



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT
FÜR TROPENMEDIZIN



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg, Fakultät Life Science

Optimierung eines Infektionsmodells für Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel

Bachelorarbeit

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Maibritt Kretschmer

2164659

Hamburg, 21. März 2017

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

2. Gutachter: Dr. Schreiber, Michael

HAW Hamburg

BNITM

*Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen,
sondern mit den Augen die Tür zu finden.*

- Werner von Siemens

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Pseudotypisierte Viruspartikel	9
1.2	Humanes Immundefizienz-Virus-Typ-1	12
1.2.1	Pseudotypisierte HIV-1-Partikel	12
1.3	Denguevirus	13
1.3.1	Virale Hüllproteine M/E	14
1.3.2	Der Denguevirus Zelleintritt	16
1.4	Vorarbeiten	17
1.5	Ziel der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Geräte, Materialien und Chemikalien	18
2.1.1	Geräte und Materialien	18
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	19
2.1.3	Molekulargewichtsstandard	20
2.1.4	Plasmide	20
2.1.5	Zellen	20
2.2	Mikrobiologische Methoden	21
2.2.1	Medium und Agar-Platten	21
2.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.2.3	Herstellung chemokompetenter Bakterien	22
2.3	Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1	Plasmid Transformation in <i>E. coli</i>	22

2.3.2	Plasmid-Präparation	23
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.3.4	DNA-Sequenzierung	25
2.4	Zellbiologische Methoden	26
2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	26
2.4.2	Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen	26
2.4.3	Infektion eukaryotischer Zellen mit partikelhaltigen Überständen	27
2.4.4	Luciferase-Assay	28
2.4.5	Bestimmung der TCID ₅₀ (<i>tissue culture infectious dose</i>)	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung pseudotypisierten HIV-1-Partikel	30
3.1.1	Herstellung der DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikel in 6-well-Zellkulturplatten	33
3.1.2	Herstellung der HIV-1 pseudotypisierten Partikel in 6-well-Zellkulturplatten	35
3.1.3	Herstellung der pseudotypisierten Partikel mit den Hüllproteinen aller vier Dengue Serotypen	36
3.2	Infektion eukaryotischer Zellen mit pseudotypisierten Partikeln	38
3.2.1	Infektion eukaryotischer Zellen mit DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikeln	38

3.2.2	Infektion von U87-Zellen mit HIV-1 pseudotypisierten Partikeln	42
3.2.3	Bestimmung der TCID ₅₀ von DENV-2 und DENV-3 Pseudotypen in Zellkulturüberständen	43
3.2.4	Methoden zur Verbesserung des Infektionsmodells	45
3.2.5	Einfluss der Zelldichte auf das Infektionsmodell	49
4	Diskussion	51
4.1	Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel	51
4.2	Verbesserung des Infektionsmodells	54
4.3	Bedeutung des Infektionsmodells für Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel	55
5	Zusammenfassung	58
5.1	Summary	59
6	Literaturverzeichnis	60
II	Anhang	63

Verzeichnis der Abkürzungen

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIV	Bovines Immundefizienz-Virus
CDY-TDV	Denguevirus Impfstoff, Handelsname Denvaxia [®]
C-Protein	<i>capsid</i> Protein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DENV	Denguevirus
DENV-1	Denguevirus Serotyp-1
DENV-2	Denguevirus Serotyp-2
DENV-3	Denguevirus Serotyp-3
DENV-4	Denguevirus Serotyp-4
DHF	<i>dengue hemorrhagic fever</i> , Hämorrhagisches-Dengue-Fieber
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dengue-Schock-Syndrom
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
E-Protein	<i>envelope</i> Protein
ED3	<i>envelope</i> Proteindomäne 3
FCS	<i>fetale calf serum</i> , fötales Rinderserum
FIV	Felines Immundefizienz-Virus
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus-Typ-1
HIV-2	Humanes Immundefizienz-Virus-Typ-2
HSV	Herpes-simplex-Virus
JEV	Japanische Enzephalitis-Virus
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährmedium
LCM	Lymphozytäre Choriomeningitis
MLV	Murines Leukämie-Virus
M-Protein	<i>membrane</i> Protein
NKR	nicht kodierende Region

