2, 7]. In den Frühstadien sowie in der Peakphase der Erkrankung ist es von der großer Bedeutung eine kontinuierliche Zugabe ausgewogener kristalloider Lösungen sicherzustellen, um bei verschlechterndem Zustand des Patienten

(mit zunehmender Übelkeit, Erbrechen, Schwäche und allgemeinem Unwohlsein) auszugleichen bzw. entgegenzuwirken, da der Flüssigkeitsverlust sehr stark ist [2, 8–10]. Zu den unterstützenden Behandlungen gehören ebenfalls die Schmerz- und Fiebersenkung, Ernährungsunterstützung, die Behandlung von Begleiterkrankungen wie Malaria oder bakteriellen Infektionen sowie strenge Hygienemaßnahmen und psychosoziale Betreuung [8, 10]. Die spezifische Behandlung beinhaltet heutzutage vor allem den Einsatz monoklonale Antikörper (mAbs), wie mAb114 (Ansuvimab) und REGN-EB3 (Inmazeb), dies bindet gezielt an die Oberfläche des EBOV Glykoproteins (GP) und es neutralisiert [8–10]. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation engl. *World Health Organization* (WHO) hatten die Patienten, die eine frühzeitige monoklonale Antikörperbehandlung mit mAb114 bzw. REGN-EB3 gestartet haben, eine signifikant höhere Überlebensrate, als die, die ältere Wirkstoffe wie ZMapp oder Remdesivir bekamen [8, 9].

3.1.3 Ebola Virus Genom Organisation und Lebenszyklus

Das Genom des EBOV besteht aus einer etwa 19 kb langen einzelsträngigen Negativstrang-RNA, die sieben Gene umfasst und für insgesamt zehn virale Proteine bzw. Peptide kodiert sind [11, 12].

In Abbildung 1 ist das Genom vom EBOV schematisch dargestellt. Die Reihenfolge der Gene ist linear und wird von nicht-kodierenden *Leader*- und *Trailer*-Sequenzen flankiert, die wichtige regulatorische Elemente für Transkription und Replikation enthalten [12]. Das EBOV Genom ist wie folgt aufgebaut: Nukleoprotein (NP), virales Polymerase-Komplex-Protein 35 (VP35), Matrixprotein (VP40), Glykoprotein (GP), Transkriptionsaktivator (VP30), RNA-Komplex-assoziierte Protein (VP24) und Polymerase (L-Protein) [4, 11, 12]. Die Transkription erfolgt entlang des Genoms (Abb. 2), sodass ein Proteinexpressionsgradient von NP zu L-Protein entsteht [12]. Das GP Gen kodiert für GP_{1,2}, lösliche (*soluble*) GP (sGP) und das Δ -Peptid via alternativer MessengerRNA Editierung von L [13].

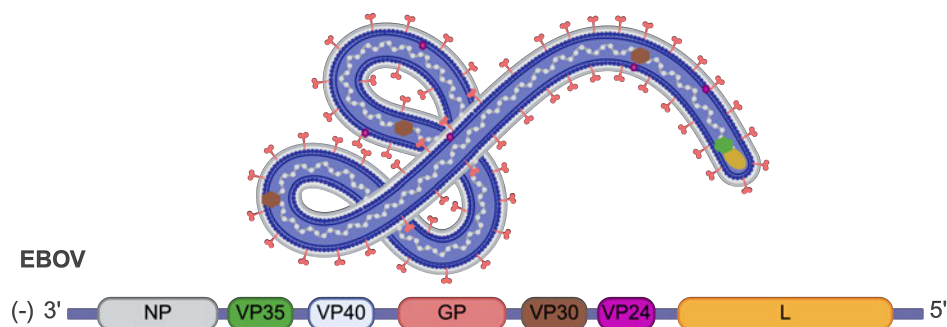


Abbildung 1: Schematische Darstellung des EBOV Genoms. Dabei sind die Gene: Nukleoprotein (NP), virales Polymerase-Komplex-Protein 35 (VP35), Matrixprotein (VP40), Glykoprotein (GP), Transkriptionsaktivator (VP30), RNA-Komplex-assoziierte Protein (VP24) und Polymerase (L-Protein). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Das EBOV ist ein hochpathogener Erreger und stellt weiterhin eine große Herausforderung für die Aufklärung der komplexen Interaktionen zwischen Wirt und Virus dar [2]. Trotz intensiver Forschung ist die Aufklärung der Determinanten, die den Verlauf und das Ergebnis einer Infektion beeinflussen, nur begrenzt gelungen [2]. Beim Menschen konnten bisher keine vollständige Information aus der Krankheitsverlauf hergestellt werden, während Tiermodell aufgrund ihrer homogenen und meist letalen Infektionsverläufe nur eingeschränkt Rückschlüsse auf wirts- oder virusspezifische Variabilität zulässt [2]. In der Abbildung 2) ist das schematische Darstellung des EBOV Lebenszyklus. (1) EBOV bindet an die Zielzelle mit Oberflächen Protein ($GP_{1,2}$) und wird (2) über Endozytose aufgenommen. Anschließend ermöglicht (3) die Spaltung des Glykoproteins $GP_{1,2}$ durch die Wirtsproteasen Cathepsin B und L (CatB, CatL) sowie die darauffolgende Bindung an Niemann-Pick-Protein 1 (NPC1) die (4) Fusion mit der Membran des späten Endolysosoms. (5) Die Replikation des (-)strängigen viralen Genoms erfolgt in *inclusion bodies*, während (6) die Transkription im Zytoplasma der Wirtszelle stattfindet. Darauf folgt (7) die Translation der viralen Proteine im Zytoplasma oder im rauen *endoplasmatischen Retikulum* (ER) (für $GP_{1,2}$). (8) Der Austritt der Viruspartikel wird durch die Interaktion des Matrixproteins VP40 mit der Zellmembran und die Oligomerisierung des Nukleoproteins (NP) vermittelt. Während der abschließenden Knospung wird $GP_{1,2}$ in die Virushülle eingebaut [2].

3.2 Ebola Virus Persistenz im menschlichen Gehirn

Normalerweise löst EBOV die schwere akute EVD aus [2]. Zusätzlich kann das Virus bei den Überlebenden der EVD noch nach mehreren Monaten bis Jahren in verschiedene Körperflüssigkeiten (Bsp.: Ejakulat, Liquor, Plazenta) detektieren werden [14]. In einem beschriebenen Fall wurde EBOV-RNA im Liquor Patientin gefunden, die neun Monate nach ihrer Entlassung eine Meningoenzephalitis infolge einer EBOV-Persistenz entwickelte [14]. Dabei wurde die Patientin aufgrund ihrer schweren Primärerkrankung zunächst mit intensiver unterstützender Therapie behandelt. Es wurde festgestellt, dass sie eine extrem hohe Viruslast und Biomarker aufwies, die in vergleichbaren Fällen auf einen tödlichen Verlauf hingedeutet hätten. Die Patientin wurde gesund, obwohl postakute Spätfolgen der EVD bestehen blieben. Neun Monate nach der Entlassung kehrte die Patientin mit Nackenschmerzen, Lichtempfindlichkeit und Fieber zurück, dabei wurde eine höhere Konzentration des EBOV-RNA im Liquor und in geringer Konzentration im Plasma nachgewiesen. Diese bestätigte die EBOV-Persistenz im zentralen Nervensystem (ZNS) [14].

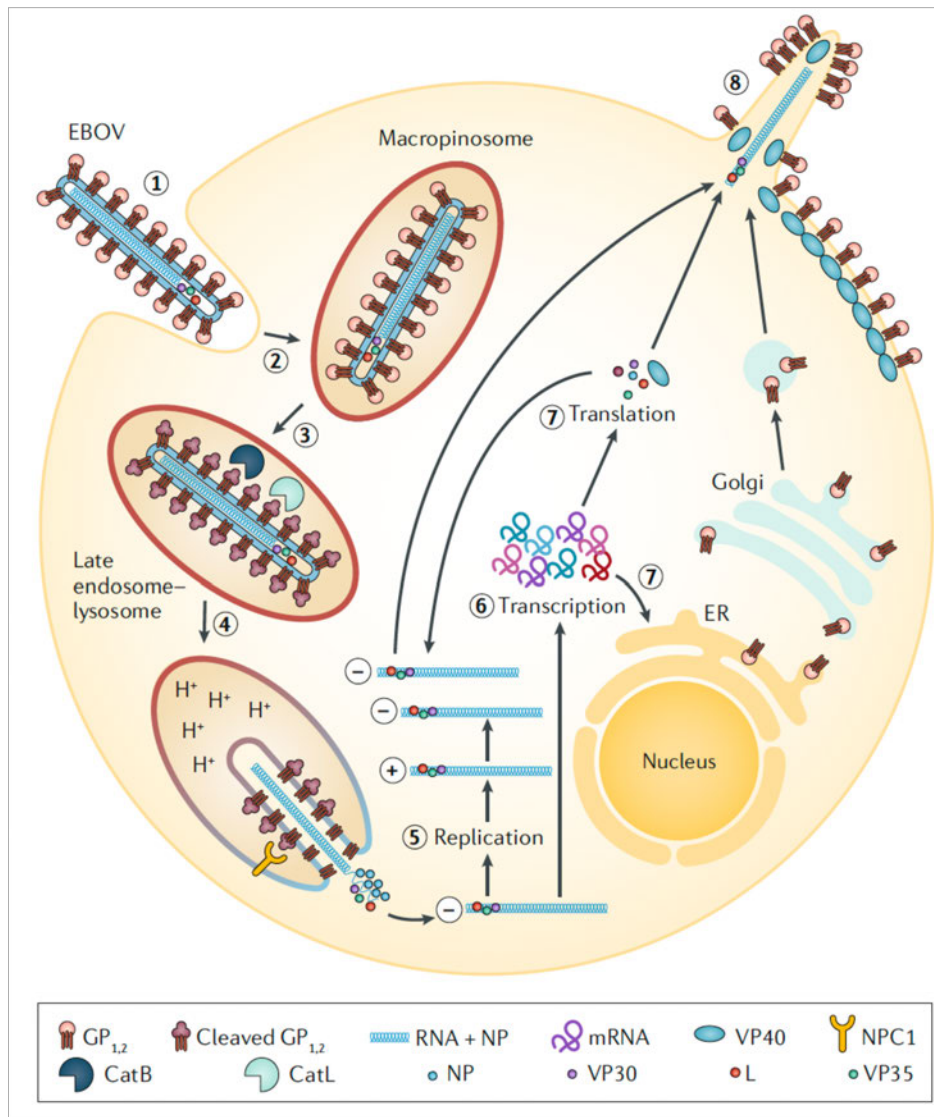


Abbildung 2: Ebola Virus Lebenszyklus Schematische Darstellung des EBOV Lebenszyklus. (1) EBOV bindet an die Zielzelle mit Oberflächen Protein ($GP_{1,2}$) und wird (2) über Endozytose aufgenommen. Anschließend ermöglicht (3) die Spaltung des Glykoproteins $GP_{1,2}$ durch die Wirtsproteasen Cathepsin B und L (CatB, CatL) sowie die darauffolgende Bindung an Niemann-Pick-Protein 1 (NPC1) die (4) Fusion mit der Membran des späten Endolysosoms. (5) Die Replikation des (-)strängigen viralen Genoms erfolgt in *inclusion bodies*, während (6) die Transkription im Zytoplasma der Wirtszelle stattfindet. Darauf folgt (7) die Translation der viralen Proteine im Zytoplasma oder im rauen *endoplasmatischen Retikulum* (ER) (für $GP_{1,2}$). (8) Der Austritt der Viruspartikel wird durch die Interaktion des Matrixproteins VP40 mit der Zellmembran und die Oligomerisierung des Nukleoproteins (NP) vermittelt. Während der abschließenden Knospung wird $GP_{1,2}$ in die Virushülle eingebaut. Abbildung übernommen aus Jacob et al. [2] mit freundlicher Genehmigung der Autoren

In einem anderen Artikel [15] wurde ebenfalls das EBOV Persistenz in ZNS beschrieben, dabei entwickelte ein Patient Verwirrtheit und Bewusstlosigkeit zwei Wochen nach der primären Genesung und in der darauffolgenden Wochen wurde keine EBOV-RNA in Blut und Synovialflüssigkeit nachgewiesen. 40 Tage später wurde jedoch EBOV-RNA im Liquor mittels RT-PCR detektiert. Zusammengefasst zeigt der Fall, dass die Behandlung

von Ebola-Patienten ein umfassendes Verständnis von virologischen und entzündlichen Mehrorgan-Komplikationen erfordert [15].

In einem weiteren Fallbericht von Mukadi-Bamuleka et al. (2024) [16] wurden zwei Patienten (22 Jahre, weiblich und 79 Jahre männlich) behandelt. Beide überlebten EVD, waren gegen EBOV geimpft und bereits mit mABS behandelt worden. Beide Patienten hatten nach der Genesung eine langfristige Nachsorge für EVD Überlebenden bekommen, einschließlich einer fortgesetzten klinischen, virologischen und immunologischen Überwachung. Viele Monate nach der Genesung litten die Patienten an einer Zustandsverschlechterung, anschließend wurde EBOV-RNA im Liquor detektiert. Beide Patienten zeigten eine reaktivierte Ebola Virus Persistenz im ZNS, was zur tödlichen Meningoenzephalitis führte. Trotz Impfung und Antikörpertherapie blieb die adaptive humorale Immunantwort unvollständig [16]. Diese Fälle zeigen deutlich, dass EBOV im menschlichen zentralen Nervensystem (ZNS) persistieren kann, was einerseits zu einer schweren lokalen Entzündung (Meningoenzephalitis) und andererseits zu einem EVD ähnlichen, tödlichen Verlauf führen kann.

3.3 VSV als Basis für den Ebola Virus Impfstoff rVSV-EBOV-GP

Im Jahr 2019 genehmigten die europäische Arzneimittel Agentur (European Medicines Agency [EMA]) und US-amerikanische Arzneimittelbehörde (FDA) den ersten Anti-EBOV Impfstoff auf Basis eines rekombinanten Vesikulären Stomatitis-Virus engl. *recombinant vesicular stomatitis virus vectored Ebola vaccine* (rVSV-EBOV-GP) unter dem Namen Ervebo (Ebanga in den USA) von Merck [17–19]. Das Basis für rVSV-EBOV-GP ist das Vesikuläre Stomatitis Virus Indiana Stamm engl. *Vesicular Stomatitis virus Indiana strain* (VSV) [17, 20].

VSV gehört zur Familie *Rhabdoviridae* und ist wie EBOV ein nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA Virus negativer Polarität [21–23]. Das Genom des VSV (Abb 3) besitzt eine Länge von etwa 11 kb und kodiert für fünf strukturelle Proteine: das Nukleoprotein (N), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), das Glykoprotein (G) sowie die RNA-abhängige RNA-Polymerase (L) [21–24]. Das Virus kann bei Nutztieren eine temporäre Erkrankung verursachen und gelegentlich ebenfalls Menschen infizieren, die in engem Kontakt mit Tieren arbeiten [22, 24]. Beim Menschen verlaufen Infektionen in der Regel asymptomatisch oder äußern sich lediglich in einer milden, selbstlimitierenden Symptomatik [22, 24]. Aufgrund seines kleinen Genoms und seiner leichten genetischen Manipulierbarkeit eignet sich VSV als Expressionsvektor für fremde Proteine. Neben seiner Fähigkeit, fremde Antigene zu exprimieren, machen auch andere Eigenschaften VSV zu einer geeigneten Plattform für Impfstoffe [22, 23]. Das Virus kann in einer großen Vielfalt von Säugetierzellen vermehrt werden, erreicht dabei hohe Titer, und es ruft starke Immunantworten *in vivo* hervor [21–24].

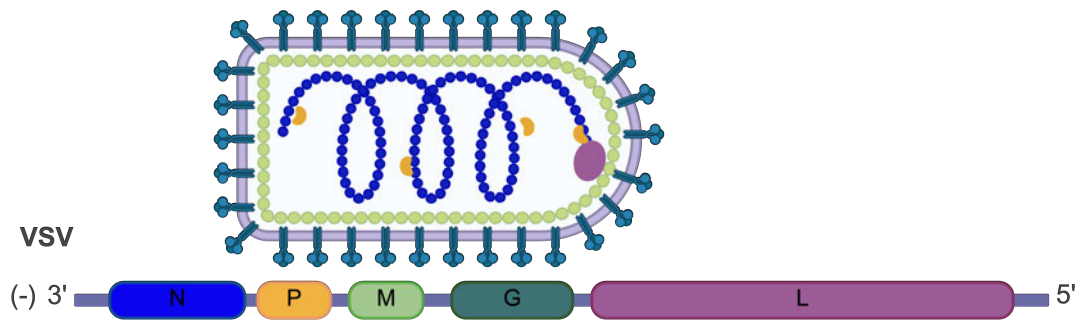


Abbildung 3: Schematische Darstellung des VSV Genoms. Dabei sind die Gene: das Nukleoprotein (N), das Phosphoprotein (P), das Matrixprotein (M), das Glykoprotein (G), das längste Protein (L). Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

Das rVSV-EBOV-GP ist ein lebend-attenuierter rekombinanter Impfstoff, bei dem das G-Protein des VSV durch das Glykoprotein (GP) des Ebola Virus ersetzt wurde (Abb. 4) [17–20].

Der Austausch von VSV-G durch EBOV-GP verhindert eine mögliche vorbestehende Immunität gegen VSV und soll potenzielle neurovirulente Risiken verhindern [17, 20]. Die resultierenden Impfvirus-Partikel behalten die typische *Rhabdovirus*-Morphologie auf, präsentieren jedoch das EBOV-GP auf ihrer Oberfläche, wodurch sie vom Immunsystem als EBOV Antigen tragend erkannt werden [17, 20, 24].

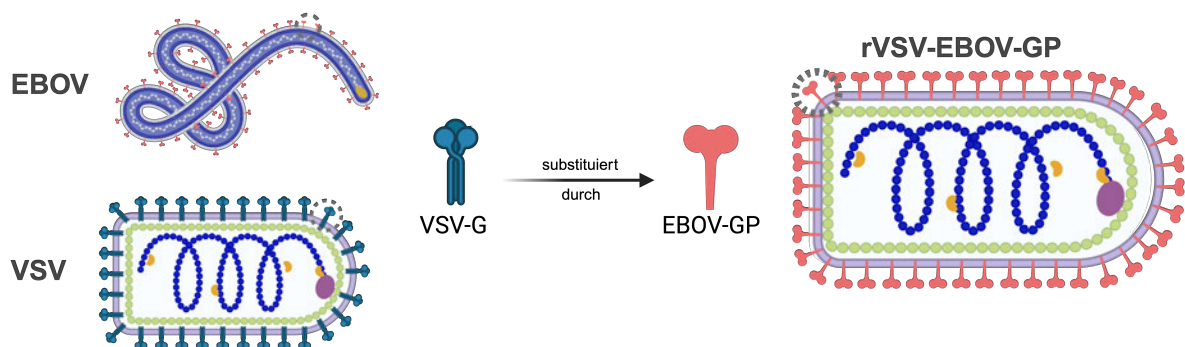


Abbildung 4: Schematische Darstellung rVSV-EBOV-GP. Dabei wurde das G Protein des VSV gegen das GP des EBOV ausgetauscht. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

3.3.1 rVSV-EBOV-GP als Modell für Ebola Virus Infektionen

Außerhalb seiner Anwendung als Impfstoff, wird rVSV-EBOV-GP als BSL-2 Modell von EBOV verwendet. In der Arbeit von Messingham et al. (2025) [25] wurden menschliche Hautexplantate mit rVSV-EBOV-GP infiziert und über einen Zeitraum von 13 Tagen untersucht. Im Überstand konnte während des gesamten Beobachtungszeitraums infektiöses Virus nachgewiesen werden. Durch die Zugabe des Interferon Inhibitors B18R in das Kulturmedium stiegen die Virusmengen deutlich an, was darauf deutete, dass das Virus ohne die antivirale Abwehr der Zellen effizienter replizieren kann. Trotz der Infektion blieben die

Hautgewebe bis mindestens Tag 12 vital und strukturell intakt. Die histologischen Analysen zeigten, dass das Modellvirus rVSV-EBOV-GP ein ähnliches Tropismus aufwies wie authentisches EBOV. Es wurden vor allem Keratinozyten in der Epidermis sowie Fibroblasten und Gefäßzellen in der Dermis infiziert [25].

3.4 Gehirnnorganoide in der Infektionsforschung

Eine große therapeutische Bedeutung haben in der wachsenden Stammzellbiologie die *in vitro* Methoden zur Modellierung menschlicher Krankheiten und deren Entwicklung [26]. Die Komplexität des menschlichen Gehirns macht es schwierig die Gehirnerkrankungen in Modellorganismen zu untersuchen, dadurch wird die Notwendigkeit eines *in vitro* Modells der menschlichen Gehirnentwicklung deutlicher. Gehirnnorganoide sind ein dreidimensionales (3D) Modell der Zellkultur, die aus humanen pluripotenten Stammzellen (hPSCs), embryonale Stammzelle (ESC) oder aus induzierte pluripotente Stammzellen engl. *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) gezüchtet werden. Im Vergleich zu traditionellen zweidimensionalen (2D) Kultursystemen und immortalisierten Zelllinien reproduzieren die Gehirnnorganoide die zelluläre Heterogenität und bieten eine komplexe Umgebung, mit verschiedener Neuronenpopulationen, Gliazellen und neuronalen Vorläuferzellen [26–28]. In der Arbeit von Lancaster et al. wurde die Methode zur Erstellung des zerebralen Gehirnnorganoide aus humanen iPSCs erstmals detailliert beschrieben [26, 28]. Die zerebralen Organoide entwickeln eine Vielzahl an Gehirnregion heraus, die in der Lage sind sich gegenseitig zu beeinflussen [26, 28]. Darüber hinaus weisen die zerebralen Kortexregionen eine dem frühen menschlichen Gehirn ähnliche Organisationsstruktur auf. Ein wichtiger Punkt ist, dass die Gewebe nach einiger Zeit eine Größenbegrenzung erreichen. Dies liegt an der eingeschränkten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Kern, was zu nekrotischen Bereichen führen kann [28]. Zerebrale Organoide sind ein wertvolles Modell, um menschliche Astrozyten sowie deren Interaktion mit Neuronen und Mikroglia zu untersuchen [29].

3.4.1 Humane Gehirnnorganoide mit Mikroglia und Astrozyten

Mikroglia sind die Gewebemakrophagen des Gehirns, sie sind in der Lage die absterbende Zellen, Krankheitserreger mit Hilfe von Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*) sowie Moleküle durch Phagozytose zu beseitigen [30]. Mikroglia stammen aus mesodermale Progenitoren, wogegen Neuronen und Astrozyten aus neurektodermalen Vorläuferzellen hervorgehen [30, 31]. In reifen zerebralen Organoiden entwickeln sich immunologisch kompetente Mikroglia, die in deren Funktionen den aus dem menschlichen Gehirn isolierten Zellen entsprechen [31]. Außer den immunologischen Funktionen kontrollieren Mikroglia die Synapsenbildung sowie die Beseitigung von Synapsen. Eine dysfunktionale Interaktion zwischen Mikroglia, Neuronen und Astrozyten wird in

Verbindung zu neurodegenerativen und Erkrankungen Neuroentwicklungsstörungen gebracht, wie Alzheimer, Autismus und Schizophrenie [30, 31]. Die meisten bisherige Studien zu Neuro- und Gliazellen Interaktion wurden an Nagetieren durchgeführt, weil die geeignete humane Modellbildung fehlte. Angesichts der komplexen Zusammenarbeit zwischen Astrozyten und Mikroglia, sowie ihrer Wechselwirkung mit Neuronen an Synapsen, stellen zerebrale Organoide ein geeignetes Modell dar, um ebenfalls menschliche Astrozyten und Mikroglia in einer 3D-Umgebung zu untersuchen [29, 31].