NT	Neutralisationstest
OD ₅₆₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 560 nm
ORF	<i>open reading frame</i> , Offener Leserahmen
prM-Protein	<i>precursor membrane</i> -Protein (Vorläufer des M-Proteins)
RLU	<i>relative light units</i> , relative Lichteinheiten
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
TBEV	<i>tick-borne encephalitis virus</i> , Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
TCD ₅₀	<i>tissue culture infectious dose</i>
VSV	Vesikular Stromatitis-Virus
VSV-G	Glykoprotein G des Vesikular Stromatitis-Virus
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Welt-Gesundheitsorganisation
WNV	Westnil-Virus
YFV	<i>yellow fever virus</i> , Gelbfiebertvirus
YT	<i>yeast trypton</i> , Nährmedium

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Schematische Darstellung der Herstellung eines Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikels.	11
Abb. 2	Denguevirus.	15
Abb. 3	Membranfusion der Dengueviren.	16
Abb. 4	Ausbeute DENV-2 pseudotypisierter Partikel.	40
Abb. 5	Ausbeute DENV-3 pseudotypisierter Partikel.	41

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	Beispiele pseudotypisierter HIV-1-Partikel.	10
Tab. 2:	DNA-Verhältnisse der Transfektionsexperimente (6- <i>well</i> -Platte).	31
Tab. 3:	DNA-Verhältnisse der Transfektionsexperimente (24- <i>well</i> -Platte).	32
Tab. 4:	Luciferase-Aktivitäten der DENV-2 transfizierten HEK293T-Zellen.	34
Tab. 5:	Luciferase-Aktivitäten der DENV-3 transfizierten HEK293T-Zellen.	34
Tab. 6:	Luciferase-Aktivitäten der HIV-1 transfizierten HEK293T-Zellen.	35
Tab. 7:	Luciferase-Aktivitäten der transfizierten HEK293T-Zellen in 24- <i>well</i> Zellkulturplatten.	37
Tab. 8:	Luciferase-Aktivitäten der infizierten VeroB4-Zellen – Infektion mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln.	40
Tab. 9:	Luciferase-Aktivitäten der infizierten VeroB4-Zellen – Infektion mit DENV-3 pseudotypisierten Partikeln.	41
Tab. 10:	Luciferase-Aktivitäten infizierter U87-Zellen – Infektion mit HIV-1 pseudotypisierten Partikeln.	43
Tab. 11:	Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – TCID ₅₀ -Reihen von DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikeln.	44
Tab. 12:	Luciferase-Aktivitäten infizierter U87-Zellen – Infektionen und TCID ₅₀ -Reihen mit HIV-1 pseudotypisierten Partikeln.	46
Tab. 13:	Luciferase-Aktivitäten infizierter U87-Zellen – Infektionen und TCID ₅₀ -Reihen mit HIV-1 pseudotypisierten Partikeln.	47
Tab. 14:	Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – Infektionen mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln in Abhängigkeit von FCS.	48
Tab. 15:	Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – Infektionen mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln bei verschiedenen Zelldichten.	50

1 Einleitung

1.1 Pseudotypisierte Viruspartikel

Pseudotypisierung bezeichnet den Austausch der Hüllproteine eines Virus mit den Hüllproteinen eines anderen Virus. Die Information für die Hüllproteine ist im Genom des Partikel bildenden Virus deletiert.^{1,2,3} Durch die Transfektion des deletierten Genoms entstehen Viruspartikel ohne Hülle. Bei einer Co-Transfektion zusammen mit den Hüllproteinen eines anderen Virus können umhüllte pseudotypisierte Partikel hergestellt werden (siehe Abb. 1).