3.4.2 Infektion humaner Gehirngorganoide mit Viren

Klassische neurotrope RNA-Viren (z. B. Tollwutvirus, West-Nil Virus, Powassan Virus) sind in der Lage, das Gehirn und Rückenmark zu infizieren und somit Meningitis, Enzephalitis, Mikrozephalie oder das Guillain-Barré-Syndrom zu verursachen [32]. Traditionelle Tiermodelle haben erhebliche Fortschritte beim Verständnis ihrer Viruspathogenese und Wirtszelle-Virus Interaktion geliefert und zur Impfstoffentwicklung sowie Entwicklung von Behandlungsstrategien beigetragen. Trotzdem weisen sie Einschränkungen bei der Nachbildung der Interaktionen zwischen Krankheitserregern und der Wirtszelle auf [27]. Gehirngorganoide stellen ein neues, Tierversuchsalternativenmodell dar, um erste Einblicke in die Infektionsmechanismen und Zielzelltypen (Tropismus) eines Virus zu gewinnen sowie kurz- und langfristige Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit zu gewinnen. Darüber hinaus ist es von entscheidender Bedeutung, ein experimentelles System zu etablieren, das die Entwicklung von Maßnahmen ermöglicht, um die Virusreplikation zu stoppen und die menschliche Gesundheit zu schützen. Gehirngorganoide wurden bereits verwendet, um die Infektionsverlauf SARS-CoV-2 oder auch Zika Virus zu untersuchen. Die Ergebnisse lieferten die Information über Zielzellen des jeweiligen Virus, die neuronalen Veränderungen nach der Infektion sowie Funktion von Rezeptoren [27, 33, 34]. Gehirngorganoide wurden ebenfalls die Forschungsmodell für *herpes simplex virus* Typ 1 (HSV-1) verwendet. Anhand dieser Modell konnte die Interaktion zwischen Wirt und Virus präzise dargestellt werden und die präventive Behandlungsstrategien entwickelt werden [27, 35].

3.4.3 Infektion humaner Gehirngorganoide mit authentischem Ebola Virus

Wie bereits in der Abschnitt 1.1 beschrieben wurde, verursacht das EBOV die EVD, das zu schweren hämorrhagischen Fieber, gastrointestinalen Symptomen und multiplen Organversagen, sowie Fälle mit Viruspersistenz im ZNS und daher Meningoenzephalitis führt [1]. Die Erforschung dieser Persistenz erfordert Arbeit mit dem Virus in BSL-4 Laboren, was den wissenschaftlichen Fortschritt erheblich erschwert [4].

In der Arbeit von Dr. rer. nat. L. Widerspick wurde die Persistenz des EBOV im menschlichen ZNS mit Hilfe der zerebralen Gehirngorganoide untersucht. Es wurde die Persistenz in den Gehirngorganoiden sowie die Wechselwirkungen zwischen Wirtszellen und dem Vi-

ruserreger untersucht. Dabei wurden die zerebrale Organoide 120 Tage mit EBOV infiziert und die langfristige Virusreplikation und Virusfreisetzung gemessen. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass EBOV in der Lage ist, 120 Tage in den Gehirnorganoiden zu replizieren. Lassa Virus, das als Kontrolle verwendet wurde, wies einen anderen Verlauf vor, was darauf deutet, dass je nach Virus andere Kinetik entsteht. EBOV konnte in Neuronen, Astrozyten sowie Mikroglia detektiert werden, während EBOV Persistenz mit einer steigenden Freisetzung nicht infektiöser viraler RNA assoziiert war. Die Analyse der Zielzellen während der Infektion hat gezeigt, dass Astrozyten keine starke Immunantwort aufweisen, wobei Mikroglia stark auf die Infektion mit EBOV reagieren. Astrozyten verblieben in einem regulatorischen Zustand, in dem morphogenetische und regenerative Signalwege angereichert waren. Die Mikrogliazellen zeigten neben starken Inflammation in späteren Infektionsphasen eine verstärkte Aktivierung proliferativer und migratorischer Signalwege. Das EBOV Genom war nach 120 Tagen an einigen Stellen mutiert, unter Anderem im GP. Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass im Gehirnorganoid persistente, langfristige Infektionen modelliert werden können, welche sich von akuten Infektionen (< 2 Wochen) unterscheiden [36].

rVSV-EBOV-GP wird oft als BSL-2 Modell für EBOV verwendet, und eine Handhabung im BSL-2 Labor würde langfristige, laborintensive Persistenzversuche stark vereinfachen. Jedoch ist es unklar, ob der genomische VSV Hintergrund die Modellierung viraler Persistenz erlaubt. Dies gilt es im Folgenden zu untersuchen.

4 Materialien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinie

Zelllinien	Hersteller
iPSC (HMGU1 und SCTi003-A)	Core Facility des Helmholtz Zentrums
Vero E6	Virus Immunologie

Tabelle 2: Verwendete Viren und deren Herkunft

Name	Quelle
rVSV-EBOV-GP	Marylyn Addo (IIRVD UKE), Hamburg
VSV Indiana Stamm	Carmen Rivas Vázquez (CiMUS), Santiago de Compostela, Spanien

Tabelle 3: Übersicht der Antikörper

Name	Antikörper	Hersteller
Alexa Fluo 568	Sekundärantikörper	Invitrogen, A11011
Alexa Fluor 647	Sekundärantikörper	Invitrogen, A21235
CD68	Primärantikörper	Cell Signaling #76437
EBOV GP	Primärantikörper	Merck
GFAP	Primärantikörper	Zytomed RBK037
MAP2	Primärantikörper	Abcam ab183830
VSV-G	Primärantikörper	Santa Cruz Biotechnology sc-365019

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Anti-Adherence Rinsing Solution	STEMCELL Technologies
Citronensäure-Monohydrat	MERCK
DMEM	PAN-Biotech
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Formaldehyd	Merck
Gentle Cell Dissociation Reagent	STEMCELL Technologies
Kristallviolett	Serva
Matrigel	Corning
Methylcellulose	MERCK
Mounting Medium mit DAPI	BIOZOL
Natriumhydroxid Plätzchen	MERCK
PBS	PAN-Biotech
Penicillin/Streptomycin (10 000 µg/µL)	Gibco
ROCK-Inhibitor	Selleck Chemicals
RPMI 1640	Gibco
STEMdiff Cerebral Organoid Differentiation	STEMCELL Technologies
STEMdiff Cerebral Organoid Maturation	STEMCELL Technologies
StemMACS iPS-Brew XF	Miltenyi Biotec
Triton X	Carl ROTH
Trypsin-EDTA Solution	MERCK

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Lösungen und ihrer Zusammensetzung

Name	Verwendungszweck	Zusammensetzung
1 % Kristallviolett Lösung	Plaque Assay	10 g Crystal Violet, 200 mL 99,9 % Ethanol, 800 mL ddH ₂ O
4 % Formaldehyd Lösung	Virus Inaktivierung	4 % Formaldehyd (v/v) zu 1 L PBS
DMEM	Vero E6 Zellen	5 % (v/v) FBS, 1 % (v/v) P/S
Methylcellulose Lösung	Plaque Assay	Methylcellulose DMEM 2,5 % (v/v) FBS, 1 % P/S
Methylcellulose	Plaque Assay	16,8 g in 600 mL ddH ₂ O

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Geräte

Name	Hersteller	Model
Analysewaage	KERN	ALJ220-4NM
Digitaler Zähler für Zellen	Logos Biosystems	LUNA-II
Fluorescence Microscope	Zeiss	Axio Imager.M2
Magnetrührer	Heidolph	MR3001
Orbital Laborschüttler	VEVOR GmbH	–
pH-Meter	Hanna Instruments	HI221
Zentrifuge 50/15 ml	Eppendorf	Centrifuge 5810 G
Zentrifuge Eppis	Hettich	MIKRO 185

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Kits

Name	Hersteller
Virus RNA Purification	Qiagen

Tabelle 8: Verwendete Software und Anwendungsbereiche

Name	Verwendungsbereich
BioRender.com (BioRender, Toronto, ON, CA)	Abbildungserstellung
FIJI / ImageJ2 V2.3.0/1.53q (open source)	Datenanalyse, -verarbeitung
MS Office 2021 (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA)	Datenanalyse
Overleaf.com (Digital Science UK Limited, London, UK)	Schreiben dieser Arbeit
Prism 10 (GraphPad, Boston, MA, USA)	Datenanalyse
The European Galaxy Server UseGalaxy.eu (open source)	RNA-Datengewinnung, -verarbeitung, -analyse

5 Methoden

5.1 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC)

Vor dem Auftauen induziert pluripotenter Stammzellen wurde eine 6-Well Platte mit 1 mL eiskaltem engl. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 Medium (ohne Nährstoffe) mit 1:100 verdünntem Matrigel beschichtet und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Direkt vor dem Aufbringen der Zellen wurde die Lösung entnommen und mit *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Die iPSCs (HMGU-1 und SCTi003-A) wurden vorher in 90 % *fetal bovine serum* (FBS) mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -135 °C gelagert und nach dem Auftauen auf 1 bzw. 2 Wells einer 6-Well Platte aufgeteilt und anschließend in *StemMACS iPS-Brew XF* Medium mit 10 µM Rho-Kinase (ROCK)-Inhibitor für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag, nach maximal 24 h, wurde das Medium ausgetauscht und durch *StemMACS iPS-Brew XF* Medium ohne ROCK-Inhibitor ersetzt. Nach 2 bis 6 Tagen wurde die Konfluenz und Bildung von abgegrenzten Kolonien mit Hilfe des Lichtmikroskops überprüft. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen aufgeteilt. Dabei wurde das alte Medium entfernt und die Zellen einmal mit 1 mL PBS gewaschen. Um die Zellen von der Platte zu lösen, wurde 1 mL *gentle cell dissociation reagent* in die Wells gegeben und der Zellresten unter dem Mikroskop beobachtet. Ab Ablösung des Resten wurden die Zellkolonien mit einer 1000 µL abgeschnittenen, sterilen Pipettenspitze vorsichtig aufgesammelt und in 3 mL bereits aufgetautem *StemMACS iPS-Brew XF* Medium (mit Nährstoffen) mit 10 µM ROCK-Inhibitor hinzugegeben und für 3 min bei 200 rcf zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entsorgt und die Zellen im entsprechenden Medium (*StemMACS iPS-Brew XF*) resuspendiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:5 aufgeteilt und für die nächsten 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium ohne ROCK-Inhibitor ersetzt. Dieser Schritt wurde täglich bis zur nächsten Passage wiederholt.

5.2 Humane zerebrale Organoide

Die humanen zerebralen Organoide wurden basierend auf dem Protokoll von Lancaster u. a. [28] und den Herstellerangaben [37] des STEMCELL Technologies STEMdiff Cerebral Organoid Kits hergestellt. HMGU-1 und SCTi003-A iPSCs wurden bis zu einer 70 % Konfluenz gehalten, sodass große, flach begrenzte iPSCs Kolonien gebildet wurden, bevor sie geerntet und zu einer Einzelzellsuspension reduziert wurden. Im Folgenden wurden 9000 Zellen pro Well einer 96-Well Rundbodenplatte mit einer chemisch inerten und antiadhäsiven Oberfläche im entsprechenden Medium ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 48 h und 96 h wurde jeweils 100 µL Ergänzungsmedium hinzugegeben und weiter inkubiert. Nach fünf Tagen seit der Entstehung embryonaler Körperchen

engl. *Embryoid bodies* fand die neuronale Induktion statt, dabei wurde das alte Medium entfernt und durch 150 μL Basal Medium 1 mit Supplement B ersetzt. Zwei Tagen nach der neuronalen Induktion, wenn EBs runde, optisch transluzente Ränder aufwiesen, wurden diese in das Matrigel eingebettet, in 6-Well Platte überführt und für 96 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Die 6-Well Platte wurde vor der Überführung mit einer Anti-Adhäsions-Spüllösung (engl. *Anti-Adherence Rinsing Solution*) beschichtet, um eine Zelladhäsion zu verhindern. Nach 72 h waren kleine Organoide mit oberflächlichen neuroepithelialen Ausstülpungen sichtbar. Das Medium wurde alle 3–4 Tage durch frisches Basal Medium 2 mit Supplement E ersetzt und bei 37 °C, 5% CO_2 auf dem Schüttler bei 60 rpm inkubiert. Im Artikel von Lancaster u. a. [28] galten die Organoide nach 40 Tagen als ausgereift, dennoch um eine ausreichende Gliazellbildung sicherzustellen, wurden die Organoide erst ab 100 Tagen für Experimente verwendet. Die Abbildung 5 stellt die Erstellung bzw. Entwicklung der humanen zerebralen Organoiden dar.

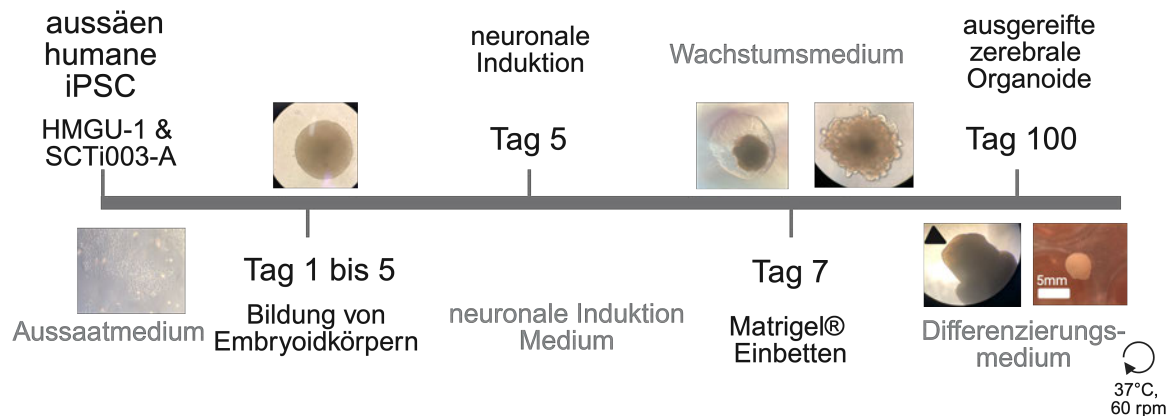


Abbildung 5: Zeitliche Darstellung der Erzeugung und Entwicklung humaner zerebraler Organoide aus den induzierten pluripotenten Stammzellen HMGU-1 und SCTi003-A. Die Abbildung wurde aus der Arbeit von Widerspick [36] entnommen.

5.3 VeroE6 Zellkultur

VeroE6 Zellen wurden mit 13 mL bzw. 23 mL *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 5 % FBS sowie 1 % Penicillin, Streptomycin (Pen/Strep) Medium in der 75 cm^2 bzw. 175 cm^2 Kultivierungsflaschen bei 37 °C, 5% CO_2 inkubiert. Bei einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen mit PBS zweimal gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA zur Zellablösung bei 37 °C, 5% CO_2 für 2 min inkubiert. Nachfolgend wurde 10 mL DMEM mit 5 % FBS sowie 1 % Pen/Strep zum Aufsammeln der Zellen hinzugegeben und bei 300 rcf für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet im Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels des digitalen Zellzählers LUNA-II bestimmt. Die Zellen wurden daraufhin entsprechend für die Aussaat aufgeteilt. VeroE6 Zellen wurden zur Viruspropagation und für Plaque Assays verwendet.

5.4 Zellsystem Qualitätskontrolle

Alle untersuchten zellbasierten Systeme wurden routinemäßig mit einer Polymerase-Kettenreaktion engl. *polymerase chain reaction* (PCR) (PromoCell, PK-CA91-1048) auf das Vorliegen von Mykoplasmen getestet. Die Überprüfung der Pluripotenz erfolgte bei den HMGU1- und SCTi003-A iPSC mithilfe des *StemLight™ Pluripotency Antibody Kits* (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA, 9656) sowie durch die Analyse ihrer Fähigkeit zur Ausbildung undifferenzierter embryonaler Körper. Die Integrität ausgereifter zerebraler Organoiden wurde sowohl durch makroskopische Beobachtung als auch durch gezielte histologische Untersuchungen der Zellzusammensetzung bewertet.

5.5 Viren

Der VSV Indiana Stamm (species *Vesiculovirus indiana*, Ref. Seq. OR712768) wurde von Carmen Rivas Vázquez (center for molecular medicine and chronic diseases research [CiMUS], Santiago de Compostela, Spanien) und der rVSV-EBOV-GP Impfstamm wurde von Marylyn Addo (Institut für Infektionsforschung und Impfstoffentwicklung [IIRVD] des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE)) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. VSV wurde in VeroE6 Zellen für 1 Tag und der rVSV-EBOV-GP für 6 Tage in DMEM mit 2,5 % FBS und 1 % Pen/Strep amplifiziert und innerhalb von drei Passagen seit dem ursprünglichen Isolat verwendet. Für die Herstellung von VSV wurden eine *multiplicity of infection* (MOI) von 0,001 und 0,01, und für rVSV-EBOV-GP 0,01 und 0,1 eingesetzt.

5.6 Infektion von Organoiden

5.6.1 Vorbereitung Organoiden

Für die Infektion wurden die Organoiden grundsätzlich ein Organoid pro Well in 24-Well Platten aufgeteilt. Hierbei wurden die Platten entsprechend der Behandlung getrennt, so dass eine Kreuzkontamination verhindert wurde. Dazu wurden 24-Well Platten mit 1 mL *Anti-Adherence Rinsing Solution* und anschließend zweimal mit 1 mL PBS abgespült. Die einzelnen Organoiden wurden folgend in einzelne Wells aufgeteilt und mit 1 mL PBS abgewaschen. Um die Organoiden beim Verteilen nicht zu zerstören, wurden sie mit abgeschnittenen 1000 µL Pipettenspitzen aufgesammelt und in jeweiligen Well platziert. Die Gruppenzuordnung verlief verblindet und Organoiden aus einem Ursprungs-6-Well wurden auf alle Gruppen aufgeteilt, um Verzerrung zu vermeiden.

5.6.2 Vorbereitung Virus

Die Dosis der Viren wurde entsprechen ihres Titters berechnet. Die entsprechende Menge des Virus wurde in DMEM ohne FBS und mit 1% Pen/Strep gegeben und zu einem Gesamtvolumen von 500 μL pro Organoid aufgefüllt. Die genaue Virusdosis ist in der Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Virusarten mit Infektionsdosen pro Organoid für Infektionsversuche. Dabei liegt die Dosis bei A bei 10^4 PFU/Organoid und bei B bei 10^5 PFU/Organoid.

Virus	Dosis _{verwendet} [PFU/Organoid]
VSV	(A) 10^4
VSV	(B) 10^5
rVSV-EBOV-GP	(A) 10^4
rVSV-EBOV-GP	(B) 10^5

5.6.3 Infektion Organoide und Viruskinetik

Die vorbereiteten Infektionslösungen wurden in 500 μL pro Well mit jeweils einem gewaschenen Organoid gegeben. Die Platte wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h wurde das Infektionsmedium entsorgt und mit 1,5 mL frischem Maturation Medium (Organoidmedium) ersetzt. Anschließend wurden 500 μL Probe (d_0) entnommen, damit der virale Titer zum Startpunkt bestimmt werden kann.

Für die Viruskinetik wurden jeweils weitere 500 μL Probe an Tag 1-14, 17, 25, 28, 33, 37 und 41 entnommen und durch 500 μL frisches Medium ersetzt (Abb. 6). Alle Proben wurden bei 2000 rcf für 10 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bei -20 °C aufbewahrt. Als Negativkontrolle wurden grundsätzlich uninfigierte, mit PBS behandelte Organoide mitgeführt. Unterschiedliche Viren wurden auf separaten Platten behandelt, um Kontamination zu vermeiden.

5.7 Plaque Assay zur Virustitration

Mit Hilfe von Plaque Assays wurden die *plaque forming units* (PFU), der Titer, der Viren bestimmt. Dabei wurden 500 μL VeroE6 Zellsuspension pro Well in entsprechendem Medium auf einer 24-Wellplatte mit einer Zellzahl von 3.4×10^6 Zellen/Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C, 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wurde beim Erreichen einer Konfluenz von 80% der Assay fortgesetzt. Auf eine 96-Wellplatte wurde 135 μL DMEM (Spalte 2-11 ohne FBS mit 1% Pen/Strep) sowie die 180 μL Probe (Spalte 1) in Duplikaten aufgelegt. Die Probe wurde seriell über die Platte in die nächste Spalte verdünnt (60 μL). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 200 μL Probe aus jeder zweite Spalte

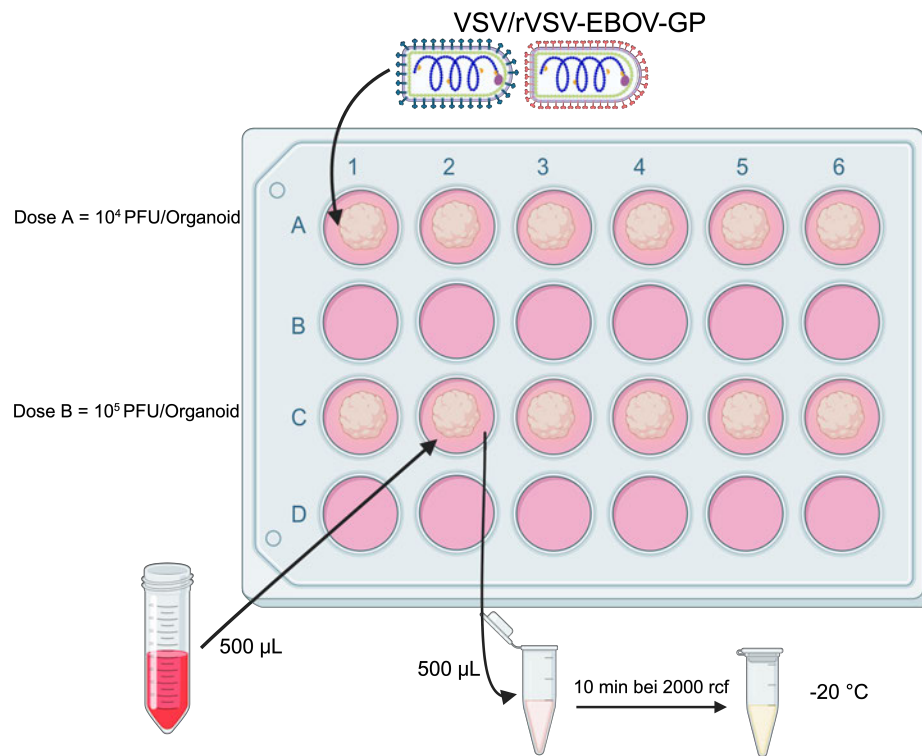


Abbildung 6: Grafische Darstellung des Infektionsversuchs. Das entsprechende Virus wurde zu den Organoiden hinzugefügt und die Proben wurden an Tag 1-14, 17, 25, 28, 33, 37 und 41 entnommen, dabei wurde 500 µL des Überstands durch frisches Medium ersetzt. Die Abbildung wurde mit BioRender.com erstellt.