Pseudotypisierte Partikel spielen bei der Analyse von Viren eine wichtige Rolle und werden in diversen experimentellen und klinischen Anwendungsgebieten eingesetzt.^{1,4,5} Mit Hilfe lentiviraler Vektoren können verschiedenste pseudotypisierte Partikel erstellt werden, mit denen z.B. der Zelleintritt, veränderter Tropismus, die Funktion von Rezeptoren oder Proteinen sowie die Wirkung von Medikamenten in Bezug auf die unterschiedlichen Hüllproteine untersucht werden können.^{1,3}

Pseudotypisierte Viruspartikel besitzen dadurch, dass Hüllproteine substituiert werden, ein deletiertes Genom (env^-). Mit den pseudotypisierten Partikeln (env^+) können entsprechende eukaryotische Zellen infiziert werden. Die Viruspartikel können in die Zellen eindringen, aber keine neuen infektiösen Partikel bilden. Diese Art der Infektion wird auch als *single round infection* bezeichnet.^{1,8} In den Vektorplasmiden ist das Hüllprotein durch Reportergene, wie z.B. Luciferase oder GFP (grün fluoreszierendes Protein), ersetzt, wodurch die Infektion der Pseudotypen gemessen werden kann.^{2,3,8}

In der Gruppe der Lentiviren, die zu der Familie der Retroviren gehören, eignen sich verschiedene Virusarten, besonders das Humane-Immundefizienz-Virus-Typ-1 (HIV-1), als Vektor für pseudotypisierte Partikel (weitere sind HIV-2, SIV, FIV oder BIV).³ Besonders HIV-1 (env^+) wird als Vektor in Kombinationen mit unterschiedlichen Hüllproteinen aus diversen Virusklassen verwendet (siehe Beispiele Tabelle 1).^{1,2,3,4,5,6,9} Pseudotypen, die Glycoproteine von Lyssaviren, LCM-Viren, Alphaviren, Filoviren oder Retroviren tragen, sind in der Literatur beschrieben.³ Allerdings wurde über pseudotypisierte HIV-1 Partikel mit Hüllproteinen von Dengueviren, die der Baltimore-Gruppe IV der ss(+)RNA Viren angehören, erst eine wissenschaftliche Arbeit veröffentlicht.

Die pseudotypisierten Partikel werden mittels Transfektion von Zellen mit Vektoren hergestellt. Die Transfektion ist eine wirksame Methode um genetisches Material, wie Plasmid-DNA oder RNA, in eukaryotische Zellen einzubringen. Für die Partikelbildung werden die eingebrachten Plasmide in den Zellen exprimiert, aber nicht ins Genom integriert (*transient transfection*). Zur Steigerung der Transfektionseffizienz werden kationische Lipide verwendet. Mit Hilfe einer Co-Transfektion können zwei Plasmide gleichzeitig in die eukaryotischen Zellen gebracht werden, um sowohl den Virus-Vektor, als auch die Hüllproteine zu exprimieren.^{7,10,11} Im verwendeten lentiviralen Vektorsystem werden für die Bildung Dengue M/E-pseudotypisierter HIV-1-Partikel ein HIV-1-Vektorplasmid und ein DENV-Hüllproteinplasmid verwendet.

Tab. 1: Beispiele pseudotypisierter HIV-1-Partikel.

Baltimore * Gruppe, Genom	Familie	Gattung	Art / Hüllproteine	pseudotypisierter Partikel
IV, ss(+)	Togaviridae	Alphavirus	Ross-River-Virus Semliki-Forest-Virus	HIV-1(RRV) HIV-1(SFV)
V, ss(-) RNA nicht segmentiert	Rhabdoviridae	Vesiculovirus Lyssavirus	VSV-G Rabiesvirus	HIV-1(VSV-G) HIV-1(Rabies)
	Filoviridae	Ebolavirus	EboZ	HIV-1(EboZ)
V, ss(-) RNA segmentiert	Bunyaviridae	Hantavirus	Hantavirus	HIV-1(HTNV)
	Arenaviridae	Arena-Virus	LCM-Virus	HIV-1(LCMV-Arm53b)
VI, ss(+)	Retroviridae	Lentivirus	HIV-1	HIV-1(HIV-1)
		Gammaretrovirus	Murine Leukämievirus	HIV-1(MuLV)

* Aufgezeigt sind die in der Literatur häufig aufgeführten Hüllproteine pseudotypisierter HIV-1-Partikel. Die Virusarten der Hüllproteine sind nach Baltimore-Gruppen geordnet und in Genom, Familie und Gattung gegliedert.

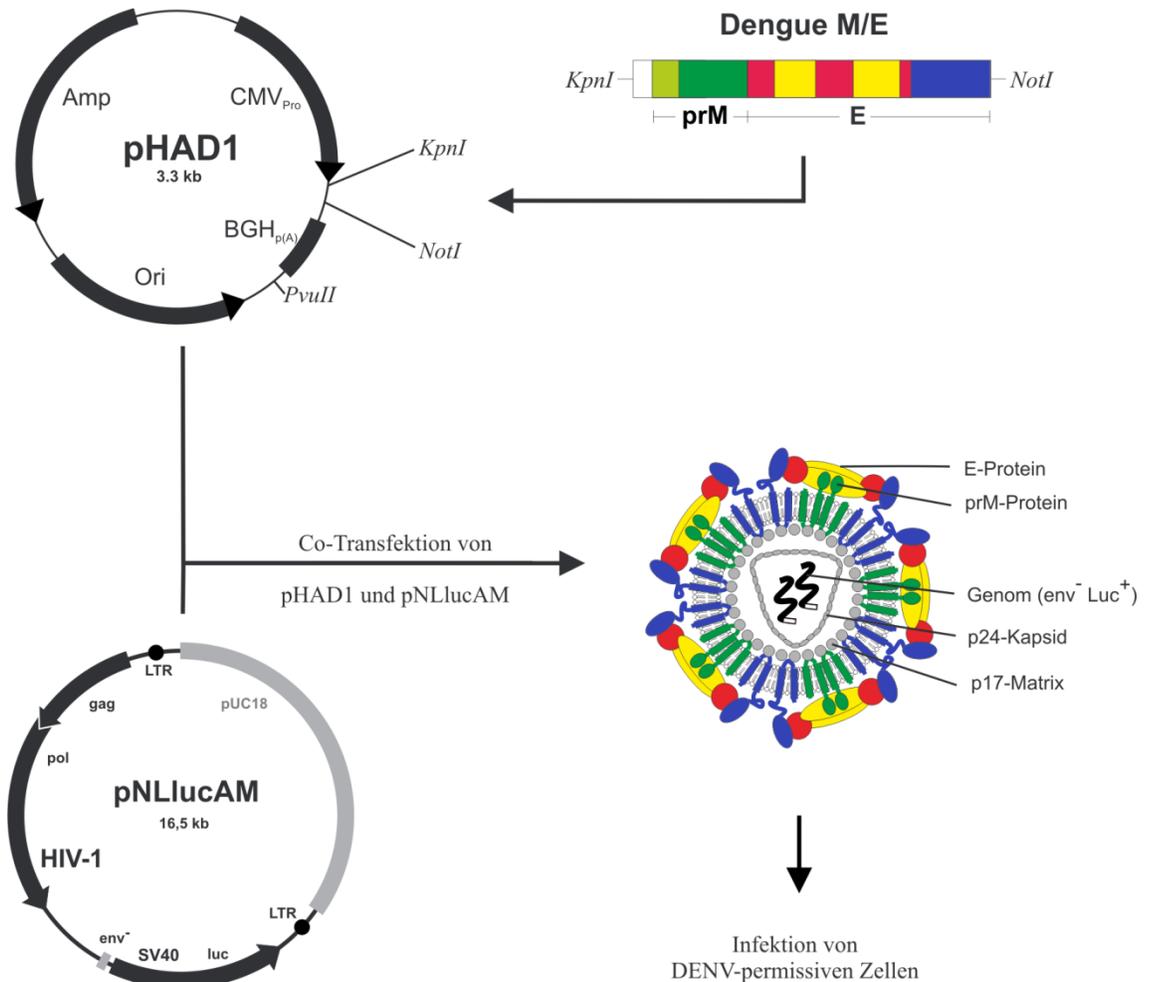


Abb. 1 Schematische Darstellung der Herstellung eines Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikels.¹⁴

Exemplarisch dargestellt ist die Herstellung eines DENV-1-M/E pseudotypisierten Partikels mittels Co-Transfektion des Vektorplasmids (pNLlucAM) und des Hüllproteinplasmids (pHAD1). Bei dem HIV-1 basierten Viruspartikel wurden die äußeren HIV-1-Hüllproteine durch die Hüllproteine des DENV (Dengue M/E) ausgetauscht. Das HIV-1-Genom enthält statt der Information der HIV-1-Hüllproteine ein Reportergen (*luc*), welches das Enzym Luciferase unter der Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert.