(1,3,5,7,11) wurden auf die 24-Wellplatte zu den Zellen hinzugefügt, sodass eine 1:10 serielle Verdünnung resultierte. Die Platten wurden für 1 h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Nach 1 h wurde der Überstand dekantiert und durch Methylcellulose Lösung ersetzt. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C, 5% CO₂ über 2-4 Tage inkubiert. Die Plaques (d.h. die Löcher im Zellrasen) wurden mit Hilfe des Lichtmikroskops bestätigt. Danach wurde das Medium dekantiert und die Platten in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 1 h bei RT inaktiviert. Im Anschluss wurden die Platten im doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) gewaschen und 500 µL Kristallviolett pro Well hinzugefügt und für 10 min inkubiert. Final wurde das Kristallviolett entfernt und die Platten wurden erneut in ddH₂O gewaschen. Daraufhin wurden die Plaques gezählt und der Titer nach der Formel 1 ermittelt. Dabei ist c_{Virus} die Viruskonzentration, VF - Verdünnungsfaktor und V_{Probe} Probenvolumen der Infektion (200 µL).

$$c_{\text{Virus}} \text{ (PFU/ml)} = \frac{\left(\frac{\text{Plaques}_{\text{Well 1}}}{\text{VF}_{\text{Well 1}}} + \frac{\text{Plaques}_{\text{Well 2}}}{\text{VF}_{\text{Well 2}}} \right)}{2} \times \frac{1000 \mu\text{l}}{V_{\text{Probe}}} \quad (1)$$

5.8 Vorbereitung der immunhistochemischen Proben

Die Organoide wurden unter sterilen Bedingungen in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit 500 μ L 10 % Formalin überführt. Wie in der Abbildung 7 dargestellt, wurde nach einer entsprechenden Inaktivierungszeit von mindestens 24 h das Formalin entfernt. Vor dem Entwässern in der Histokinette wurden die Proben mit 2 % Agar übergossen, um sie zu stabilisieren. Daraufhin wurden die eingebetteten Proben in die Kassette gelegt und zum Entwässern vorbereitet. Nach dem Entwässern wurde die Probe in einer Metallform platziert, mit heißem Paraffin eingegossen und gekühlt. Die Proben wurden daraufhin am Mikrotom von Petra Allartz aus der Gruppe RG Zoonoses des BNITM geschnitten.

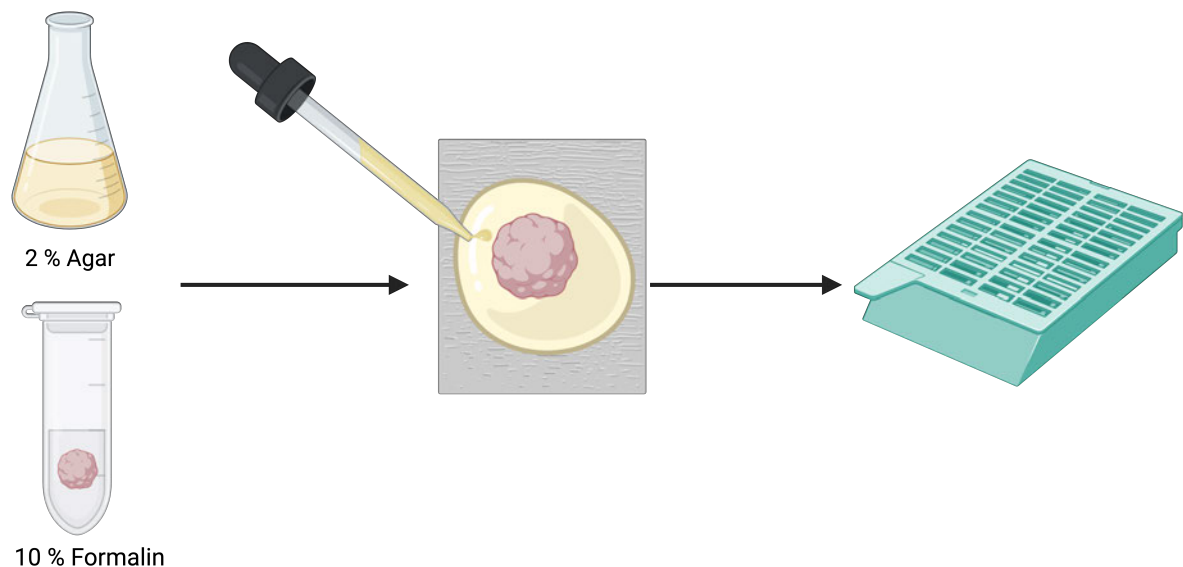


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Probenentwässerung. Das Organoid wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit 500 μ L 10 % Formalin überführt und mit 2 % Agar übergossen. Daraufhin wurden die eingebetteten Proben in die Kassette gelegt und zum Entwässern vorbereitet. Die Abbildung wurde im BioRender.com erstellt.

5.9 Immunofluoreszenz Mikroskopie

Die histologischen Schnitte wurden in Xylol sowie in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 7 min deparaffiniert und anschließend in ddH₂O rehydriert. Die *Antigenretrieval*-Behandlung erfolgte durch Erhitzen der Schnitte im Citratpuffer (pH 6) für 2 min in einem Schnellkochtopf. Nachfolgend wurden die Präparate in PBS gelegt.

Die histologischen Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen, anschließend wurden sie mit einer Lösung aus 5 % *bovine serum albumin* (BSA) und 0.5 % TritonX in PBS für 30 min bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren und die Zellmembran zu permeabilisieren. Im Anschluss wurden die Präparate mit PBS erneut gespült und mit 25 μ L Primärantikörper (Tab. 10) in 5 % BSA bei 4 °C in einer dunklen, feuchten

Kammer über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben mit PBS gewaschen und 25 µL Sekundärantikörper (Tab. 10) in 5 % BSA gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Daraufgehend wurden die Schnitte mit PBS gespült und in ddH₂O getaucht, um die Kristallisation der PBS Salze zu vermeiden. Zum Schluss wurden 10 µL *mounting medium* mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Diese wurde mit Nagellack fixiert.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Antikörper, einschließlich Wirtsspezies, Klonbezeichnung und Antikörpertyp (polyklonal oder monoklonal). Die Marker MAP2 und GFAP wurden zur Identifikation von Neuronen und Astrozyten herangezogen, während CD68 spezifisch Mikroglia und Makrophagen detektiert. Zusätzlich wurden Antikörper gegen EBOV GP eingesetzt, um die Expression des rVSV-EBOV-GP nachzuweisen, sowie Antikörper gegen VSV-G, um das G-Protein des VSV zu detektieren. Die Sekundärantikörper Alexa Fluor® 568 und 647 wurden zur Detektion der Primärantikörper verwendet.

Antigen	Verdünnung	Zelltyp
MAP2 (Kaninchen, polyklonal)	1:600	Reife Neuronen
GFAP (Kaninchen, polyklonal)	1:100	Astrozyten
CD68 (Kaninchen, polyklonal)	1:100	Mikroglia / Makrophagen
EBOV GP (Maus, monoklonal)	1:100	VSV-EBOV-GP
VSV-G (Maus, monoklonal)	1:100	VSV
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor® 568	1:1000	Sekundärantikörper
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor® 647	1:1000	Sekundärantikörper

5.10 Virus RNA Aufreinigung und Sequenzieren

Die Aufreinigung der viralen RNA erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (QIAamp Mini Spin Columns) [38]. Die Viren wurden freundlicherweise von der *Genomics Core Facility* des BNITM unter der Leitung von Dr. Daniel Cadar sequenziert.

5.11 RNA Datenanalyse

Virale RNA-Sequenzen wurden mithilfe der Galaxy-Webplattform (usegalaxy.eu, Zugriff am [12.09.2025]) analysiert, einschließlich Qualitätskontrolle mit FastQC [39], Trimming mit Trimmomatic [40], Alignment und SNP-Calling mit Snippy [41] sowie Annotation mit SnpEff [42]. In der Abbildung 8 ist der Arbeitsablauf dargestellt. Als Referenzsequenzen wurden das VSV Genom (Ref.Seq: OR712768, Genbank: National Center for Biotechnology Information [43]) sowie die EBOV Kikwit Glykoprotein (Ref.Seq: KU182898, Genbank: NCBI [44]) verwendet.



Abbildung 8: Arbeitsablauf der Virus RNA Datengewinnung, -verarbeitung und -analyse. Die virale RNA wurde mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) isoliert und anschließend sequenziert. Darüberhinaus wurden die Adaptersequenzen mit Trimmomatic entfernt und die Reads gereinigt. Danach erfolgte die Qualitätskontrolle mit FastQC. Die bereinigten Sequenzen (Reads) wurden zusammen mit dem entsprechenden Referenzgenom in Snippy eingegeben, um das Genom zu indexieren, Reads *alignen* (Alignment) und einzelne Nukleotidvarianten (SNPs) zu identifizieren. Abschließend wurden die SNPs mithilfe von SnpEff annotiert, um ihre Positionen in Genen und mögliche Aminosäurenveränderungen zu bestimmen. Die Abbildung wurde im BioRender.com erstellt.

6 Ziele dieser Bachelorarbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Bewertung des rVSV-EBOV-GP als Ersatzmodell für EBOV Persistenzstudien *in vitro*, da das authentische EBOV als BSL-4 Erreger sowohl die Handhabung erheblich erschwert als auch die anwendbaren methodischen Ansätze stark einschränkt. In Rahmen dieser Zielsetzung soll daher zunächst untersucht werden, ob der Austausch des VSV Glykoproteins (G) mit dem EBOV Glykoprotein (GP) dazu führt, dass rVSV-EBOV-GP in zerebralen Organoiden persistent repliziert, oder ob eine abweichende, dem VSV wildtyp ähnliche entsprechende Kinetik auftritt.

Das zweite Ziel dieser Arbeit besteht darin, die Zielzellen von VSV und rVSV-EBOV-GP zu untersuchen und mit dem Angriffspunkten EBOV vergleichen.

Im dritten Ziel dieser Arbeit wird analysiert, ob sich das Virus rVSV-EBOV-GP an die zelluläre Umgebung humaner zerebraler Organoide anpasst und gegebenenfalls genomische Mutationen auftreten.

Schlussendlich soll basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit die Bewertung des rVSV-EBOV-GP als BSL-2 EBOV Persistenzmodell stattfinden.

7 Ergebnisse

7.1 Herstellung der Virusstammlösung auf VeroE6 Zellen

7.1.1 VSV Indiana Stammlösungsherstellung

Zur Bereitstellung einer Virusstammlösung für nachfolgende Infektionsversuche im zerebralen Organoid wurden zunächst verschiedene Infektionsparameter von VSV Indiana in VeroE6 Zellen, einer Standardzelllinie für Virusamplifikation, ausgetestet.

Zur Erzielung möglichst hoher Virustiter für die Stammlösung wurden daher zwei verschiedene Infektionsdosen (MOI 0,001 bzw. 0,01) getestet und täglich der zytopathische Effekt (ZPE) mikroskopisch kontrolliert. Mit Auftritt des ZPEs bereits nach 24 h, wobei bei MOI=0,01 bereits vollständig und bei MOI=0,001 Flächenkreise anteilig eine Zellabrundung sichtbar war (Abb. 9), wurde der Virusüberstand geerntet.

Die VSV Viruskonzentrationsmessung bei beiden Stammlösungen wurde unter Verwendung des entsprechenden Plaque Assays durchgeführt und anhand der Gleichung 1 bestimmt. Die Ergebnisse der Viruskonzentration werden in der Tabelle 11 vorgeführt und in der Abbildung 10 veranschaulicht. Die Viruskonzentration bei einer MOI 0,001 betrug an Tag der Infektion 30 PFU/mL und stieg bis zum Erntetag (Tag 1) auf $5,1 \times 10^7$ PFU/mL an. Bei einer MOI 0,01 lag die Viruskonzentration an Tag 0 bei 1525 PFU/mL und erreichte an Tag 1 einen Wert von $2,6 \times 10^7$ PFU/mL. Unabhängig von der Infektionsdosis (MOI 0,001 bzw. 0,01) wurden ausreichend hohe Virustiter erreicht, sodass keine Anpassung des Protokolls notwendig war. In allen folgenden Infektionsexperimenten mit VSV Indiana wurde die Viruslösung, die mit einer Dosis MOI 0,001 produziert wurde und einer Konzentration von $2,6 \times 10^7$ PFU/mL entspricht, verwendet. Diese Wahl wurde mit der besseren Viabilität (geringerer ZPE) der Produktionszellen begründet.

Tabelle 11: VSV Viruskonzentration [PFU/mL] nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen für einen Tag bei einer MOI von 0,001 und 0,01. VF = Verdünnungsfaktor

Virus	Tag	MOI	N _{Plaques}	VF	c _{Virus} [PFU/mL]
VSV	0	0,01	6	1	30
	1		102	10^{-5}	$5,1 \times 10^7$
	0	0,001	31	10^{-2}	1525
	1		52	10^{-5}	$2,6 \times 10^7$

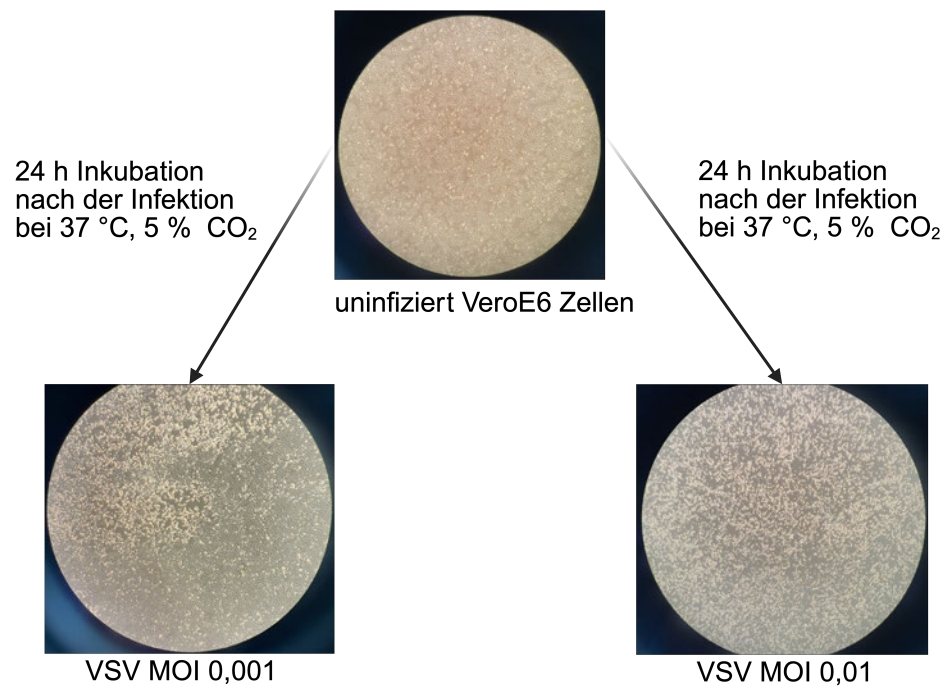


Abbildung 9: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des VeroE6 Zellrasens bevor und nach der 24 h Infektion mit VSV bei verschiedenen Infektionsdosen, MOI=0,001 bzw. MOI=0,01. 10x Objektiv

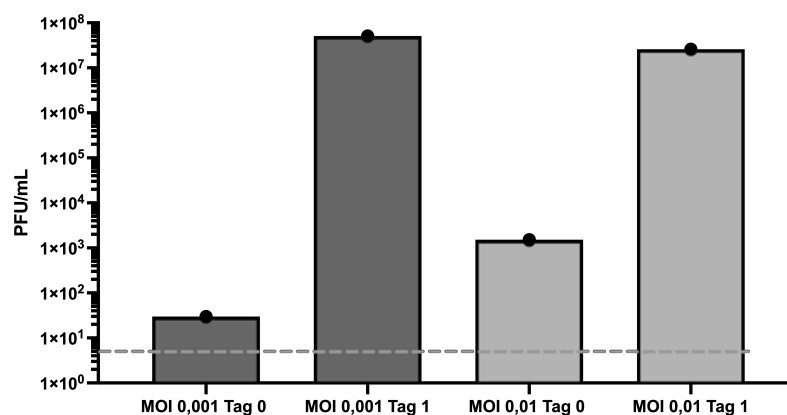


Abbildung 10: VSV Konzentration nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen mit MOI von 0,01 bzw. 0,001. Viruskonzentration (PFU/mL) von VSV nach 1 Tag in VeroE6 Zellen bei verschiedenen MOI. Nachweisgrenze (gestrichelte Linie) liegt bei 5 PFU/mL. N = 1.

7.1.2 rVSV-EBOV-GP Stammlösungsherstellung

Analog zu VSV wurde auch für rVSV-EBOV-GP eine neue Virusstammlösung hergestellt. Da für das rekombinante rVSV-EBOV-GP ein langsames Wachstum als für den VSV Indiana Stamm zu erwarten war, wurden höhere Infektionsdosen (MOI=0,01 und 0,1) eingesetzt. Die Abbildung 11 stellt die lichtmikroskopischen Aufnahmen der VeroE6 Zellen nach der Infektion mit rVSV-EBOV-GP nach 4 und 6 Tagen nach der Infektion mit einer MOI 0,01 und 0,1 dar. Der ZPE wurde täglich überwacht. Zwischen Tag 1 und 3 nach der Infektion

trat kein deutlicher ZPE auf, weshalb zunächst keine komplette Ernte erfolgte. Es wurden jedoch jeweils 1 mL Überstand zur Bestimmung der Viruskonzentration entnommen. An Tag 4 zeigte sich ein leichter ZPE, sodass das Virus aus dem Überstand geerntet und frisches Medium zur weiteren Anzucht erneuert wurde. An Tag 6 war ein ausgeprägter ZPE sichtbar, woraufhin erneut Virus geerntet wurde.

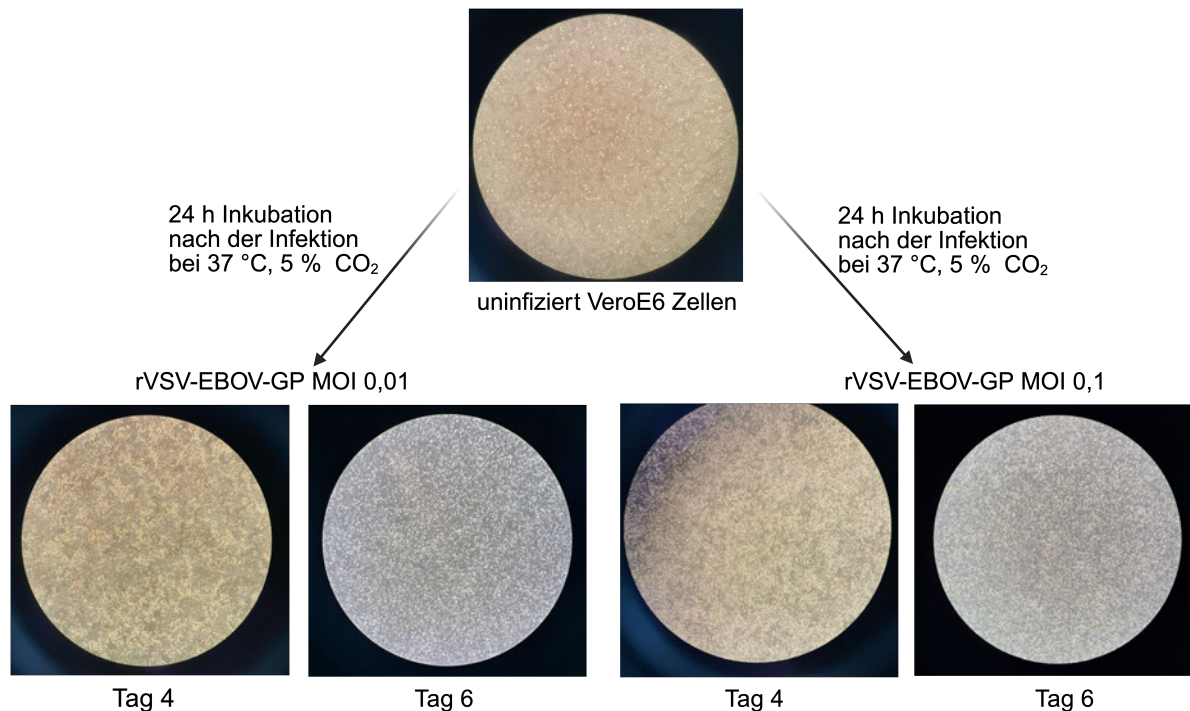


Abbildung 11: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen des VeroE6 Zellrasens bevor und nach 4 und 6 Tagen der Infektion mit rVSV-EBOV-GP bei verschiedenen Infektionsdosen, MOI=0,01 bzw. MOI=0,1. 10x Objektiv

Die Bestimmung der Konzentration des rVSV-EBOV-GP erfolgte via Plaque Assay. Die Ergebnisse der Bestimmung der rVSV-EBOV-GP Viruskonzentration mit MOI 0,01 und 0,1 sind in der Tabelle 12 und in der Abbildung 12 grafisch dargestellt. Bei einer MOI 0,01 (Abb. 12 [A]) lag die Viruskonzentration an Tag der Infektion unterhalb der Nachweisgrenze (5 PFU/mL). Bis Tag 2 stieg die Konzentration auf 450 PFU/mL an und erreichte an Tag 4 ihren Maximalwert von $2,4 \times 10^6$ PFU/mL. an Tag 6 zeigte sich im Vergleich zu Tag 4 keine Veränderung, das Replikationsplateau wurde erreicht, und die Viruskonzentration blieb mit $2,3 \times 10^6$ PFU/mL auf einem ähnlichen Niveau.

Die Ausgangskonzentration des rVSV-EBOV-GP mit einer MOI 0,1 (Abb. 12 [B]) betrug an Tag der Infektion 20 PFU/mL. Die Viruskonzentration nahm innerhalb der ersten vier Tage exponentiell zu und erreichte an Tag 4 ihren Maximalwert $1,4 \times 10^7$ PFU/mL. Der anschließende Rückgang auf $4,5 \times 10^5$ PFU/mL an Tag 6 deutete auf eine beginnende Degradation der Viruspartikel oder eine zelluläre Limitierung der Replikation infolge des ZPE hin.

Tabelle 12: rVSV-EBOV-GP Viruskonzentration [PFU/mL] nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen für den entsprechenden Zeitraum [Tage nach der Infektion] bei einer MOI von 0,01 und 0,1. VF = Verdünnungsfaktor

Virus	Tag	MOI	N _{Plaques}	VF	c _{Virus} [PFU/mL]
rVSV-EBOV-GP	0	0,01	–	–	–
	2		60	10 ⁻¹	450
	4		65	10 ⁻⁴	2,4 × 10 ⁶
	6		62	10 ⁻⁴	2,3 × 10 ⁶
	0	0,1	4	1	20
	2		38	10 ⁻³	1,2 × 10 ⁴
	4		29	10 ⁻⁵	1,4 × 10 ⁷
	6		9	10 ⁻⁴	4,5 × 10 ⁵

Grundsätzlich lässt sich daraus schließen, dass rVSV-EBOV-GP, wie erwartet, langsamer als VSV Indiana repliziert. Der höchste Titer ($1,4 \times 10^7$) PFU/mL wurde bei MOI von 0,1 nach 4 Tagen erreicht, daher wurde diese Stammlösung im Folgenden für weitere Infektionsversuche verwendet.

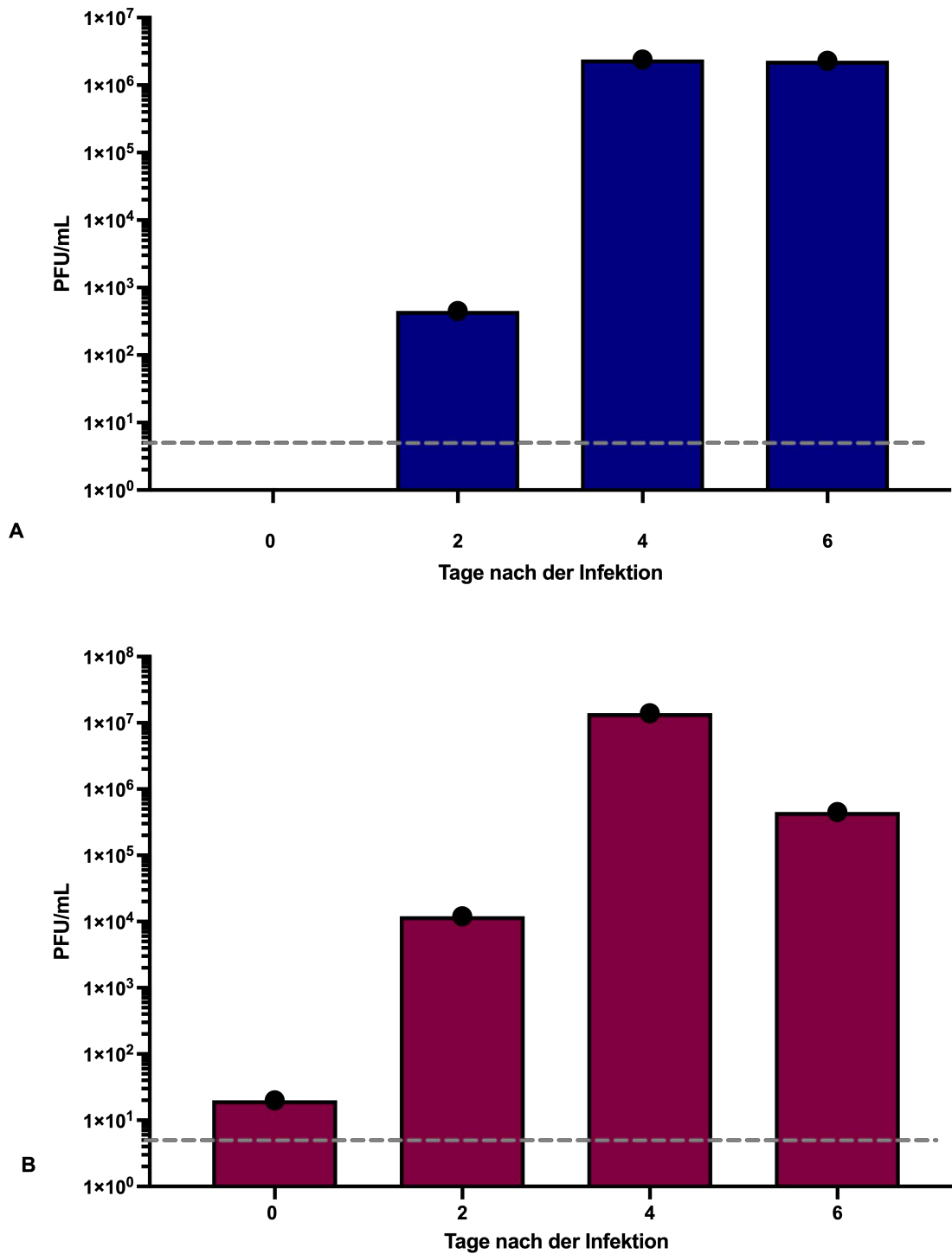


Abbildung 12: rVSV-EBOV Viruskonzentration [PFU/mL] nach der Anzucht auf VeroE6 Zellen für den entsprechenden Zeitraum [Tage nach der Infektion]. Dargestellt ist bei **A** mit einer MOI von 0,01; bei **B** mit einer MOI von 0,1. Nachweisgrenze (gestrichelte Linie) liegt bei 5 PFU/mL. N = 1.

7.2 VSV und rVSV-EBOV-GP replizieren vergleichbar in humanen zerebralen Organoiden

7.2.1 Replikationsverlauf von VSV und rVSV-EBOV-GP in zerebralen Organoiden

Im Sinne der ersten Zielsetzung wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht, ob rVSV-EBOV-GP und VSV in humanen zerebralen Organoiden vergleichbare Replikationsverläufe zeigen und ob rVSV-EBOV-GP eine akute oder persistierende Replikationskinetik aufweist. Besonders von Interesse war dabei die Frage, ob die Kinetik von rVSV-EBOV-GP, der von VSV oder der des authentischen EBOV ähnelt. Die Replikationskinetik des EBOV wurde in der Arbeit von Dr. rer. nat. L. Widerspick [36] unter BSL-4 Bedingungen beschrieben und dient in diesem Zusammenhang als Vergleichsbasis.

Nach einer Wachstumsphase von 100 Tagen wurden die Organoiden der iPSCs Linie HMGU-1 in drei Versuchsgruppen unterteilt: uninfizierte, VSV-infizierte und rVSV-EBOV-GP-infizierte. Bei den Infektionsgruppen gab es jeweils zwei Untergruppen. Gruppe A wurde mit einer Virusdosis von 10^4 PFU/Organoid, Gruppe B mit 10^5 PFU/Organoid des jeweiligen Virusvorrats infiziert. Dabei betrug die Dosis des authentischen EBOV 10^4 PFU/Organoid. Die entsprechenden Dosen und Virusvolumina sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Infektionsdosen des Organoidversuchs Gruppe A wurde mit einer Virusdosis von 10^4 PFU/Organoid Gruppe B mit 10^5 PFU/Organoid des jeweiligen Virusvorrats infiziert.

Virus	Dose [PFU/Organoid]	C_{Virus} [PFU/mL]	V_{Virus} [μ L/Well]
VSV	A (10^4)	$2,6 \times 10^7$	0,385
	B (10^5)		3,85
rVSV-EBOV-GP	A (10^4)	$1,4 \times 10^7$	0,714
	B (10^5)		7,14

Die Ergebnisse der Organoidinfektion sind in Abbildung 14 zusammengefasst und die Lichtmikroskop Bildaufnahmen sind in der Abbildung 13 dargestellt. Der Infektionsverlauf war bei beiden VSV Gruppen nahezu identisch (Abb. 14 [A]). Bereits am ersten Tag nach der Infektion zeigte sich ein exponentieller Anstieg der Viruskonzentration auf $> \times 10^6$ PFU/mL, die an Tag 9 mit etwa 5×10^7 PFU/mL ihr Maximum erreichte. Anschließend fiel die Viruskonzentration bis Tag 21 deutlich ab und erreicht bei beiden Dosen ein Minimum von etwa 90 PFU/mL. Ab Tag 28 war erneut ein Anstieg zu beobachten, wobei die Konzentration bei Dosis A etwa 4×10^4 PFU/mL und bei Dosis B rund 3×10^3 PFU/mL betrug. Der Unterschied zwischen beiden Dosen entsprach somit etwa einer 100-fachen Differenz. Die Konzentration stieg weiter nach Tag 21 kontinuierlich an, bis der Versuch an Tag 33 beendet wurde. Die Abbildung 13 [A] zeigt die Lichtmikroskop Aufnahmen der

Organoide während des Versuchs. Dabei wurde ab den Tag 21 ein starker ZPE sichtbar, wobei die Organoide zum Teil zerfielen und Zellschrott im Überstand sichtbar war. Nach der Infektion mit der rVSV-EBOV-GP stieg die Viruskonzentration bei Dosis A exponentiell auf $> \times 10^6$ PFU/mL an und erreichte an Tag 3 ihr Maximum bei etwa 1×10^7 PFU/mL. Bis Tag 10 nahm die Konzentration kontinuierlich ab, bevor sie an Tag 11 erneut auf ca. 2×10^6 PFU/mL anstieg. In den folgenden Tagen sank sie auf etwa 2×10^4 PFU/mL und erreichte an Tag 17 wieder rund 2×10^6 PFU/mL. Im weiteren Verlauf fiel die Konzentration erneut ab, zeigte jedoch an Tag 33 nochmals einen Anstieg. Der Kurvenverlauf der Dosis B zeigte ebenfalls einen exponentiellen Anstieg und erreichte an Tag 3 mit etwa 2×10^7 PFU/mL das Maximum. Bis Tag 12 fiel die Viruskonzentration kontinuierlich auf etwa 3×10^3 PFU/mL ab und stieg bis Tag 14 erneut auf rund 2×10^6 PFU/mL an. Anschließend sank sie bis Tag 17 auf ein Minimum von etwa 20 PFU/mL. Am folgenden Tag ist ein weiterer kurzfristiger Anstieg zu beobachten, bevor die Konzentration erneut kontinuierlich abnahm, bis der Versuch an Tag 33 beendet wurde. Wie in der Abbildung 13 [B] aufgeführt, trat bei der rVSV-EBOV-GP Infektion bereits an Tag 17 ZPE auf, die Organoide begannen teilweise zu zerfallen.

Für VSV und rVSV-EBOV-GP lässt sich zusätzlich festhalten, dass zu Beginn des Versuchs eine höhere Viruskonzentration bei Dosis B eingesetzt und gemessen wurde, zeigte sich im späteren Verlauf ein Anstieg der Konzentration bei Dosis A.

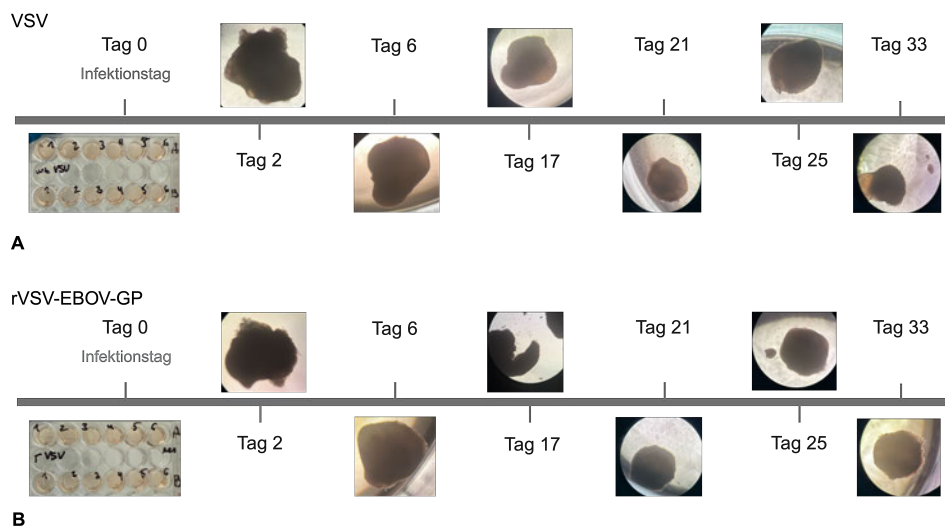


Abbildung 13: VSV und rVSV-EBOV-GP infizierte zerebrale Organoide der Linie HMGU-1

A stellt die Lichtmikroskop Aufnahme der VSV Replikation bis Tag 33 dar. **B** stellt die Lichtmikroskop Aufnahme der rVSV-EBOV-GP Replikation bis Tag 33 dar.

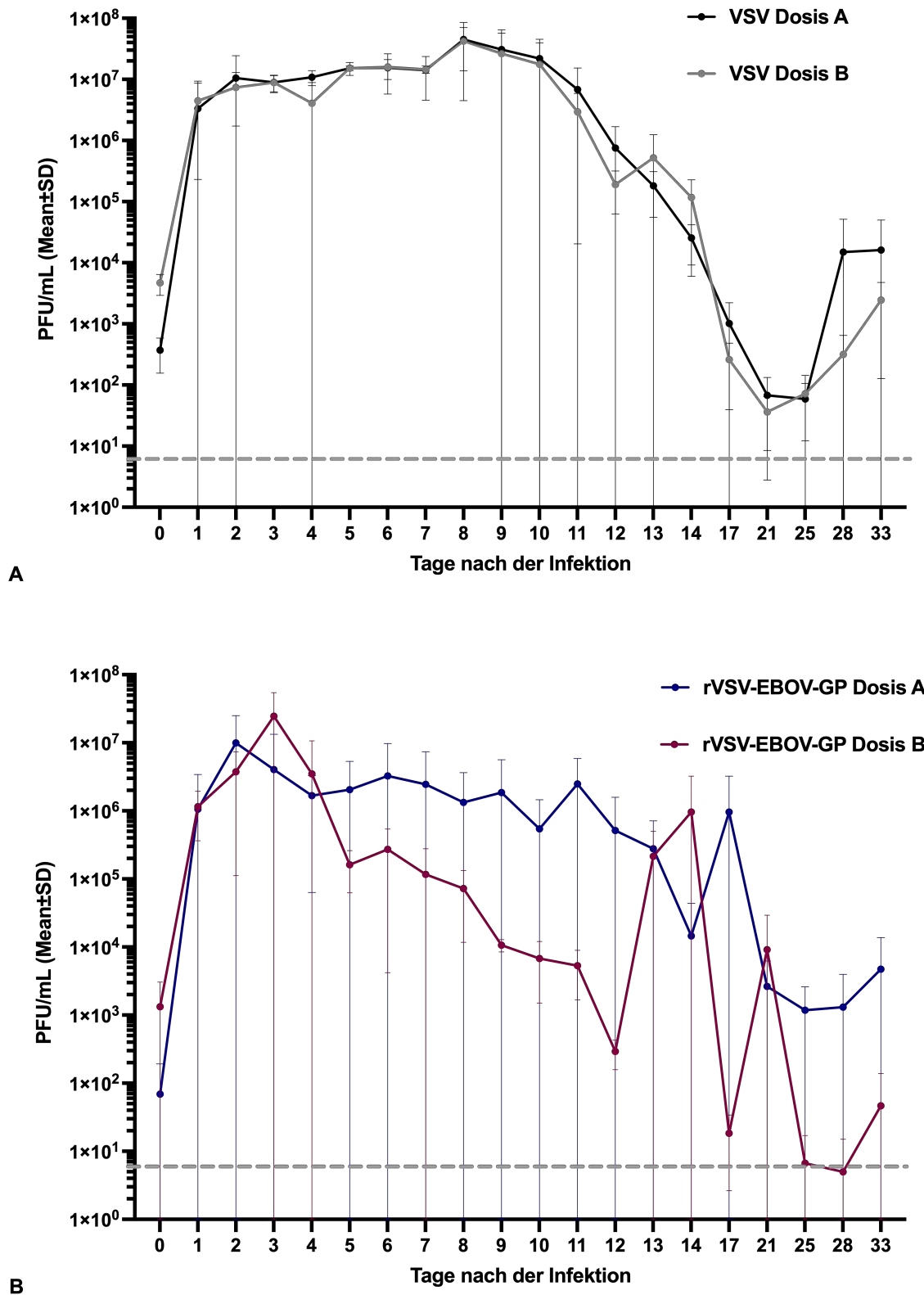


Abbildung 14: VSV und rVSV-EBOV-GP Replikation in zerebralen Organoiden der Linie HMGU-1 **A:** Viruskonzentration ist in PFU/mL (mit Mean±SD) über 33 Tagen nach der Infektion von VSV dargestellt. Dosis A (10^4 PFU/Organoid) ist in schwarz und Dosis B (10^5 PFU/Organoid) in grau gezeigt. N = 6. **B:** Viruskonzentration ist in PFU/mL (mit Mean±SD) über 33 Tagen nach der Infektion von rVSV-EBOV-GP dargestellt. Dabei ist in blau Dosis A (10^4 PFU/Organoid) und in rot Dosis B (10^5 PFU/Organoid) gezeigt. Nachweisgrenze (gestrichelte Linie) liegt bei 5 PFU/mL. N = 6.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die Viruskonzentration bei der VSV Infektion unabhängig von der Infektionsdosis einen vergleichbaren Verlauf aufweist. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der Verlauf von der rVSV-EBOV-GP zwischen beiden Dosen. Bei allen Gruppen war der frühe Replikationsverlauf bis an Tag 3 von einem exponentiellen Anstieg geprägt, welcher nach dem Erreichen eines Plateaus zu einem starken Abfall der Replikation sowie Auftritt eines ZPEs führte. Im Falle der Dosis B rVSV-EBOV-GP war das Plateau am kürzesten. Darüber hinaus ist zu vermerken, dass bei allen Gruppen nach dem Erreichen des Minimums ein weiterer Anstieg erfolgte. Um dies weiter zu verfolgen wurde daher beschlossen, einen weiteren Organoid Batch für einen längeren Zeitraum zu infizieren und den Anstieg zu bestätigen. Des Weiteres galt es zu bestätigen, ob sich die Virusreplikation in Organoiden, die aus unterschiedlichen iPSCs Linien, HMGU-1 und SCTi003-A, abgeleitet wurden, unterschiedlich verhält. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde bei der Wiederholung des Experiments eine weitere Untergruppierung HMGU-1 und SCTi003-A mit jeweils Infektionsdosis A und B durchgeführt, ebenfalls wurde der Versuch auf 41 Tagen verlängert (Abb. 15). An den Tagen 3, 10 und am Ende des Experimentes wurden dabei jeweils drei Organoiden für immunhistochemie Untersuchungen gesammelt. Nach der Infektion von SCTi003-A generierten Organoiden (Abb. 15 [A]) war der Viruskonzentrationsverlauf beider Dosen ähnlich. Bereits an Tag 1 stieg die Viruskonzentration exponentiell an und erreichte an Tag 2 das Maximum von etwa 1×10^7 PFU/mL. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Anzahl der Organoiden je Dosis 9. In den darauffolgenden Tagen fiel die Konzentration kontinuierlich ab und erreichte an Tag 25 das Minimum (Dosis A ca. 20 PFU/mL; Dosis B ca. 50 PFU/mL), wobei die Anzahl der Organoiden zu diesem Zeitpunkt 3 betrug. In den folgenden Tagen stieg die Viruskonzentration erneut exponentiell an und erreichte am Ende des Versuchs (Tag 41) bei Dosis A etwa 8×10^3 PFU/mL und bei Dosis B etwa 3×10^4 PFU/mL.

Die Viruskonzentrationen in VSV infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 (Abb. 15 [B]) der Dosis A und B verliefen nahezu identisch. An Tag 1 nahm die Viruskonzentration exponentiell zu und erreichte den maximalen Wert an Tag 2 bei Dosis A mit etwa 8×10^6 PFU/mL und bei Dosis B mit etwa 2×10^6 PFU/mL. Die Anzahl der Organoiden an Tag 2 betrug 9. Im weiteren Verlauf fiel die Konzentration leicht ab und stieg anschließend wieder geringfügig an. Zwischen Tag 9 und 21 nahm die Viruskonzentration kontinuierlich ab und erreichte an Tag 21 das Minimum, wie im ersten Versuch (Abb. 14[A]). Im späteren Verlauf der Infektion zeigte die Viruskonzentration wiederkehrende Schwankungen. Zum Ende des Versuchs lag der Wert bei Dosis A etwa 3×10^3 PFU/mL und bei Dosis B etwa 1×10^3 PFU/mL.

Zusammenfassend verlaufen beide Kurven ähnlich und die Replikation des ersten Versuchs konnte reproduziert werden.

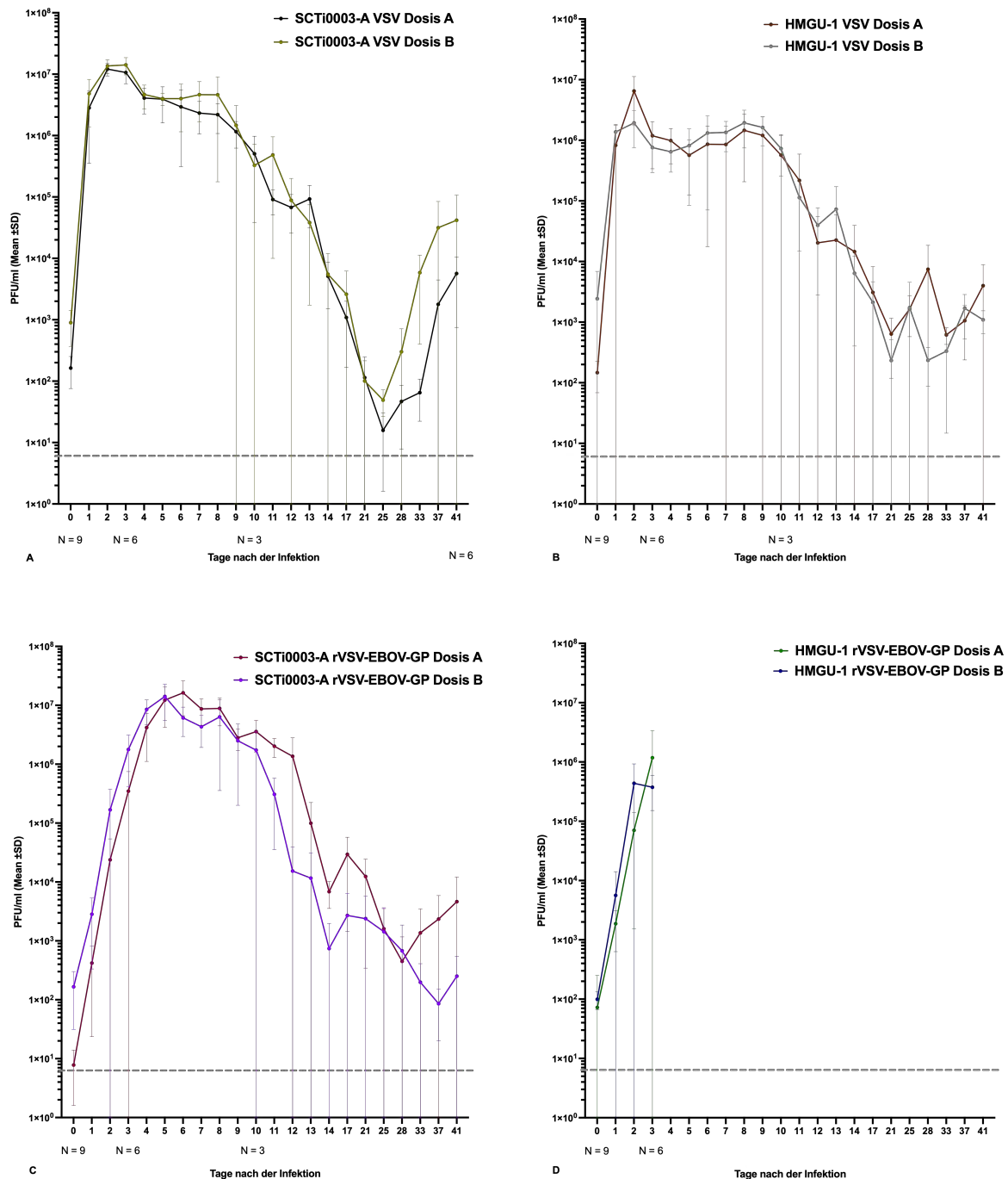


Abbildung 15: VSV und rVSV-EBOV-GP Replikation in zerebralen Organoiden die Viruskonzentration ist in PFU/mL (mit Mean $\pm$ SD) über 41 Tagen nach der Infektion angegeben. N Anzahl der Organoiden: Tag 0-3 N=9; Tag 4-10 N=6; Tag 11-41 N=3. **A:** Viruskonzentration der VSV infizierten Organoidlinie aus SCTi003-A iPSC, dabei ist Dosis A in schwarz und Dosis B in grün dargestellt. **B:** Viruskonzentration der VSV infizierten Organoidlinie aus HMGU-1 iPSC, dabei ist Dosis A in braun und Dosis B in grau dargestellt. **C:** Viruskonzentration der rVSV-EBOV-GP infizierten Organoid der Linie aus SCTi003-A iPSC, dabei ist Dosis A in rot und Dosis B in lila dargestellt. **D:** Viruskonzentration der rVSV-EBOV-GP infizierten Organoid der Linie HMGU-1, dabei ist Dosis A in blau und Dosis B in dunkelgrün dargestellt.