1.2 Humanes Immundefizienz-Virus-Typ-1

Das Humane Immundefizienz-Virus-Typ-1 (HIV-1) zählt zu der Gattung der Lentiviren und gehört der Familie der Retroviridae an. Das Virusgenom setzt sich aus einer einzelsträngigen +Strang-RNA zusammen, die in zwei identischen Kopien vorliegt. Neben den für Retroviren üblichen Antigenen *gag* (Group specific Antigen), *pol* (Polymerase) und *env* (Envelope) verfügt das HIV-1-Genom zusätzlich über sechs weitere Gene: *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*.^{12,13} Besonders *nef* (Negative Factor) sowie *vpr* (Viral Protein R) spielen bei dem Retrovirusvektor für die Bildung der pseudotypisierten Partikel eine wichtige Rolle. Untersuchungen haben ergeben, dass Vektoren, die *vpr*⁺ und *nef*⁺ sind, die optimalen Virusvektoren darstellen.¹⁴ Die virale RNA wird von einem kegelförmigen Kapsid eingeschlossen, was aus dem Protein p24 gebildet wird. In der Membran des HIV-1 sind sog. *spikes* eingebettet. Die *spikes* bilden sich aus den trimeren Transmembranproteinen gp41 und gp120. Die Transmembranproteine gp41 und gp120 entstehen durch die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins gp160 (*env*).^{12,13}

1.2.1 Pseudotypisierte HIV-1-Partikel

Die Fähigkeit des HIV-1, pseudotypisierte Virionen zu bilden, zeigte sich bei Zellen, in denen das Wildtyp-HIV-1 vermehrt wurde und die zusätzlich mit weiteren Viren infiziert waren. Aus mehreren Studien geht hervor, dass mit MLV, amphotropen MLV oder HSV infizierte HIV-1 Wildtyp-Zellen phänotypisch gemischte Virionen bilden.¹⁵ Durch das Einlagern der Hüllproteine (*phenotype mixing*) in die Virusmembran wird den HIV-1-Partikeln der Phänotyp und somit auch der Tropismus der fremden Hüllproteine verliehen.^{15,16}

Zu den ersten und immer noch am häufigsten verwendeten Hüllproteinen lentiviraler Pseudotypen gehört das Vesicular stomatitis Virus Hüllprotein (VSV-G).^{15,16,17,18,19,20} Die VSV-G pseudotypisierten Partikel weisen eine große Stabilität auf. Zusätzlich treten Wechselwirkungen zwischen dem Hüllprotein VSV-G und einem ubiquitären Zellrezeptor auf, wodurch ein umfassender Tropismus hervorgerufen wird. Das Hüllprotein VSV-G gilt durch dessen häufige und erfolgreiche Verwendung als Standard für die Effizienz der Pseudotypen-Bildung.^{15,16,17}

Mit Hilfe pseudotypisierter HIV-1 Partikel lässt sich eine Transfektion sowohl in sich teilenden, als auch in ruhenden Zellen durchführen. Demnach wächst die Zahl weiterer Glykoproteine für pseudotypisierte HIV-1 Vektoren stetig.^{15,16}

1.3 Denguevirus

Flaviviren gehören der Familie der *Flaviviridae* an. Diese Virusfamilie umfasst neben den Flaviviren noch die drei Genera Hepaciviren, Pegiviren und Pestiviren.^{15,16,17,18}