Im Falle der rVSV-EBOV-GP Organoidinfektion der Gruppe SCTi003-A verlief die Viruskonzentration beider Dosen ähnlich. Die Titer stiegen exponentiell an und erreichten ver-

zögert zum Wildtyp, an Tag 5 bei Dosis B mit etwa 1×10^7 PFU/mL und Tag 6 bei Dosis A mit etwa 2×10^7 PFU/mL das Maximum (Anzahl der Organoiden je Dosis 6). Danach fiel die Konzentration kontinuierlich und das Minimum wurde an Tag 28 bei Dosis A mit etwa 8×10^2 PFU/mL und Tag 37 bei Dosis B mit etwa 1×10^2 PFU/mL erreicht. Zum Ende des Versuchs an Tag 41 nahm die Viruskonzentration leicht zu und lag bei Dosis A bei etwa 4×10^3 PFU/mL und bei etwa 2×10^2 PFU/mL bei Dosis B (Anzahl der Organoiden je Dosis 3). Es ist zu bemerken, dass während die Viruskonzentration zu Beginn bei Dosis B höher war, zeigte sich im weiteren Verlauf eine höhere Konzentration bei Dosis A. Zusätzlich kann festgestellt werden, dass der generelle Kurvenverlauf von rVSV-EBOV-GP in SCTi003-A Organoiden dem des Wildtyp VSV entsprach, jedoch verlangsamt stattfand. In D wurde die Viruskonzentration rVSV-EBOV-GP Organoiden der Linie HMGU-1 untersucht (Abb. 14[D]). Die Viruskonzentration konnte jedoch nur bis Tag 3 gemessen werden, da bei der Probeentnahme an Tag 4 eine Kontamination der Platte bzw. Organoiden beobachtet wurde. Um die Kontaminationsgefahr für andere Proben zu eliminieren, wurde der Versuch für diese Gruppe abgebrochen und die Proben entsorgt. Aus den Ergebnissen der Gruppe lassen sich keine eindeutigen Schlüsse ziehen.

7.2.2 Replikationsvergleich von VSV und rVSV-EBOV-GP mit authentischem EBOV

Zum Vergleich wurden die Ergebnisse aus den VSV und rVSV-EBOV-GP Infektionsversuchen mit der Infektion von humanen zerebralen Organoiden mit EBOV (Abbildung 16) verglichen. Diese Ergebnisse wurden von Dr. rer. nat. Lina Widerspick in Rahmen ihrer Arbeit [36] in der BLS-4 durchgeführt und freundlicherweise mitgeteilt.

In der Abbildung 16 ist die Viruskonzentration von EBOV mit einer Dosis von 10^4 FFU/Organoid (entsprechen Dosis A in dieser Versuchsreihe) (engl. *focus forming units* [FFU]) in den Organoidenlinien SCTi0003-A und HMGU-1 abgebildet. Der Replikationsverlauf EBOV in den Organoiden der Linie HMGU-1 stieg erst ab Tag 3 nach der Infektion langsam an und blieb bis Tag 6 nahezu konstant bei 3×10^2 FFU/mL. Anschließend stieg die Viruskonzentration exponentiell an und erreichte bei schwankendem Verlauf an Tag 30 den Maximalwert von 1×10^6 FFU/mL. Danach nahm der Wert bis zum letzten Tag des Versuchs kontinuierlich ab und lag am Ende bei 5×10^5 FFU/mL. Die Viruskonzentration in der Organoiden der Linie SCTi0003-A stieg bereits ab Tag 3 (ca. 7×10^2 FFU/mL) exponentiell bis etwa 1×10^6 FFU/mL innerhalb der ersten 15 Tage nach der Infektion an und sank anschließend schwankend auf etwa 7×10^3 FFU/mL am letzten Tag der Detektion ab. Alle (100%) der Organoiden waren zu allen Zeitpunkten produktiv infiziert.

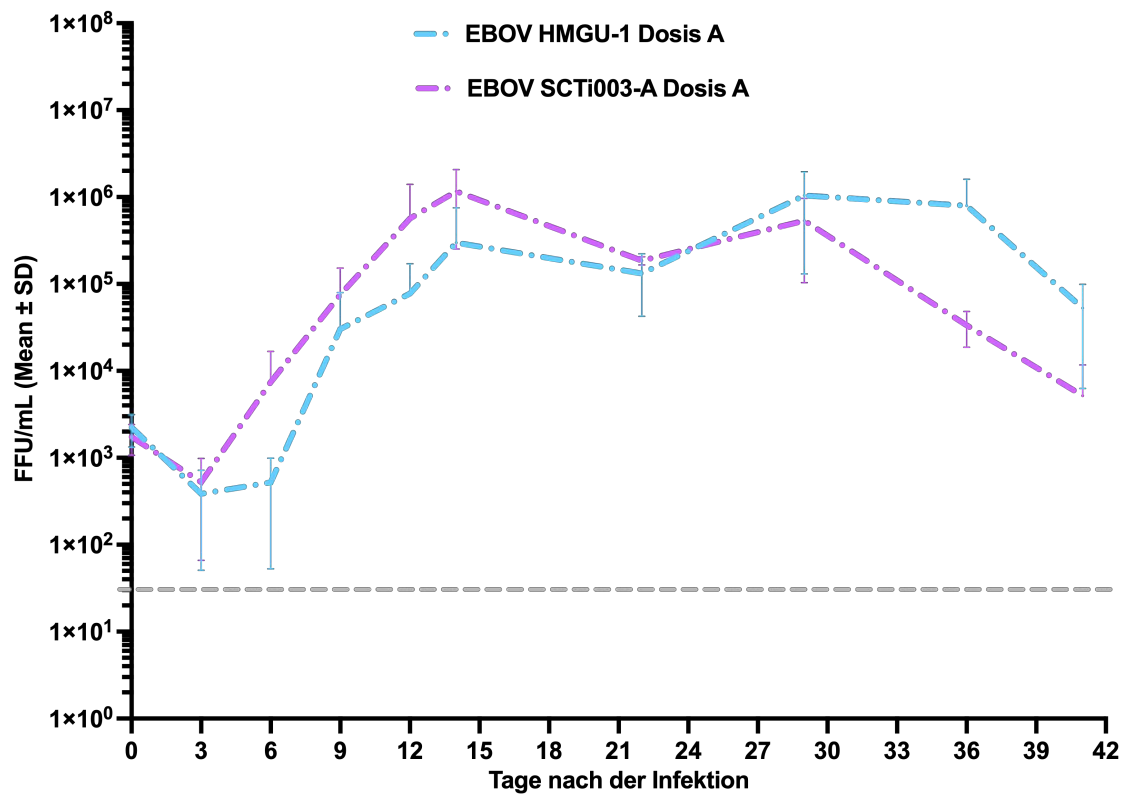


Abbildung 16: Virusreplikation [FFU/mL mit Mean±SD] der EBOV für Organoidenlinie SCTi0003-A (helllila) und HMGU-1 (hellblau) nach Tagen der Infektion. Nachweisgrenze (grau) 20 FFU/mL; N = 8 . Entnommen aus [36] mit freundlicher Genehmigung der Autoren.

Vergleicht man die Replikation von VSV bzw. rVSV-EBOV-GP mit EBOV an den entsprechenden Tagen, so lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse des Replikationsverlaufs des VSV und rVSV-EBOV-GP in beiden Versuchen ähnlich waren, wobei jedoch in SCTi003-A Organoiden eine verlangsamte Kinetik detektiert wurde. Dies unterscheidet sich vom EBOV Verlauf, welcher deutlich langsamer als VSV oder rVSV-EBOV-GP verlief.

Schließlich wurde zur Identifizierung von signifikanten Unterschieden im Mittelwert Virusreplikationsverlauf an Tag 0, 3, 6, 9, 12, 14, 28/29, 36/37 nach der Infektion mit mit EBOV, rVSV-EBOV-GP und VSV mit Dosis A (10^4) ein einfaktorielle ANOVA mit Korrektur für multiple Hypothesentests (engl. *one-way ANOVA with multiple hypothesis correction*) durchgeführt (Abb. 17). Die Viruskonzentration von beiden Organoiden der Linie HMGU-1 Infektionen mit rVSV-EBOV-GP und VSV wurden zusammengefügt.

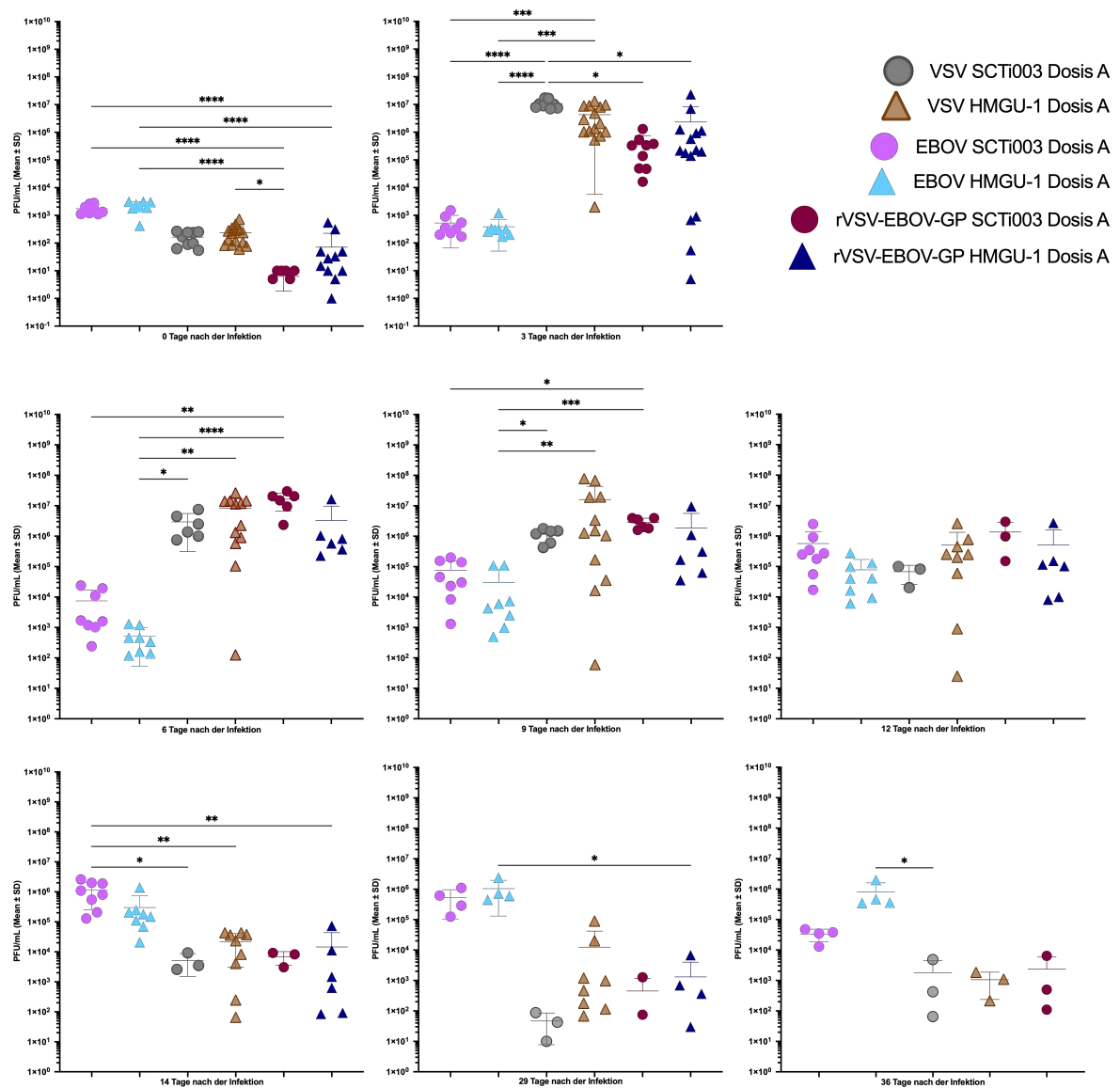


Abbildung 17: Replikationsvergleich von VSV, rVSV-EBOV-GP mit EBOV Mittlere Viruskonzentration [PFU/mL mit Mean±SD] an Tag 0, 3, 6, 9, 12, 14, 28/29, 36/37 nach der Infektion mit EBOV, rVSV-EBOV-GP und VSV bei Dosis A [10^4]. Dabei sind mit VSV infizierte Organoid der Linie SCTi003-A in grau und HMGU-1 und braun, mit rVSV-EBOV-GP infizierte Organoid der Linie SCTi003-A in rot und HMGU-1 und dunkelblau, mit EBOV infizierte Organoid der Linie SCTi003-A in helllila und HMGU-1 und hellblau. One way ANOVA mit Dunn's Post Test. * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; **** < 0,0001

An Tag der Infektion (Tag 0) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit EBOV und den mit rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden in beiden Linien (SCTi003-A und HMGU-1). Es lag ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen mit VSV infizierten Organoidlinie HMGU-1 und mit rVSV-EBOV-GP infizierten Organoidlinie SCTi003-A. Dies bedeutet, dass nach der Virusinfektion verschiedener Viren, wobei EBOV aus einem im BSL-4 durchgeführten Experiment stammt, unterschiedliche Restmengen übrig waren. Dies gilt es im Folgenden zu beobachten. Lediglich HMGU-1 rVSV-EBOV-GP waren nicht signifikant höher, obwohl der selbige Trend vorlag. Folglich, replizieren VSV und rVSV-

EBOV-GP signifikant schneller als EBOV im Organoidmodell. An Tag 6 nach der Infektion bestand dieser signifikante Unterschied weiterhin. Im Detail war zwischen den mit EBOV infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 und den mit rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A, sowie zu den mit VSV infizierten Organoiden der Linie HMGU-1, und zu den mit VSV infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A ein signifikant geringer Titer in den EBOV infizierten Organoiden vorzuweisen erhalten. Zudem lag ein signifikanter Unterschied zwischen den mit EBOV infizierten und den mit rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A vor. Auch an Tag 9 blieb dieser Trend trotz zunehmender EBOV Titer. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Viruskonzentration zwischen den mit EBOV infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 und den mit rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A beobachtet. Dies wurde auch für die mit VSV infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 jene der Linie SCTi003-A befunden. Zusätzlich wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den mit EBOV und rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A nachgewiesen. Kein sicher Unterschied wurde beobachtet an Tag 12 nach der Infektion den zu EBOV und VSV bzw. rVSV-EBOV-GP Titer waren vergleichbar. Dies stellt den Zeitpunkt der Trendwende dar, da nach 12 Tagen die EBOV Titer grundsätzlich höher waren als nach VSV bzw. rVSV-EBOV-GP Infektion. An Tag 14 nach der Infektion wurde im Detail ein signifikanter Unterschied in der Viruskonzentration zwischen den mit EBOV infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A und den mit VSV bzw. rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden derselben Linie HMGU-1 festgestellt. Zudem zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit EBOV und den mit VSV infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A. Es wurde jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den mit EBOV infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 an Tag 29 und den mit rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden derselben Linie festgestellt, sowie an Tag 36 zwischen den mit VSV infizierten Organoiden der Linie SCTi003-A.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Unterschiede der Viruskonzentration zwischen EBOV und rVSV-EBOV-GP bzw. VSV überwiegend signifikant sind und EBOV zunächst Tag 0-9 signifikant langsamer jedoch darauffolgend zu höherem Ausmaß repliziert. Es ist anzunehmen, dass das rVSV-EBOV-GP sich ähnlich dem VSV verhält und somit weniger Kinetik des authentischen EBOV als die des VSV modelliert.

7.2.3 ZPE Vergleich von VSV und rVSV-EBOV-GP mit authentischem EBOV

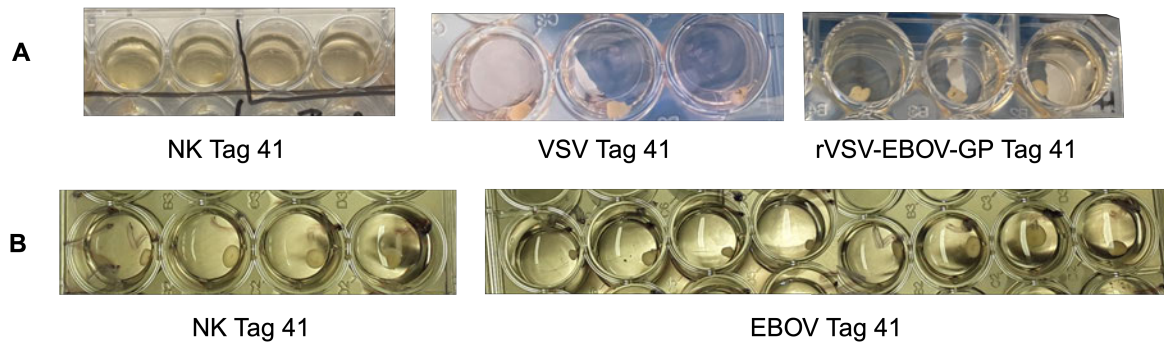


Abbildung 18: ZPE VSV, rVSV-EBOV-GP, EBOV Tag 41 nach der Infektion. Bildaufnahmen von **A** VSV und rVSV-EBOV-GP infizierte Organoiden sowie die uninfizierte Organoiden Negativkontrollen (NK) in BLS-2; **B** EBOV infizierte sowie uninfizierte Organoiden in BLS-4 [36]

Zum ZPE Vergleich sind in der Abbildung 18 die Bildaufnahmen von der Platten mit infizierten Gehirnanorganoiden nach 41 Tagen nach der jeweiligen Infektion zusammengefügt. Dargestellt sind mit VSV und rVSV-EBOV-GP infizierte sowie uninfizierte (NK) Gehirnanorganoiden (Abb. 18 [A]). Ebenfalls sind mit EBOV infizierte sowie uninfizierte Negativkontrollen (NK) Organoiden dargestellt (Abb. 18 [B]). Aus den Bildaufnahmen ist es zu erkennen, dass mit EBOV infizierte Organoiden nach 41 Tagen nach der Infektion größtenteils intakt geblieben sind. Im Gegensatz waren die VSV und die rVSV-EBOV-GP infizierte Organoiden nach 41 Tagen nach der Infektion teilweise zerfallen und im Fall von VSV wurde kein Medium mehr verstoffwechselt (mangelnde Verfärbung).

Daraus kann gefolgert werden, dass die Virusinfektion mit rVSV-EBOV-GP der mit VSV ähnlich und nicht dem natürlichen EBOV.

7.2.4 Untersuchung der Infektionsproduktivität bei Langzeitinfektion

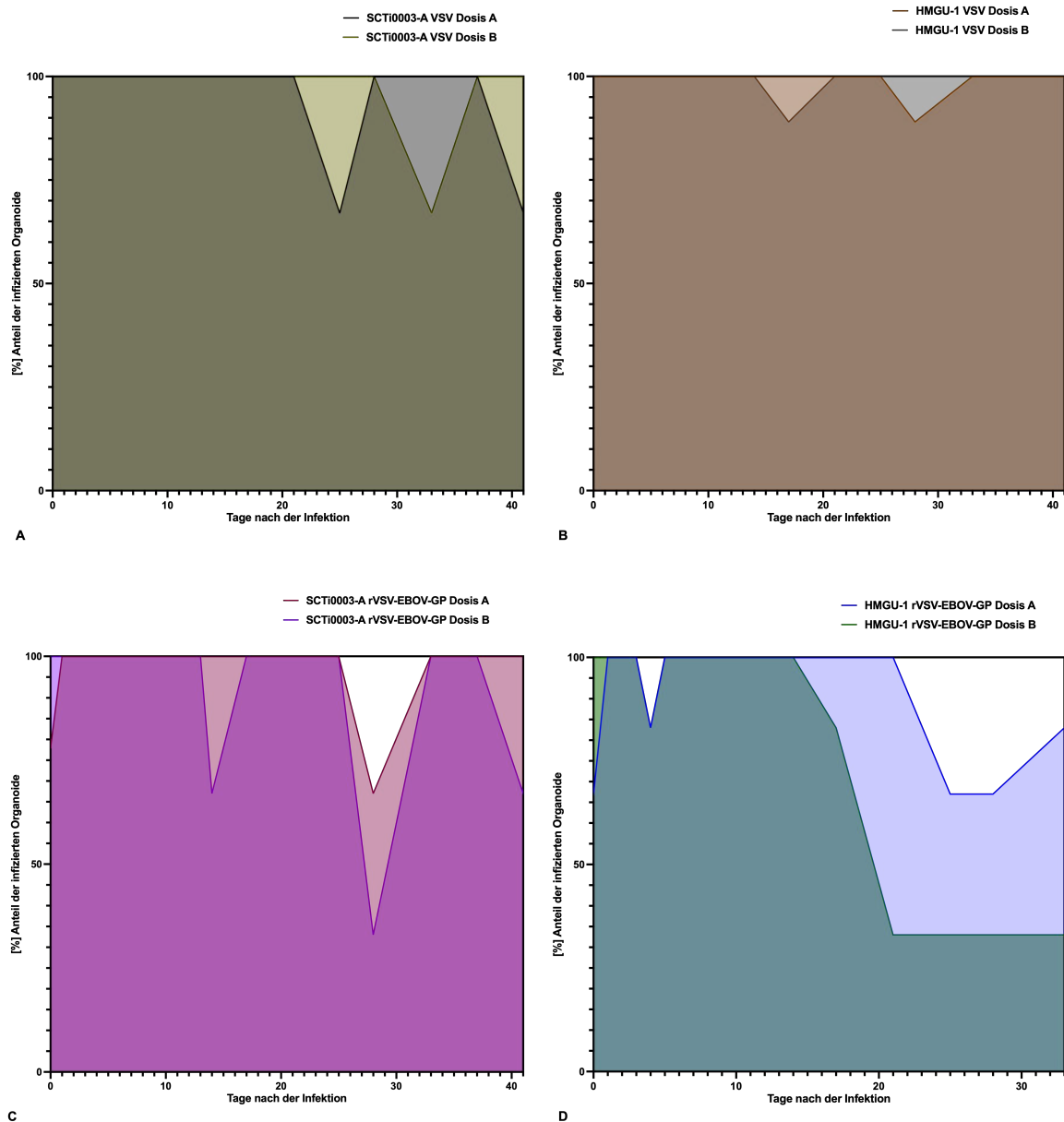


Abbildung 19: % Produktiv (≥ 5 PFU/mL) infizierte Organonoide pro Zeitpunkt. A: VSV infizierte Organonoide, SCTi003-A, dabei Dosis A in schwarz und Dosis B in grün **B:** VSV infizierte Organonoide, HMGU-1, dabei Dosis A in braun und Dosis B in grau **C:** rVSV-EBOV-GP infizierte Organonoide, SCTi003-A, dabei Dosis A in rot und Dosis B in lila **D:** rVSV-EBOV-GP infizierte Organonoide, HMGU-1, dabei Dosis A in blau und Dosis B in dunkelgrün

Bei der Infektion mit EBOV, waren zu allen Zeitpunkten 100 % der Organonoide produktiv infiziert [36]. Um dies mit den VSV und rVSV-EBOV-GP zu vergleichen, wurde der prozentuale Anteil der infizierten Organonoide ermittelt, die zu einem gegebenen Zeitpunkt infektiöse Partikel freisetzen, um festzustellen, ob die Organonoide persistent das Virus replizieren. Die Ergebnisse sind aus beiden Replikationsversuchen zusammengefasst und in der Abbildung 19 dargestellt. Es lässt sich festhalten, dass bei keiner der Gruppen

zu jedem Zeitpunkt 100 % produktive Infektionsrate (Abb. 19) vorlag. In VSV infizierten, SCTi003-A Organoiden sank folglich an Tag 25 und 41 der prozentuale Anteil bei Dosis A auf 68 % (2 von 3 Organoide), während er zu allen anderen Zeitpunkten konstant bei 100 % (Abb. 19 [A]) war. Bei Dosis B fiel der Anteil einmalig (Tag 33) auf 68 % (2 von 3 Organoide), lag ansonsten ebenfalls konstant bei 100 %. In VSV infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 lag bei beiden Dosen der Anteil nur einmalig unter 100 %, nämlich an Tag 28 für Dosis A und an Tag 17 für Dosis B, mit einem Wert von jeweils 89 % (jeweils 8 von 9 Organoide) (Abb. 19 [B]). Es lässt sich folglich festhalten, dass trotz ZPE generell eine langfristige produktive Infektion mit VSV aufrecht gehalten werden konnte. Bei rVSV-EBOV-GP Infektion der Dosis A in SCTi003-A Organoide lag der prozentuale Anteil bis auf Tag 28 (67 % [2 von 3 Organoide]) bei 100 % (Abb. 19 [C]). Bei Dosis B fiel der Anteil an Tag 14 auf 67 % [2 von 3 Organoide]. Danach stieg er wieder an, fiel jedoch zu Tag 28 erneut auf 33 % [1 von 3 Organoide] und erreichte zu Ende des Experiments wieder 100 % (Abb. 19 [C]). Im Fall der rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 bei Dosis A fiel an Tag 4 der Anteil der produktiv infizierten Organoide kurzzeitig auf 83 % [5 von 6 Organoide], stieg jedoch wieder auf 100 % (Abb. 19 [D]). Ab Tag 25 nahm der Anteil auf 67 % [4 von 6 Organoide] ab und stieg an Tag 33 auf 83 % [5 von 6 Organoide]. Bei Dosis B blieb der Anteil ab Tag 5 ebenfalls bis Tag 25 konstant auf 100 %. Danach fiel er auf 83 % [5 von 6 Organoide] und sank gegen Ende (Tag 21) des Experiments auf 33 % [2 von 6 Organoide] (Abb. 19 [D]).