Die Viren der *Flaviviridae* sind lediglich entfernt verwandt, weisen jedoch Übereinstimmungen bezüglich der Genomorganisation, der nicht-strukturellen Proteinstreife, sowie der Morphologie und Replikationsstrategie auf. Das Genom aller Flaviviren besteht aus einem (+)-RNA-Einzelstrang. Die größten Unterschiede zeigen sich hinsichtlich der biologischen Eigenschaften, wie die Vektor-Abhängigkeit oder der Wirtsbereich.^{15,16,17,18,19}

Die Gattung der Flaviviren umfasst mehr als 70 verschiedene Virustypen. Zu den wichtigsten human- und tierpathogenen Flaviviren gehören das namensgebende Gelbfiebervirus (*yellow fever virus*, YFV), das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV), das Westnil-Virus (WNV), das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (*tick-borne encephalitis virus*, TBEV) und das Denguevirus (DENV).^{15,16,17,19}

Durch Übertragung der Viren mittels Arthropoden (Mücken, Zecken) werden diese auch als Arboviren bezeichnet.^{16,17,19}

Dengueviren besitzen als natürlichen Wirt den nichtmenschlichen Primaten und werden durch die Moskitos der *Aedes*-Gattung verbreitet. Vor allem die Arten *A.aegypti* und *A.albopictus* gelten als häufigster Überträger.^{16,18,19,20,21} Dengueviren lassen sich in vier Serotypen (DENV-1 bis DENV-4) unterscheiden. Durch die Verschleppung der *Aedes*-Insekten infolge des zunehmenden Flug- und Reiseverkehrs, überlappen die ehemals komplett abgegrenzten Epidemie-Zonen. Dadurch haben sich die Verbreitungsgebiete der Serotypen des DENV weltumspannend auf den tropischen und subtropischen Gürtel ausgeweitet. Insofern ist das Denguevirus das bedeutendste und häufigste von Arthropoden übertragende Flavivirus.^{16,18,19,20,21}

Beim Menschen wird durch die Infektion mit DENV das sog. Denguefieber ausgelöst. Das Virus verursacht laut WHO jährlich 50 Millionen Infektionen weltweit, wodurch Fiebererkrankungen und Hämorrhagien hervorgerufen werden. Durch die dramatische Virusverbreitung leben über 2,5 Milliarden Menschen in DENV Risikogebieten.^{16,18} Eine Infektion mit DENV kann sowohl symptomatisch als auch asymptomatisch verlaufen. Bei einem asymptomatischen Krankheitsverlauf werden Antikörper gegen den jeweiligen Serotyp gebildet, obwohl der Patient keine Symptome zeigt. Aus einem symptomatischen Krankheitsverlauf mit grippeähnlichem Fieber können sich zusätzlich ein Hämorrhagisches Denguefieber (*dengue hemorrhagic fever*, DHF) und ein Dengue-Schock-Syndrom (DSS) entwickeln.^{16,18,19,20,21}

Bei einer weiteren Infektion mit einem anderen Serotyp erhöht sich das Risiko auf einen schweren Krankheitsverlauf aufgrund des „Immune-Enhancements“. Dengue-Infektionen werden symptomatisch behandelt, wobei hämorrhagische Verläufe intensivmedizinisch überwacht werden müssen. Eine antivirale Therapie gegen das Denguevirus wurde noch nicht entwickelt.^{20,21} Allerdings wurde im Jahr 2015 erstmals ein DENV-Impfstoff zugelassen. Das Vakzin Denvaxia[®] (CYD-TDV) des Unternehmens Sanofi Pasteur Ltd. wird für epidemische DENV-Gebiete von der WHO empfohlen, ist von dieser jedoch noch nicht präqualifiziert. Der Impfstoff konnte infolge durchgeführter Phase-III-Studien laut Sanofi eine Wirksamkeit von ca. 60% erzielen.^{22,25}

1.3.1 Virale Hüllproteine M/E

Die Dengueviren enthalten, wie alle Flaviviren, eine einzelne Kopie einer positiv-Strang-RNA. Das Genom codiert für einen einzigen offenen Leserahmen (Open Reading Frame, ORF; 10,7 kb) und ist eingerahmt von nicht kodierenden Regionen (NKR).^{15,16,18} Durch die Translation des Leserasters entsteht ein einziges Polyprotein, das in Struktur- und Nichtstrukturproteine proteolytisch gespalten wird.^{16,18} Die drei Strukturproteine bestehen aus dem sphärischen Kapsid (*capsid*, C), dem Membranprotein mit dessen Vorläufer (*membrane*, M bzw. *pre membrane*, prM) sowie dem Hüllprotein (*envelope*, E). Das DENV-Kapsid ist umgeben von einer Hüllmembran, in der das Membranprotein und das Hüllprotein integriert sind. Die beiden Proteine liegen als Homodimere vor. Sie sind jeweils durch einen Membrananker in die Hüllmembran eingelagert. Bei nicht ausgereiften Dengueviren formen prM-E-Trimere 60 sog. *spikes* auf der Virusoberfläche. Mittels einer proteolytischen Spaltung vom Vorläufer-Teil („pr“) des Membranproteins erfolgt die Modifizierung zu reifen infektiösen Viren. Es bildet sich eine glatte Oberfläche, die aus 90 E-Homodimeren besteht, welche in sog. *rafts* aus drei parallelen Dimeren angeordnet sind. Dadurch wird die richtige Oberflächenbeschaffenheit für den Zelleintritt gewährleistet.^{15,16,17,18} Die vier Serotypen des DENV unterscheiden sich in ihrer Antigenstruktur. Die verschiedenen Subtypen haben eine 60-80%ige Übereinstimmung in ihrem Genom. Die größten Differenzen liegen besonders in den Domänen des Oberflächenproteins E.²⁰

A Genomstruktur des Dengue-Virus¹⁸



B Schematische Darstellung des Denguevirus

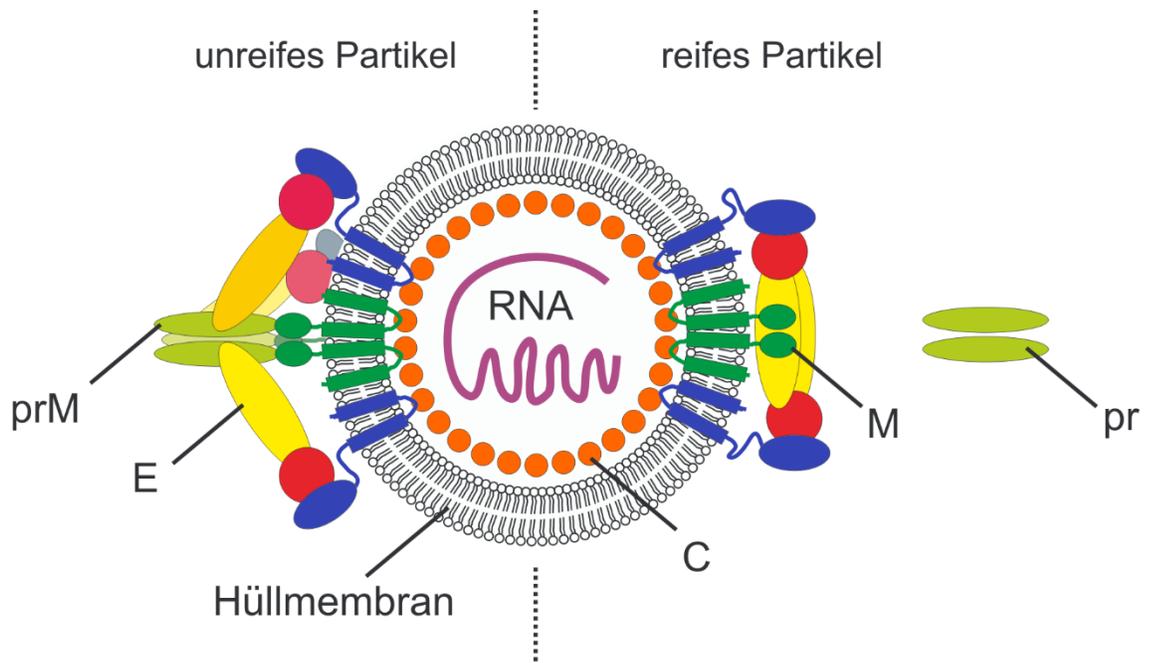


Abb. 2 Denguevirus.