Daraus lässt sich schließen, dass bei der Langzeitinfektion das rVSV-EBOV-GP nicht robust persistent repliziert, was es von der authentischen EBOV Infektion unterscheidet.

7.3 Zielzelltypen von VSV und rVSV-EBOV-GP

Wie es bereits in der Arbeit von L. Widerspick [36] beschrieben wurde, ist der Zelltropismus von EBOV sehr breit und es werden Mikroglia, Astrozyten und Neuronen produktiv infiziert. Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit dem zweiten Ziel, und zwar der Fragestellung welche Zelltypen von VSV und rVSV-EBOV-GP infiziert werden. Aus den beiden Replikatuinsversuchen wurden die Organoide von Tag: 3, 10, 33, 41 histologisch verarbeitet und mit den Antikörper gefärbt.

Die maturierten Neuronen wurden mit MAP2, die Astrozyten mit GFAP und die Mikrogliazellen bzw. Makrophagen mit CD68 gefärbt. Das entsprechende Virus ist mit EBOV GP für rVSV-EBOV-GP bzw. mit VSV-G für VSV markiert. Die Ergebnisse der jeweiligen Färbungen sind in den Abbildungen 20, 21 und 22, sowie die zugehörigen Negativkontrollen

(NK), dargestellt.

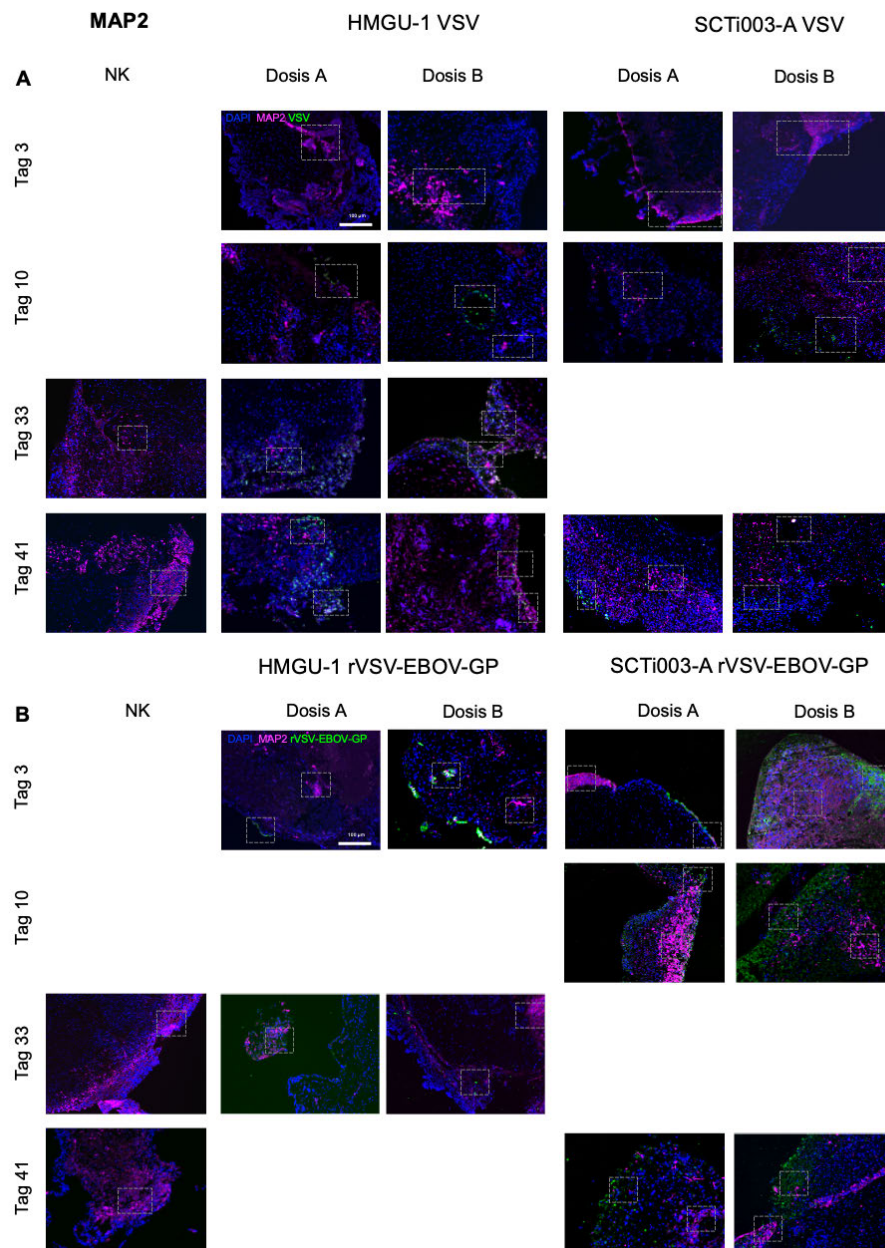


Abbildung 20: MAP2 (Neuronen) Färbung. Immunhistochemische Färbung von MAP2 (magenta) und VSV G [A] oder EBOV GP [B] (grün) an den entsprechenden Tagen nach einer Infektion mit VSV [A] oder rVSV-EBOV-GP [B] im HMGU-1 oder SCTi003-A Organoden, im Vergleich mit entsprechenden unfizierten Negativkontrolle (NK). DAPI in blau. Skala bei 100 µm. Bildaufnahme bei ×100 Vergrößerung.

Wie der Abbildung 20 (A) zu entnehmen ist, infiziert VSV die Neuronen der Organoidenlinie HMGU-1 und SCTi003-A. Infizierte Neuronen wurden demnach bei der Organoidlinie SCTi003-A mit Infektionsdosis A ab Tag 10 und Dosis A ab Tag 33 detektiert, wobei bei der Organoidlinie HMGU-1 in beiden Infektionsdosen ab Tag 10 sichtbar war. Im Vergleich dazu wurde das rVSV-EBOV-GP bereits ab Tag 3 in Neuronen in SCTi003-A bei Dosis A

und B und im HMGU-1 in Dosis B detektiert. Somit kann geschlussfolgert werden, dass VSV und rVSV-EBOV-GP beide, wie EBOV, MAP2⁺ Neuronen des Organoidmodell infizieren kann. Darüber hinaus war das rVSV-EBOV-GP Signal deutlich verbreiteter und konnte auch spät, zumindest in SCTi003-A Organoiden, noch großflächig nachgewiesen werden (Abb. 20 B). Im Fall von VSV waren jeweils nur vereinzelte Fälle detektierbar.

Die Infektion der GFAP⁺ Astrozyten durch VSV wurde in HMGU-1 Organoiden in Dosen A und B ab Tag 10 nach der Infektion detektiert (Abb. 21 A). Bei SCTi0003-A wurde VSV wiederum nur in Proben der Dosis A und B nach 41 Tagen nach der Infektion nachgewiesen. Das rVSV-EBOV-GP war nahezu in jeder Probe zu detektierten (Abb. 21 B). Dabei lag schon ab Tag 3 eine Infektion vor. Jedoch konnte in SCTi003-A Organoiden ab Tag 41 keine rVSV-EBOV-GP in GFAP⁺ Astrozyten detektiert werden. Dies unterschreitet sich von EBOV, wo GFAP⁺ Astrozyten auch später in Zielzellen messbar bleibt [36]. Dennoch lässt sich schlussfolgern, dass VSV und rVSV-EBOV-GP beide neben Neuronen auch Astrozyten infizieren können.

VSV wurde in Mikroglia bei HMGU-1 an Tag 3 nach der Infektion detektiert (Abb. 22 A). In Dosis B was das Virus nach 10, 33 und 41 Tagen nach der Infektion in Mikroglia nachweisbar. Bei SCTi0003-A Organoiden wurde VSV bei beiden Dosen erst ab 10 bis 41 Tag nach der Infektion in Mikroglia detektiert. Es lässt sich insgesamt feststellen, dass VSV Mikroglia (CD68) infiziert. Im Vergleich war das rVSV-EBOV-GP bereits ab Tag 3 nach der Infektion in Mikroglia detektierbar (Abb. 22 B). Auch zu den späteren Zeitpunkten konnten noch rVSV-EBOV-GP⁺ Mikroglia entdeckt werden.

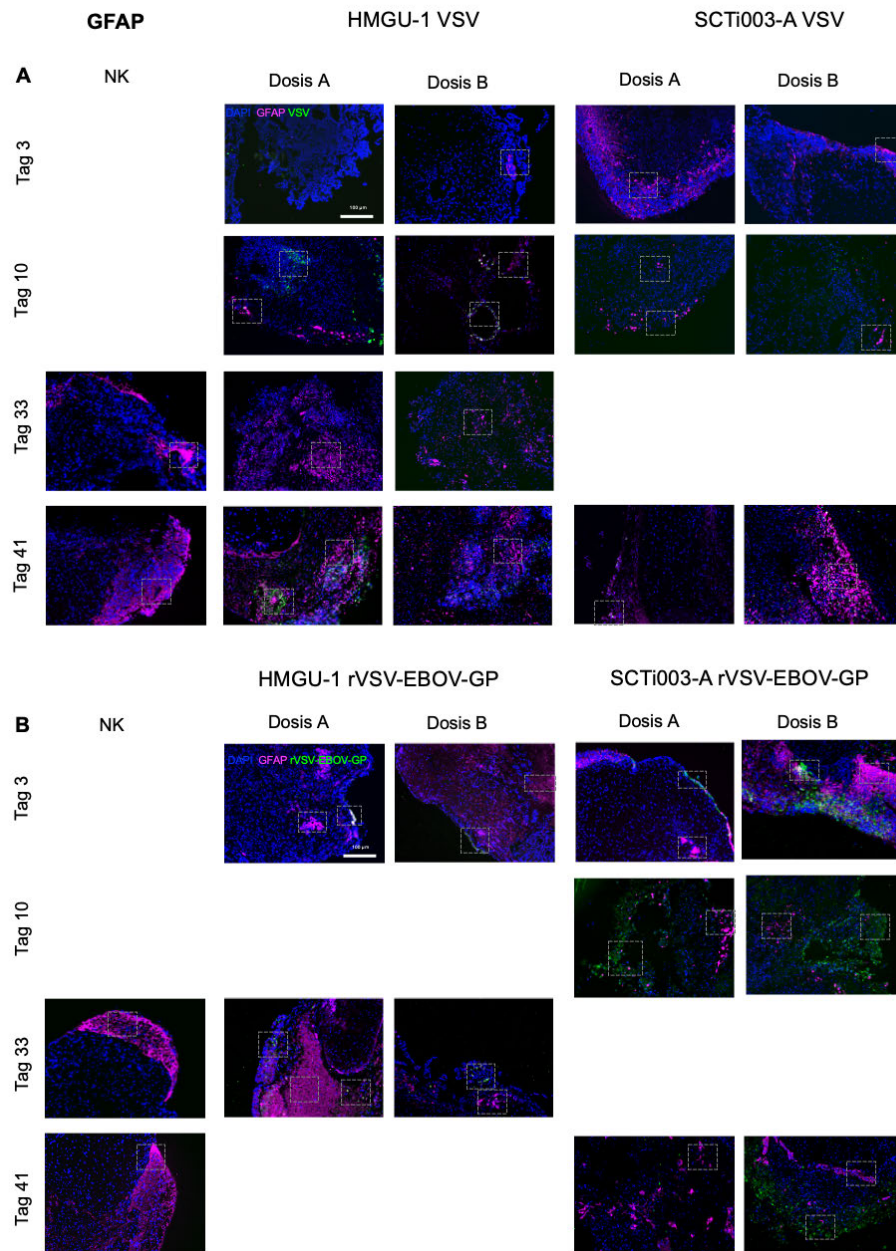


Abbildung 21: GFAP (Astrozyten) Färbung. Immunhistochemische Färbung von GFAP (magenta) und VSV- G [A] oder EBOV GP [B] (grün) an den entsprechenden Tagen nach einer Infektion mit VSV [A] oder rVSV-EBOV-GP [B] im HMGU-1 oder SCTi003-A Organoden, im Vergleich mit entsprechenden unifizierten Negativkontrolle (NK). DAPI in blau. Skala bei 100 µm. Bildaufnahme bei $\times 100$ Vergrößerung.

Darüber hinaus wurden die Proben mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, die entsprechenden Ergebnisse sind in der Abbildung 24 im Anhang dargestellt.

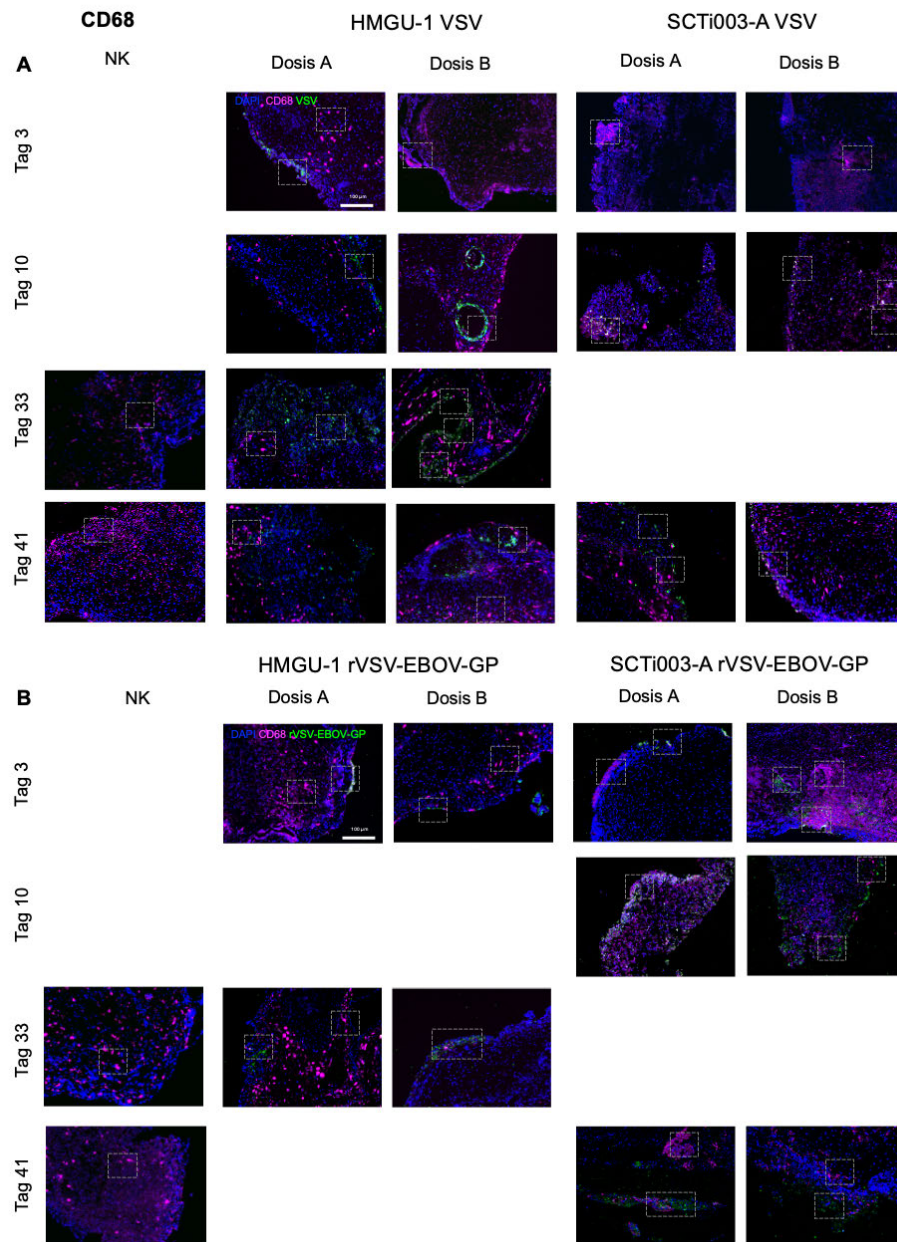


Abbildung 22: CD68 (Mikroglia) Färbung. Immunhistochemische Färbung von CD68 (magenta) und VSV G [A] oder EBOV GP [B] (grün) an den entsprechenden Tagen nach einer Infektion mit VSV [A] oder rVSV-EBOV-GP [B] im HMGU-1 oder SCTi003-A Organoden, im Vergleich mit entsprechenden unifizierten Negativkontrolle (NK). DAPI in blau. Skala bei 100 µm. Bildaufnahme bei $\times 100$ Vergrößerung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass rVSV-EBOV-GP, ähnlich wie EBOV ([36]), bereits drei Tage nach der Infektion in Mikroglia, Astrozyten und Neuronen, unabhängig von der Viruskonzentration und der Organoidenlinie, nachweisbar ist. Im Vergleich dazu wird VSV erst zu einem späteren Zeitpunkt in den Zellen detektiert, wobei die Nachweisbarkeit zwischen den Organoidenlinien und Dosen variiert. Darüber hinaus bleibt eine großflächige rVSV-EBOV-GP Infektion auch zum späteren Zeitpunkt (41 Tage) detektierbar.

7.4 Genomische Analyse von VSV und rVSV-EBOV-GP nach Langzeitinfektion im zerebralen Organoid

In vier Proben rVSV-EBOV-GP Dosis A Organoidlinie HMGU-1 wurde während der Titration der Proben des rVSV-EBOV-GP aus dem ersten Replikationsversuch in humanen zerebralen Organoiden der Linie HMGU-1 in vier Proben Plaques unterschiedlicher Größe beobachtet (Abb. 23). Die RNA der betroffenen rVSV-EBOV-GP Proben sowie der Virusstämme VSV und rVSV-EBOV-GP wurde anschließend sequenziert und mit dem ursprünglichen Virusstamm verglichen, um mögliche Mutationen der potenziell entstandenen viralen Mischpopulation zu identifizieren. In der Tabelle 14 wurden die detektierte Mutationen in den Proben aufgelistet und in der Tabelle 15 wurden die Mutationen in der Vorratslösungen des jeweiligen Virus aufgelistet. Zur Auswertung wurden die Mutationen, die in der Vorratslösungen auftreten, aus der Auswertung ausgenommen.

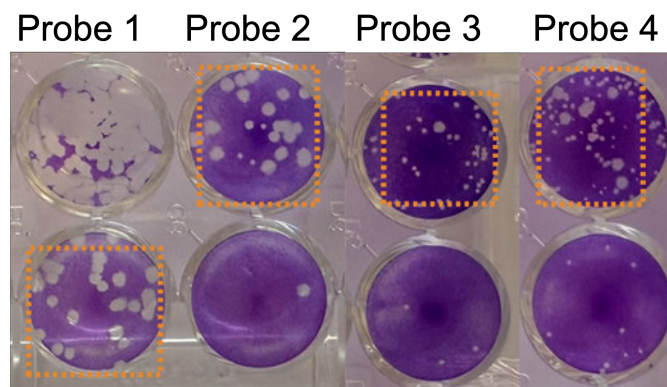


Abbildung 23: Bildaufnahme Platten mit unterschiedlich großen Plaques Titrierte rVSV-EBOV-GP Proben mit infizierten Organoid der Linie HMGU-1 mit unterschiedlichen Größen von Plaques. Dabei in Proben 1 überdurchschnittliche Plaquesgröße, sowie gemischte Plaquesgröße bei Proben 2-4.

Nach der Berücksichtigung der Mutationen in der Vorratslösungen, ist nur eine Mutation in der Probe 1 (Tab.14 eingrahmt) nach der Infektion der Gehirnorganoid entstanden. Die Mutation befindet sich im VSV L-Protein des rVSV-EBOV-GP an der Nukleotidposition 9318 und der Proteinposition L1529. Es handelt sich dabei um eine stille Mutation, sie tritt in der VSV Virusstammlösung aber nicht in der rVSV-EBOV-GP Virusstammlösung auf. Diese Mutation wurde in 98,78 % aller *Reads* detektiert und war somit dominant. Sie wurde in keinem anderen rVSV-EBOV-GP Isolat, welche auch große Plaques vorweisen (Abb. 23) detektiert und ist somit voraussichtlich nicht kausal.

Mutationen in Proben aus rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 mit Dosis A

Tabelle 14: Mutationen in Probe aus rVSV-EBOV-GP infizierten Organoiden der Linie HMGU-1 mit Dosis A nach 35 Tagen. Dabei AO = *Reads* mit Mutationen (engl. *Alternate Observations*), DP = Gesamtzahl an *Reads* an unterschiedlichen Positionen (engl. *Depth*), [OR712768 Ref. VSV Indiana Stamm [43]], [EVU28077 Ref. EBOV-GP [45]]

Probe	Referenz	AS Pos.	Gen	Mutation	AO	DP	Mutationsfreq (%)
Probe 1	OR712768	2783	M	Stille	842	844	99,76
	OR712768	9319	L	Stille	975	987	98,78
Probe 2	OR712768	2783	M	Stille	4249	4255	99,86
	EVU28077	138	GP	Intergenic	19	19	100,00
	EVU28077	282	GP	Missense	870	871	99,89
	EVU28077	1771	GP	Nonsense	737	744	99,06
Probe 3	OR712768	2783	M	Stille	3739	3743	99,89
	OR712768	4852	L	nicht detektierbar	1776	1931	91,97
	OR712768	4891	L	Stille	2023	2193	92,25
	OR712768	4915	L	Stille	2062	2249	91,69
	OR712768	4936	L	Stille	2191	2377	92,18
	OR712768	4969	L	Stille	2255	2443	92,30
	OR712768	4991	L	Missense	2257	2448	92,20
	OR712768	10956	L	Missense	1026	1115	92,02
	OR712768	11038	L	Stille	611	666	91,74
	EVU28077	138	GP	Intergenic	33	33	100,00
	EVU28077	282	GP	Missense	1992	1994	99,90
	EVU28077	1771	GP	Nonsense	2400	2409	99,63
	EVU28077	2172	GP	Intergenic	10	10	100,00
Probe 4	OR712768	2783	M	Stille	3113	3121	99,74
	EVU28077	138	GP	Intergenic	24	25	96,00
	EVU28077	282	GP	Missense	1488	1493	99,67
	EVU28077	1771	GP	Nonsense	1933	1943	99,49
	EVU28077	2172	GP	Intergenic	13	13	100,00

Zusammenfassen lässt sich im Rahmen des 3. Unterziels festhalten, dass in den rVSV-EBOV-GP Proben, welche Unterschiede im Plaquemuster vorweisen, keine Mutationen im EBOV-GP auftreten, welche nicht schon im Virusvorratslösungen kodiert waren sowie keine kodieren VSV Mutationen vorlegt. Folglich waren die Viren innerhalb der 33 Tagen evolutionär stabil.

8 Diskussion

8.1 Herstellung von humanen zerebralen Organoiden

In dieser Arbeit wurde ein humanes zerebrales Organoidmodell eingesetzt, um die Eignung für Studien zur EBOV Persistenz im zentralen Nervensystem (ZNS) im Zusammenhang mit dem Ersatzvirus rVSV-EBOV-GP zu evaluieren. Die zerebralen Organoiden ermöglichten die Nachbildung einer komplexen zellulären Umgebung, bestehend aus Neuronen, Astrozyten und Mikroglia, und stellten somit ein geeignetes *in vitro* Modell dar, um virusbedingte Prozesse im menschlichen ZNS zu untersuchen [26, 28, 36]. Die Herstellung wurde basierend auf der Arbeit von Lancaster et al. [26, 28, 36] durchgeführt, wobei ein kommerzielles Kit benutzt wurde [37]. Gehirnanorganoide, die mit diesem Protokoll generiert werden, weisen eine Mikrogliapopulation auf, welche den Beschreibungen von Ormel et al. entspricht [31].

Die Organoiden, die im Rahmen dieses Projektes generiert wurden, wiesen keine sichtbaren Defekte auf und die mikroskopische Charakterisierung zeigte, dass die untersuchte Zellen wie Mikroglia, Neuronen sowie Astrozyten entwickelt wurden.

Des Weiteren ist zu bemerken, dass, im Vergleich zu anderen Infektionsversuchen in Gehirnanorganoiden, die Organoiden in diesem Projekt vor der Infektion länger maturiert (100 Tage) wurden [46]. Dies wurde mit der später zunehmenden Präsenz von Gliazellen in Gehirnanorganoiden begründet [29]. Für das Organoidmodell sollte generell angemerkt werden, dass es keine adaptiven Immunzellen oder Vaskularisation besitzt [30, 31, 47]. Künftige Studien könnten dieses Modell durch die Integration weiterer immunologischer Komponenten oder Endothelzellen erweitern, um die Mechanismen der Virus-Wirts-Interaktion noch präziser nachzuvollziehen.

8.2 Replikation von rVSV-EBOV-GP entspricht der des VSV anstatt des authentischen EBOV in humanen zerebralen Organoiden

Eines der zentralen Ziele dieser Bachelorarbeit bestand darin, rVSV-EBOV-GP als potenzielles Ersatzmodell für EBOV Persistenzstudien *in vitro* unter BSL-2 Bedingungen zu evaluieren. Zu diesem Zweck wurden humane zerebrale Organoiden über einen Zeitraum von 41 Tagen mit rVSV-EBOV-GP beziehungsweise VSV infiziert. Hier wurde beobachtet, dass rVSV-EBOV-GP eine beinahe identische Kinetik wie VSV Indiana vorweist, obwohl es sich um einen Impfstamm handelt. In Rahmen der Literaturrecherche wurden keine Organoidinfektionen der VSV oder rVSV-EBOV-GP gefunden.

Während in VeroE6 Zellen bei der Anzucht eine leichte Attenuierung beobachtet wurde, die sich in langsamerer Replikation und verzögertem ZPE etablierte, so replizierte rVSV-EBOV-GP im Gehirnanorganoid nicht signifikant attenuierter als VSV. Zwar wurde in der

Gruppe SCTi003-A nach rVSV-EBOV-GP Infektion eine leichte Verzögerung der Viruskinetik beobachtet, jedoch trat dies ausschließlich an Tag 0 in HMGU-1 sowie an Tag 3 in SCTi003-A auf. Bei der ersten Organoidinfektion der Linie HMGU-1 mit VSV zeigte sich ein signifikant höherer Ausgangstitel, der um eine log-Stufe über dem von rVSV-EBOV-GP lag. Diese Tendenz trat erneut bei der Infektion der Gruppe SCTi003-A auf, was voraussichtlich einen Einfluss auf die Kinetik hatte. Ob es zu einer tatsächlichen Infektionsverlangsamung kam, unter Anbetracht der darauffolgend vergleichbaren Kinetik, kann daher nicht eindeutig festgestellt werden.

Bei mit rVSV-EBOV-GP in HMGU-1 Organoiden zeigte sich für beide eingesetzten Dosen ein identischer Ausgangstitel. Dies könnte methodisch bedingt sein, etwa durch Variation bei der Probenahme, der Virusadsorption oder technischen Faktoren der Quantifizierung. Beim Vergleich der Linien HMGU-1 und SCTi003-A wurden keine entscheidenden Unterschiede bei der VSV Infektion beobachtet. Dies deutet auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin. Die Organoide der Linie HMGU-1, die mit rVSV-EBOV-GP infiziert wurden, waren kontaminiert und es lassen sich keine eindeutigen Schlüsse ziehen. Jedoch verhielt sich die SCTi003-A Infektion mit rVSV-EBOV-GP des zweiten Versuchs ähnlich wie die Infektion in HMGU-1 Organoiden des ersten Versuchs. Daher scheinen die beobachteten Effekte linienunabhängig zu sein. Insgesamt lässt sich festhalten, dass VSV und rVSV-EBOV-GP im Gehirnanorganoidmodell schnell zu hohen Titern replizieren und die Ergebnisse in verschiedenen Organoidlinien reproduzierbar sind.

Zusätzlich zeigte sich in den Replikationsversuchen mit der Organoidlinie HMGU-1, dass die Viruskonzentration der Infektionsdosis A am Ende des Infektionszeitraums höher war als jene der Dosis B, obwohl Dosis A zu Beginn eine geringere Ausgangsdosis aufwies. Ein ähnliches Muster wurde auch bei der Organoidlinie SCTi003-A nach Infektion mit rVSV-EBOV-GP beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass Infektionen mit geringerer Dosis zu final höheren Endtitern führen könnten. Darüber hinaus, wurde bei VSV und rVSV-EBOV-GP nach einem Replikationsminimum zwischen 21 und 37 Tagen ein erneuter Anstieg vermerkt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte der Beginnende Zerfall der Organoide und die damit einhergehende Freisetzung viraler Partikel aus dem interstitiellen Bereich der Organoide sein. Denn am Ende des Infektionszeitraums wiesen die VSV und rVSV-EBOV-GP infizierten Organoide, neben ausgeprägtem ZPE, auch die Beendigung ihrer Stoffwechselaktivität vor. Es wurde kein entsprechender Viabilitätsassay, beispielsweise LDH-Assay, durchgeführt, um den ZPE zu quantifizieren. Dies sollte in zukünftigen Versuchsabläufen gemacht werden.

Die Vergleichsdaten zur EBOV Infektion konnten nicht zeitgleich mit den rVSV-EBOV-GP bzw. VSV Infektionen erhoben werden, da die EBOV Versuche unter BSL-4 Sicherheitsbedingungen durchgeführt werden mussten [36]. Jedoch wurde mit der selben Dosis und im selben Ablauf infiziert. Die Experimente mit EBOV wurden von Dr. rer. nat. L. Widerspick durchgeführt und in ihrer Arbeit veröffentlicht [36]. Dabei erwies sich dasselbe Organoid-

modell als stabil für Langzeitinfektionen mit EBOV über einen Zeitraum von mehr als 100 Tagen [36]. Über 120 Tagen zeigten die Organoide kein ausgeprägtes ZPE und haben bis Experimentsende das Virus repliziert [36]. In dieser Arbeit konnte kein entsprechend langes Persistenzexperiment durchgeführt werden, jedoch wurden 41 Tage Infektion untersucht, da ab diesem Zeitraum bei authentischem EBOV eine Stabilisierung der Infektion mit plateauartigem Verlauf vorlag [36]. Ein weiterer Grund für den frühzeitigen Abbruch des Experiments war, dass im Vergleich zu den EBOV Infektionen die mit rVSV-EBOV-GP bzw. VSV infizierten Organoide bereits ab Tag 21 VSV und ab Tag 17 rVSV-EBOV-GP ausgeprägte ZPE aufwiesen und bis Tag 41 teilweise vollständig zerfielen.

VSV und rVSV-EBOV-GP replizierten früh signifikant schneller als EBOV, wobei die Titer ab Tag 12 stark abfielen und zu den späten Zeitpunkten signifikant niedriger waren als bei EBOV. Folglich, wie bereits vermerkt, entsprach der Replikationsverlauf von rVSV-EBOV-GP somit generell eher dem des VSV als authentischem EBOV. Dies ist voraussichtlich auf den Ursprung des rVSV-EBOV-GP zurückzuführen ist, bei dem lediglich das Glykoprotein (G) des VSV durch das Glykoprotein (GP) des EBOV ersetzt wurde [17–20].

Somit umfasst der größte genomische Anteil des rekombinanten rVSV-EBOV-GP die Gene des VSV. Dies beinhaltet die gesamte Replikationsmaschinerie des VSV inklusive der Polymerase (L) [48, 49]. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich festhalten, dass rVSV-EBOV-GP nicht als Ersatzmodell für die Charakterisierung des Langzeitinfektionsverlaufs des authentischen EBOV im Gehirnanorganoidmodell dienen kann. Des Weiteren kann gefolgert werden, dass das EBOV-GP individuell nicht die persistente Replikationskinetik des authentischen EBOV im Gehirnanorganoidmodell bestimmt.

8.3 Die Zielzellen des rVSV-EBOV-GP entsprechen denen des authentischen EBOV

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Zielzellen von VSV und rVSV-EBOV-GP zu identifizieren und diese mit den Angriffspunkten von EBOV zu vergleichen. Dafür wurden die zerebralen Organoide 3, 10, 33 und 41 Tage nach der Infektion immunhistochemisch aufgearbeitet und gefärbt. Dabei wurden Neuronen, Astrozyten sowie Mikroglia mithilfe spezifischer Antikörper markiert. rVSV-EBOV-GP konnte bereits 3 Tage nach der Infektion in den Proben nachgewiesen werden, während VSV erst zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 10) detektiert wurde.

In denselben Proben, die noch nicht positiv für VSV-G waren, konnten jedoch hohe VSV Titer nachgewiesen werden. Es gilt anzumerken, dass die Präsenz von VSV-G positiven Arealen im Organoid zu früheren Zeitpunkten nicht ausgeschlossen werden kann, da keine Gesamtorganoidfärbung oder Durchflusszytometrische Analyse sondern Färbung von Schnitten durchgeführt wurde. Jedoch wurden mehrere Organoide pro Zeitpunkt pro Gruppe gefärbt. Daher und in Anbetracht der hohen Virusreplikation, könnte der Unterschied

eventuell auf methodologischer Ebene liegen und die verwendeten Antikörper und deren Nachweisgrenzen zurückzuführen sein.

Nichtsdestotrotz wurde für VSV und rVSV-EBOV-GP die Infektion aller drei untersuchten Zelltypen nachgewiesen, durch Lokalisation von viralem Glykoprotein mit dem entsprechenden Zellmarker. Auch EBOV infiziert auch Mikroglia, Astrozyten und Neuronen im Organoidmodell [36]. Somit stimmt der zelluläre Tropismus von rVSV-EBOV-GP und EBOV im Gehirnanorganoidmodell überein.

Dies liegt voraussichtlich an der Expression des EBOV Oberflächenproteins GP in rVSV-EBOV-GP, denn GP ist im EBOV Lebenszyklus für die Bindung an zelluläre Rezeptoren, die Internalisierung sowie die Fusion mit der Membran des Endolysosoms verantwortlich [14]. In Menschen mit EBOV Persistenz ist das Reservoir im Gehirn nicht spezifisch bekannt [14]. Aus Sicherheitsgründen wurden bei den an Ebola-Virus-Meningoenzephalitis verstorbenen Patienten bisher keine histologischen Schnitte für weitere Forschung angefertigt. In historischen Primatenproben wurde EBOV jedoch in Mikroglia und Makrophagen im Gehirn detektiert [16]. Somit stimmt dies mit dem rVSV-EBOV-GP und EBOV Gehirnanorganoidmodell überein. Das Ersatzsystem rVSV-EBOV-GP wurde bereits von anderen im Kontext verschiedener Studien benutzt, um Experimente auf BSL-2 durchzuführen. In der Studie von Messingham et al. (2025) [25], in der Hautexplantate mit EBOV sowie rVSV-EBOV-GP infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass rVSV-EBOV-GP ähnliche bzw. vergleichbare Zielzellen infiziert wie EBOV.

Zuletzt muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch VSV im vorliegenden Modell Astrozyten, Neuronen, und Mikroglia infiziert. Im Artikel von Krause et al. (2024) [50] wurden Mäuse mit dem rekombinanten VSV mit GFP Marker (grün fluoreszierendes Protein engl. *green fluorescent protein*) infiziert. Die Ergebnisse zeigten eine ausgeprägte Zelltypspezifität der Infektion, dabei wiesen Neuronen die höchste Anfälligkeit mit überwiegend produktiver Virusreplikation auf, während Astrozyten eine moderate Permissivität zeigten. Mikrogliazellen hingegen waren weitgehend resistent gegenüber der Infektion und wurden nur selten infiziert. Daher ist das Organoidmodell gute Darstellung für VSV Infektion bezüglich der Neuronen und Astrozyten. Ob die Infektion der Mikroglia am humangenetischen Hintergrund liegt, kann dieser Stelle nicht genau festgemacht werden. Insgesamt lässt sich somit für die zweite Fragestellung dieser Arbeit festhalten, dass rVSV-EBOV-GP und EBOV einen vergleichbaren Wirtszelltropismus vorzuweisen scheinen und somit rVSV-EBOV-GP geeignet ist, um dieser Fragestellung nachzugehen.

8.4 rVSV-EBOV-GP bleibt bei der Langzeitinfektion von zerebralen Organoiden genetisch stabil

Im dritten Ziel dieser Arbeit galt es zu untersuchen, ob sich das Virus rVSV-EBOV-GP an die zelluläre Umgebung humaner zerebraler Organoiden anpasst und gegebenenfalls

genomische Mutationen auftreten. Die Polymerase (L) des VSV hat keine *proof-reading* Funktion, sodass grundsätzlich eine Mutationsrate von 0,1-1 falschen Nukleotiden pro 10 000 Nukleotide pro Replikationszyklus vorliegt [51]. Somit sind Nukleotidveränderungen in Langzeitexperimenten wie diesem statistisch zu erwarten [52].

Tatsächlich traten bei der Infektion der Gehirngorganoide mit rVSV-EBOV-GP über 33 Tage Plaques unterschiedlicher GröÙer auf, was auf eine virale Mischpopulation hinwies [53, 54].

Deshalb wurden diese Proben mit einer Tiefe von 500-1000 *Reads* tief sequenziert, um zu überprüfen, ob es zu Anpassungen im VSV oder EBOV-GP Genomanteil des rVSV-EBOV-GP kam.

Die Sequenzen an Tag 33 wurden mit den jeweiligen Sequenzen in der Infektionsstammlösung verglichen. Nur eine Mutation im L-Gen des VSV einer rVSV-EBOV-GP Probe konnte nachgewiesen werden, die nicht bereits in der rVSV-EBOV-GP Stammlösung vorhanden war. Diese Mutation stellte sich als stille Mutation heraus, sodass es zu keiner Veränderung auf Proteinebene kam, weshalb keine drastischen funktionellen Konsequenzen zu erwarten sind. Im Rahmen der Literaturrecherche wurde diese Mutation nicht gefunden. Allerdings ist das L-Protein für Transkription und Replikation verantwortlich und die Mutation an dem Gen könnte unter anderem zu kleinen oder auch größeren Plaques führen [55], sollte sie auf der RNA-Ebene Einfluss haben.

Es ist anzumerken, dass die Mutation auch in der VSV-Virusstammlösung auftrat. Sie könnte durch eine Kontamination mit VSV entstanden sein oder der Verlust einer Mutation des rVSV-EBOV-GP Impfstamms zurück zu VSV Indiana. In zukünftigen Studien könnte dies durch Plaque Isolation verschiedener rVSV-EBOV-GP Subvarianten der entsprechenden rVSV-EBOV-GP Probe genauer untersucht werden. Im Gegensatz zum vergleichsweise stabilen rVSV-EBOV-GP konnten bei der persistenten Infektion von Gehirngorganoiden mit EBOV hingegen nach einer Langzeitinfektion in mehreren Proben verschiedene Mutationen im GP detektiert werden [36]. Keine dieser Mutationen wurde in dem vorliegenden Modell detektiert. Hier muss jedoch beachtet werden, dass die EBOV GP Mutation nach 120 Tagen und nicht nach 33 Tagen, wie hier, auftrat. Folglich hatte das Virus mehr Replikationszyklen und daher statistisch eine größere Wahrscheinlichkeit zu mutieren. Nichtsdestotrotz wären Folgeversuche, in den die in authentischem EBOV detektierten GP Mutationen in das GP des rVSV-EBOV-GP eingefügt werden, von großem Interesse. Um die genomische Evolution anderer EBOV Gene, die nicht in rVSV-EBOV-GP codiert sind, zu untersuchen, ist das Surrogatsystem nicht geeignet.

Abschließend lässt sich für die dritte Zielstellung dieser Arbeit festhalten, dass sich rVSV-EBOV-GP als stabiles und geeignetes EBOV Ersatzmodell für Kurzzeitinfektionen erwiesen hat.

8.5 Bewertung von rVSV-EBOV-GP als Ersatzmodell für EBOV in ZNS Persistenzversuchen

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass sowohl VSV als auch rVSV-EBOV-GP in humanen zerebralen Organoiden eine produktive Infektion etablieren können, deren Kinetik sich signifikant von der des EBOV unterscheidet. Andererseits entsprechen die zellulären Ziele des rVSV-EBOV-GP den des EBOV und das Virus mutiert im Organoidsystem nicht. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Surrogatviren, wie rVSV-EBOV-GP, wertvolle Werkzeuge zur Untersuchung von Teilaspekten der Virus-Wirt-Interaktion des EBOV sein können, jedoch nicht alle Aspekte der EBOV Langzeitinfektion vollständig abbilden können. Folglich ist rVSV-EBOV-GP eher ein geeignetes EBOV Ersatzmodell für Kurzzeitinfektion unter BSL-2 Bedingungen als für Langzeitpersistenzversuche zur Aufklärung von viraler Kinetik, ZPE oder viraler Evolution.

9 Ausblick

Diese Arbeit zeigt auf, dass humane zerebrale Organoide ein vielversprechendes Modell zur Untersuchung von Aspekten viraler Infektionen im Zentralnervensystem (ZNS) darstellen und Viren in diesem Modell grundsätzlich charakteristische Replikationsprofile ausbilden. Das hier etablierte Modell wird aufgrund seiner organisatorisch einfachen Handhabung als BSL-2 System die Basis für zukünftige Vorstudien bilden, die zur Entwicklung antiviraler Strategien und eines tieferen Verständnisses der EBOV ZNS Pathogenese beitragen.

Somit können auch BSL-4 Versuche reduziert werden und das Infektionsmodell ist Forschenden, die keinen Zugang zu einem BSL-4 Labor haben, zugänglich. Die Nutzung eines BSL-2 Systems macht außerdem die Nutzung innovativer Methoden, wie beispielsweise *live-cell Imaging*, möglich, da die technologische Kompetenz von BSL-4 Laboren meist limitiert ist. Folglich, könnte mit einem rVSV-EBOV-GP-fluoreszierenden Reportervirus, die Live-Ausbreitung im Gehirnorganoid studiert werden.

Künftige Studien könnten zusätzlich basierend auf Ergebnissen dieser Arbeit durch Erweiterung der immunologischen Komponenten die Mechanismen der Virusausbreitung und und ZNS Infektion noch präziser nachzuvollziehen. Von besonderer Bedeutung wäre zur Untersuchung der Virusinfektion im Gehirn bzw. des ZNS das Modell *Brain organoid-on-a-chip* [47]. Dabei könnten die menschliche Gehirnphysiologie und Pathologie *in vitro* mit hoher Präzision abgebildet werden und die Infektion damit noch präziser modelliert werden [46]. Da rVSV-EBOV-GP dieselben ZNS Zellen wie EBOV infiziert, wäre dieses Modell geeignet. Dies wäre ebenfalls eine Alternative zu bereits bestehenden Tiermodellen [56]. Im Falle der Modells *Brain organoid-on-a-chip* könnte bei einer Infektion mit rVSV-EBOV-GP auch die Infektion der Blut-Hirn-Schranke untersucht werden, um die Passage von EBOV in das menschliche Gehirn zu untersuchen und somit einen wichtigen Beitrag zu bestehenden Lücken bezüglich der EBOV Gehirninfection beitragen.

10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Julien Béthune bedanken, der meine Arbeit an der HAW Hamburg freundlicherweise betreut hat.

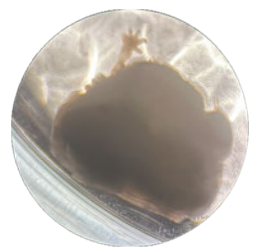
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. César Muñoz-Fontela für die wertvollen Anregungen und dafür, dass ich meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte.

Ebenso möchte ich meiner Betreuerin Dr. Lina Widerspick meinen tiefen Dank aussprechen. Du hast mich während der gesamten Anfertigung dieser Arbeit mit großem Engagement begleitet. Besonders dankbar bin ich für die Freiheit, eigene Ideen einbringen und umsetzen zu dürfen. Deine fachliche Begleitung und dein Vertrauen haben mir nicht nur die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht, sondern auch meine wissenschaftliche Denkweise nachhaltig geprägt. Ich freue mich sehr, mit dir gearbeitet zu haben und so viel von dir gelernt zu haben.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch allen Mitgliedern der AG Virus-Immunologie sowie allen anderen Mitarbeitenden des BNITM für die freundliche Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die technische Unterstützung im Labor.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für eure Unterstützung, eure Liebe und euer Verständnis. Besonderer Dank gilt Anna und Tatiana, die mich während meines Studiums stets begleitet und mir immer Halt gegeben haben.

Abschließend möchte ich auch meinem jüngeren Ich danken - dafür, dass ich nie aufgegeben habe und stets an meine eigenen Kräfte und meine innere Stärke geglaubt habe.



Literaturverzeichnis

- [1] D. Malvy, A. K. McElroy, H. de Clerck, S. Gunther und J. van Griensven, „Ebola virus disease,“ *The Lancet*, Jg. 393, Nr. 10174, S. 936–948, 2019. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)33132-5. Adresse: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)33132-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33132-5).
- [2] S. T. Jacob u. a., „Ebola virus disease,“ *Nature Reviews Disease Primers*, Jg. 6, S. 13, 2020. DOI: 10.1038/s41572-020-0147-3. Adresse: <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0147-3>.
- [3] T. Garske u. a., „Heterogeneities in the case fatality ratio in the West African Ebola outbreak 2013–2016,“ *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Jg. 372, Nr. 1721, S. 20160308, 2017, PMCID: PMC5394646. DOI: 10.1098/rstb.2016.0308. Adresse: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0308>.
- [4] B. S. Bodmer, T. Hoenen und L. Wendt, „Molecular insights into the Ebola virus life cycle,“ *Nature Microbiology*, Jg. 9, S. 1417–1426, 2024. DOI: 10.1038/s41564-024-01703-z. Adresse: <https://doi.org/10.1038/s41564-024-01703-z>.
- [5] K. Konduru, A. C. Shurtleff, S. Bavari und G. Kaplan, „High degree of correlation between Ebola virus BSL-4 neutralization assays and pseudotyped VSV BSL-2 fluorescence reduction neutralization test,“ *Journal of Virological Methods*, Jg. 254, S. 1–7, 2018, PMCID: PMC5826800. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.01.003. Adresse: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.01.003>.
- [6] Robert Koch-Institut. „Biosafety Level 4 Laboratory (BSL-4).“ Accessed on 26 October 2025. (2025), Adresse: <https://www.rki.de/EN/Topics/Research-and-data/Specialised-laboratories/BSL-4-laboratory/bsl-4-laboratory.html> (besucht am 26. 10. 2025).
- [7] C. S. Kraft u. a., „The Use of TKM-100802 and Convalescent Plasma in 2 Patients With Ebola Virus Disease in the United States,“ *Clinical Infectious Diseases*, Jg. 61, Nr. 4, S. 496–502, 2015, Nebraska Biocontainment Unit and the Emory Serious Communicable Diseases Unit. DOI: 10.1093/cid/civ334.
- [8] W. H. Organization, *Ebola disease: Fact sheet*, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-disease>, Accessed 7 November 2025, Nov. 2025.
- [9] W. H. Organization, *SOLIDARITY PARTNERS: Platform Adaptive Randomised Trial for New and Repurposed Filovirus Treatments. CORE Trial Protocol*, Version 5.0, Accessed 7 November 2025, Geneva, Juli 2024. Adresse: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/r-d-blueprint-meetings/pan_filo_4.0_disclaimer.pdf.

- [10] W. H. Organization, *Clinical management of patients with viral haemorrhagic fever: a pocket guide for front-line health workers. Interim emergency guidance for country adaptation*, 2. Aufl. Geneva: World Health Organization, 2016, ISBN: 9789241549608. Adresse: <https://iris.who.int/handle/10665/205570>.
- [11] K. Brauburger, Y. Boehmann, V. Krähling und E. Mühlberger, „Transcriptional regulation in Ebola virus: Effects of gene border structure and regulatory elements on gene expression and polymerase scanning behavior,“ *Journal of Virology*, Jg. 90, Nr. 4, S. 1898–1909, 2016. DOI: 10.1128/JVI.02341-15. Adresse: <https://doi.org/10.1128/jvi.02341-15>.
- [12] A. Sanchez, M. P. Kiley, B. P. Holloway und D. D. Auferin, „Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus,“ *Virus Research*, Jg. 29, Nr. 3, S. 215–240, 1993. DOI: 10.1016/0168-1702(93)90063-S. Adresse: [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(93\)90063-S](https://doi.org/10.1016/0168-1702(93)90063-S).
- [13] J. He u. a., „Ebola Virus Delta Peptide Is a Viroporin,“ *Journal of Virology*, Jg. 91, Nr. 16, e00438–17, 2017. DOI: 10.1128/JVI.00438-17.
- [14] M. Jacobs u. a., „Late Ebola virus relapse causing meningoencephalitis: a case report,“ *The Lancet*, Jg. 388, Nr. 10043, S. 498–503, 2016, Epub 2016 May 18. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30386-5.
- [15] P. Howlett u. a., „Ebola Virus Disease complicated by late-onset encephalitis and polyarthritis, Sierra Leone,“ *Emerging Infectious Diseases*, Jg. 22, Nr. 1, S. 150–152, 2016, PMCID: PMC4696703. DOI: 10.3201/eid2201.151212. Adresse: <https://doi.org/10.3201/eid2201.151212>.
- [16] D. Mukadi-Bamuleka u. a., „Fatal meningoencephalitis associated with Ebola virus persistence in two survivors of Ebola virus disease in the Democratic Republic of the Congo: a case report study,“ *Lancet Microbe*, Jg. 5, Nr. 10, S. 100905, 2024, Epub 2024 Sep 3. DOI: 10.1016/S2666-5247(24)00137-X.
- [17] A. N. Pinski und I. Messaoudi, „Therapeutic vaccination strategies against EBOV by rVSV-EBOV-GP: the role of innate immunity,“ *Current Opinion in Virology*, Jg. 51, S. 179–189, 2021, ISSN: 1879-6257. DOI: 10.1016/j.coviro.2021.10.007. Adresse: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.10.007>.
- [18] U.S. Food and Drug Administration. „FDA Approves Treatment for Ebola Virus.“ Accessed on 29 October 2025. (2020), Adresse: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-treatment-ebola-virus> (besucht am 29.10.2025).

- [19] European Commission. „Ervebo – Zulassung des Ebola-Impfstoffs (rVSVΔG-ZEBOV-GP).“ Official document of the European Commission, Community Register of Medicinal Products. Accessed on 29 October 2025. (2019), Adresse: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2019/20191111146469/anx_146469_de.pdf (besucht am 29. 10. 2025).
- [20] C. Woolsey und T. W. Geisbert, „Current state of Ebola virus vaccines: a snapshot,“ *PLoS Pathogens*, Jg. 17, Nr. 12, e1010078, 2021, PMCID: PMC8659338. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010078. Adresse: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010078>.
- [21] L. L. Rodriguez, S. J. Pauszek, T. A. Bunch und K. R. Schumann, „Full-length genome analysis of natural isolates of vesicular stomatitis virus (Indiana 1 serotype) from North, Central and South America,“ *Journal of General Virology*, Jg. 83, Nr. 10, S. 2475–2483, 2002. DOI: 10.1099/0022-1317-83-10-2475. Adresse: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2475>.
- [22] A. Roberts, L. Buonocore, R. Price, J. Forman und J. K. Rose, „Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors,“ *Journal of Virology*, Jg. 73, Nr. 5, S. 3723–3732, 1999, PMCID: PMC104148. DOI: 10.1128/JVI.73.5.3723-3732.1999. Adresse: <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3723-3732.1999>.
- [23] G. Liu u. a., „Vesicular stomatitis virus: from agricultural pathogen to vaccine vector,“ *Pathogens*, Jg. 10, Nr. 9, S. 1092, 2021, PMCID: PMC8470541. DOI: 10.3390/pathogens10091092. Adresse: <https://doi.org/10.3390/pathogens10091092>.
- [24] E. Suder, W. Furuyama, H. Feldmann, A. Marzi und E. de Wit, „The vesicular stomatitis virus-based Ebola virus vaccine: from concept to clinical trials,“ *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, Jg. 14, Nr. 9, S. 2107–2113, 2018, PMCID: PMC6183239. DOI: 10.1080/21645515.2018.1473698. Adresse: <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1473698>.
- [25] K. N. Messingham u. a., „Multiple cell types support productive infection and dynamic translocation of infectious Ebola virus to the surface of human skin,“ *Science Advances*, Jg. 11, Nr. 1, eadr6140, 2025. DOI: 10.1126/sciadv.adr6140. eprint: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.adr6140>.
- [26] M. A. Lancaster und J. A. Knoblich, „Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells,“ *Nature Protocols*, Jg. 9, Nr. 10, S. 2329–2340, 2014, PMCID: PMC4160653. DOI: 10.1038/nprot.2014.158. Adresse: <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>.

- [27] X. Su u. a., „Human brain organoids as an in vitro model system of viral infectious diseases,“ *Frontiers in Immunology*, Jg. 12, S. 792–316, 2022, PMCID: PMC8786735. DOI: 10.3389/fimmu.2021.792316. Adresse: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.792316>.
- [28] M. A. Lancaster u. a., „Cerebral organoids model human brain development and microcephaly,“ *Nature*, Jg. 501, Nr. 7467, S. 373–379, 2013. DOI: 10.1038/nature12517.
- [29] M. Verkerke u. a., „Transcriptomic and morphological maturation of human astrocytes in cerebral organoids,“ *Glia*, Jg. 72, Nr. 2, S. 362–374, 2024. DOI: 10.1002/glia.24479. Adresse: <https://doi.org/10.1002/glia.24479>.
- [30] K. Kierdorf u. a., „Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways,“ *Nature Neuroscience*, Jg. 16, Nr. 3, S. 273–280, 2013. DOI: 10.1038/nn.3318. Adresse: <https://doi.org/10.1038/nn.3318>.
- [31] P. R. Ormel u. a., „Microglia innately develop within cerebral organoids,“ *Nature Communications*, Jg. 9, Nr. 1, S. 4167, 2018, PMCID: PMC6177485. DOI: 10.1038/s41467-018-06684-2. Adresse: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06684-2>.
- [32] J. Antonucci und L. Gehrke, „Cerebral Organoid Models for Neurotropic Viruses,“ *ACS Infectious Diseases*, Jg. 5, Nr. 12, S. 1976–1979, 2019, Epub 2019 Oct 3. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00339.
- [33] A. Ramani u. a., „SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids,“ *The EMBO Journal*, Jg. 39, Nr. 20, e106230, 2020, PMCID: PMC7560208. DOI: 10.15252/emj.2020106230. Adresse: <https://doi.org/10.15252/emj.2020106230>.
- [34] E. Gabriel u. a., „Recent Zika Virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids,“ *Cell Stem Cell*, Jg. 20, Nr. 3, 397–406.e5, 2017. DOI: 10.1016/j.stem.2016.12.005. Adresse: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.005>.
- [35] A. Rybak-Wolf u. a., „Modelling viral encephalitis caused by Herpes simplex virus 1 infection in cerebral organoids,“ *Nature Microbiology*, Jg. 8, Nr. 7, S. 1252–1266, 2023, PMCID: PMC10322700. DOI: 10.1038/s41564-023-01405-y. Adresse: <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01405-y>.
- [36] L. Widerspick, „A human cerebral organoid model to investigate the role of the host-pathogen interface in Ebola virus persistence in the central nervous system,“ Diss., The Institute for Biochemistry of the University of Lübeck, 2024.
- [37] STEMCELL Technologies, *STEMdiff Cerebral Organoid Kit*, Version 05, Catalog No. 08570, 08571, 2025. Adresse: <https://www.stemcell.com/products/stemdiff-cerebral-organoid-kit.html> (besucht am 09.09.2025).

- [38] QIAGEN, *QIAamp Viral RNA Mini Kit: Purification of Viral RNA (Spin Protocol)*, Protocol version 06/2023, 2023. Adresse: <https://www.qiagen.com>.
- [39] D. Blankenberg, A. Gordon, G. Von Kuster, N. Coraor, J. Taylor und A. Nekrutenko, „Manipulation of FASTQ data with Galaxy,“ *Bioinformatics*, Jg. 26, Nr. 14, S. 1783–1785, 2010. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq281. Adresse: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq281>.
- [40] A. M. Bolger, M. Lohse und B. Usadel, „Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data,“ *Bioinformatics*, Jg. 30, Nr. 15, S. 2114–2120, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170. Adresse: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- [41] T. Seemann. „snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads.“ Version verfügbar unter <https://github.com/tseemann/snippy>. (2015), Adresse: <https://github.com/tseemann/snippy> (besucht am 12.09.2025).
- [42] P. Cingolani u. a., „A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff,“ *Fly*, Jg. 6, Nr. 2, S. 80–92, 2012. DOI: 10.4161/fly.19695. Adresse: <https://doi.org/10.4161/fly.19695>.
- [43] National Center for Biotechnology Information. „Vesicular stomatitis virus isolate CIPZB1-VSV-Indiana, complete genome.“ GenBank Accession: OR712768, LOCUS OR712768. (2024), Adresse: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OR712768>.
- [44] NCBI. „Ebola virus isolate Ebola virus/H. sapiens-tc/COD/1995/Kikwit-9510623, complete genome.“ GenBank Accession: KU182898, LOCUS KU182898. (2015), Adresse: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KU182898>.
- [45] National Center for Biotechnology Information. „Zaire ebolavirus strain Zaire95 virion spike glycoprotein (SP) gene, complete cds, and small/secreted glycoprotein precursor (SGP) gene, complete cds.“ GenBank Accession: EVU28077, LOCUS EVU28077. (1995), Adresse: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EVU28077>.
- [46] J. Dang u. a., „Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3,“ *Cell Stem Cell*, Jg. 19, Nr. 2, S. 258–265, Aug. 2016, Epub 2016 May 6. DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.014.
- [47] J. Song, S. Bang, N. Choi und H. N. Kim, „Brain organoid-on-a-chip: A next-generation human brain avatar for recapitulating human brain physiology and pathology,“ *Bio-microfluidics*, Jg. 16, Nr. 6, S. 061 301, Nov. 2022. DOI: 10.1063/5.0121476.

- [48] S. P. J. Whelan, J. N. Barr und G. W. Wertz, „Identification of a Minimal Size Requirement for Termination of Vesicular Stomatitis Virus mRNA: Implications for the Mechanism of Transcription,“ *Journal of Virology*, Jg. 74, Nr. 18, S. 8268–8276, 2000. DOI: 10.1128/JVI.74.18.8268–8276.2000.
- [49] M. M. Ahmed, O. J. Okesanya, B. M. Ukoaka, A. M. Ibrahim und I. Lucero-Prisno D. E., „Vesicular Stomatitis Virus: Insights into Pathogenesis, Immune Evasion, and Technological Innovations in Oncolytic and Vaccine Development,“ *Viruses*, Jg. 16, Nr. 12, S. 1933, 2024. DOI: 10.3390/v16121933.
- [50] T. B. Krause und C. L. Cepko, „Abortive and productive infection of CNS cell types following in vivo delivery of VSV,“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 121, Nr. 35, e2406421121, 2024, Epub 2024 Aug 19. DOI: 10.1073/pnas.2406421121.
- [51] F. Costacurta, S. Rauch, D. von Laer und E. Heilmann, „Using Vesicular Stomatitis Virus as a Platform for Directed Protease Evolution,“ *Current Protocols*, Jg. 4, Nr. 12, e70074, 2024. DOI: 10.1002/cpz1.70074.
- [52] M. Combe und R. Sanjuán, „Variation in RNA Virus Mutation Rates across Host Cells,“ *PLOS Pathogens*, Jg. 10, Nr. 1, e1003855, 2014. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003855.
- [53] F. Kato u. a., „Characterization of large and small-plaque variants in the Zika virus clinical isolate ZIKV/Hu/S36/Chiba/2016,“ *Scientific Reports*, Jg. 7, Nr. 1, S. 16160, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-16475-2.
- [54] S. M. Connaughton, J. X. Wheeler, E. Vitková, P. Minor und S. Schepelmann, „In vitro and in vivo growth alter the population dynamic and properties of a Jeryl Lynn mumps vaccine,“ *Vaccine*, Jg. 33, Nr. 36, S. 4586–4593, 2015, Epub 2015 Jul 15. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.06.109.
- [55] S. Galloway und G. Wertz, „A temperature sensitive VSV identifies L protein residues that affect transcription but not replication,“ *Virology*, Jg. 388, Nr. 2, S. 286–293, 2009. DOI: 10.1016/j.virol.2009.03.015.
- [56] W. Yang u. a., „Establishment and application of a surrogate model for human Ebola virus disease in BSL-2 laboratory,“ *Virologica Sinica*, Jg. 39, Nr. 3, S. 434–446, Juni 2024. DOI: 10.1016/j.virs.2024.03.010.

Anhang

Anhangsverzeichnis

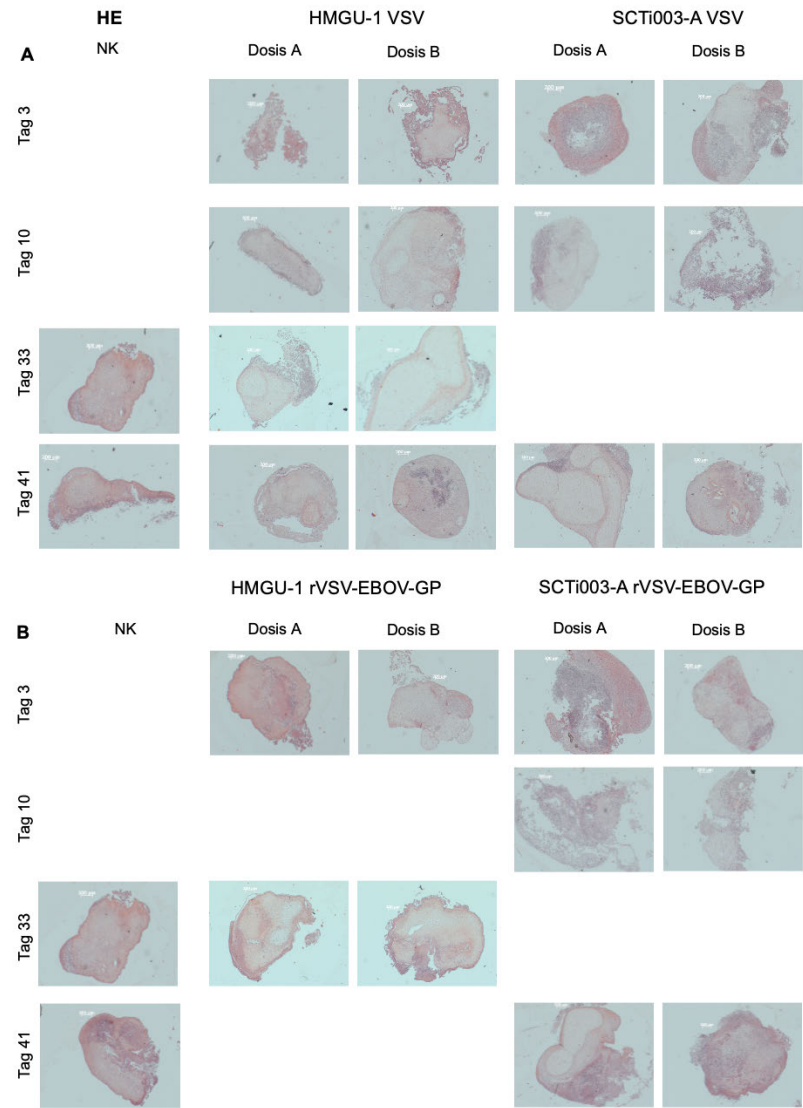


Abbildung 24: HE Färbungen von zerebralen Organoiden der Linie HMGU-1 und SCTi003-A
nach 3, 10, 33 und 41 Tagen nach der Infektion mit VSV und rVSV-EBOV-GP. × 25 Vergrößerung

Tabelle 15: Mutationen der Virusvorratslösung VSV und rVSV-EBOV-GP AO = *Reads* mit Mutationen (engl. *Alternate Observations*), DP = Gesamtzahl an *Reads* an unterschiedlichen Positionen (engl. *Depth*)

Vorratslösung	Referenz	AS Pos.	Gen	Konsequenz	AO	DP	Mutationsfreq (%)
VSV	OR712768	2783	M	Stille	10174	10190	99,84
		9319	L	Stille	7113	7155	99,41
rVSV-EBOV-GP	OR712768	103	N	Missense	548	551	99,46
		294	N	Stille	3726	3733	99,81
		354	N	Stille	4415	4446	99,30
		408	N	Stille	4408	4415	99,84
		527	N	Missense	4338	4351	99,70
		834	N	Stille	14183	14216	99,77
		1089	N	Stille	14603	14638	99,76
		1121	N	Missense	14486	14520	99,77
		1258	N	Stille	13797	13853	99,60
		1446	P	Stille	5247	5529	94,90
		1524	P	Stille	3928	3937	99,77
		1544	P	Missense	4032	4035	99,93
		1622	P	Missense	4436	4447	99,75
		1632	P	Stille	4502	4551	98,92
		1692	P	Missense	4803	4822	99,61
		1707	P	Stille	4927	4930	99,94
		1740	P	Stille	5074	5084	99,80
		1772	P	Missense	5172	5180	99,85
		1814	P	Missense	5267	5282	99,72
		1833	P	Stille	5341	5355	99,74
		1846	P	Missense	5303	5312	99,83
		1896	P	Moderate	4271	4325	98,75
		1974	P	Stille	4347	4368	99,52
		2085	P	Stille	4025	4030	99,88
		2104	P	Missense	3890	3895	99,87
		2142	P	Stille	3809	3816	99,82
		2148	P	Stille	3709	3728	99,49
		2221	M	Modifier	3984	3994	99,75
		2344	M	Missense	5170	5174	99,92
		2408	M	Moderate	6563	6607	99,33
		2418	M	Missense	7315	7322	99,90
		2567	M	Stille	5783	5790	99,88
		2654	M	Stille	3902	3919	99,57
		2678	M	Niedrige?	3770	3793	99,39
		2760	M	Missense	3884	3892	99,79
		2783	M	Stille	3807	3812	99,87
		2906	M	Stille	2601	2611	99,62
		2918	M	Moderate	2146	2167	99,03
		2949	M	Modifier	1985	1994	99,55
		2954	M	Modifier	1945	1954	99,54
		2988	M	Modifier	1355	1359	99,71
		3003	M	Modifier	1057	1068	98,97
		3068	G	Modifier	23	24	95,83
		4685	G	Modifier	691	693	99,71

Vorratslösung	Referenz	AS Pos.	Gen	Konsequenz	AO	DP	Mutationsfreq (%)
rVSV-EBOV-GP	OR712768	4696	G	Modifier	830	842	98,57
		4852	L	Niedrige	3726	3733	99,81
		4891	L	Stille	4017	4034	99,58
		4915	L	Stille	4187	4199	99,71
		4936	L	Stille	4311	4316	99,88
		4969	L	Stille	4129	4140	99,73
		4991	L	Missense	4104	4108	99,90
		5336	L	Missense	4808	4818	99,79
		5414	L	Stille	3600	3605	99,86
		5831	L	Missense	2402	2411	99,63
		6460	L	Stille	1518	1523	99,67
		7330	L	Stille	1826	1840	99,24
		8542	L	Stille	1719	1726	99,59
		9661	L	Stille	3569	3574	99,86
		10508	L	Missense	5553	5577	99,57
		10956	L	Missense	947	948	99,89
		11038	L	Stille	541	543	99,63
	EVU28077	138	GP	Intergenic	51	51	100,00
		282	GP	Missense	4751	4763	99,75
		1020	GP	Rahmen Verschiebung	5233	5888	88,88
		1771	GP	Nonsense	5400	5424	99,56
		2172	GP	Intergenic	17	18	94,44

Erklärung zur selbständigen Bearbeitung

Hiermit versichere ich, Amena Sarwar, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Thema:

Infektionsmodell des Ebola Virus Glykoprotein-exprimierenden rekombinanten Vesikulären Stomatitis-Virus (rVSV-EBOV-GP) in humanen zerebralen Organoiden: Generierung eines BSL-2 *in vitro* Systems zur Investigation der EBOV Persistenz im Gehirn

ohne fremde Hilfe selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ort

Datum

Amena Sarwar