(A) Das einzelsträngige RNA-Genom besteht aus einem einzigen offenen Leserahmen und wird von zwei nicht kodierenden Regionen (NKR) flankiert. Der ORF kodiert ein Polyprotein, das in drei Strukturproteine und fünf Nichtstrukturproteine gegliedert wird: C (*capsid*), prM (*precursor membran*), E (*envelope*) und NS1-5.

(B) Das Denguevirus formiert sich aus einem Nukleokapsid (C), welches die (+)Strang-RNA enthält. Umgeben wird das Kapsid von einer Hüllmembran, in der die Hüllproteine prM und E verankert sind. Während der Reifung der Viruspartikel in den Endosomen erfolgt, aufgrund einer proteolytischen Spaltung des prM, eine Konformationsänderung der Heterodimere prM und E.

1.3.2 Der Denguevirus Zelleintritt

Das E-Protein spielt beim Zelleintritt eine zentrale Rolle. Es induziert sowohl die Rezeptorbindung als auch die pH-abhängige Fusion mit der Membran. Zusätzlich wird auf dem E Glycoprotein (ED3) eine Rezeptorbindungsdomäne vermutet. Der Prozess des Zelleintritts beruht auf einer rezeptor-vermittelten Endozytose.^{15,17,18} Eingeleitet wird der Zelleintritt durch die Protonierung bestimmter Aminosäuren. Durch die Verschiebung des pH-Wertes in ein saures Milieu, wird eine Konformationsänderung der Virusoberfläche bewirkt. Infolge der pH-Veränderung dissoziieren die E-Homodimere. Die Fusionspeptide an den Spitzen dieser Monodimere können somit in die Zell-Endosomenmembran eingebracht werden. Aufgrund der Konformationsänderung wird das E-Protein mit dem Fusionspeptid relokalisiert, sodass sich eine Haarnadelschleife ausbildet und sich das Peptid sowie der Membrananker nebeneinander befinden. Es entsteht eine trimere Konformation des E-Proteins, wodurch die Zell- und die Virusmembran zusammengezogen werden und eine Fusionspore ausprägt wird. Das virale Nukleokapsid wird in das Zytoplasma freigesetzt. Dadurch kann das virale Genom translatiert und repliziert werden.^{15,16,17,18} Der Vorgang des Zelleintritts verläuft bei allen vier Serotypen konform, wobei durch die unterschiedlichen Antigenstrukturen vom Serotyp abhängige Rezeptoren gebunden werden.²⁰

Infolge des *phenotype mixing* werden auf die Dengue-M/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikel die Eigenschaften des Denguevirus Zelleintritts übertragen. Die Infektion eukaryotischer Zellen mit den Dengue-M/E-pseudotypisierten HIV-Partikeln erfolgt demnach durch eine DENV Rezeptor-vermittelte Endozytose, unabhängig vom HIV-1-Zelleintritt.

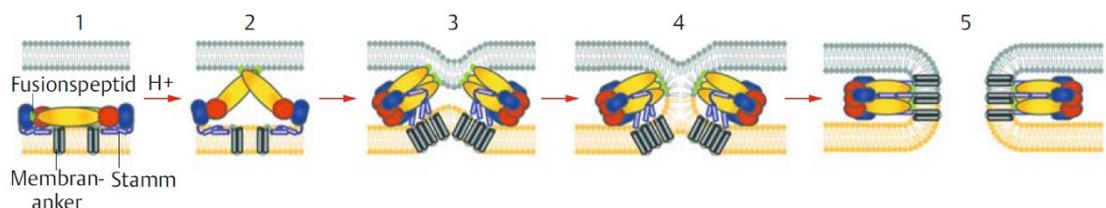


Abb. 3 Membranfusion der Dengueviren.

(1) Die E-Homodimere sind auf der Virusoberfläche in Form von Rafts angeordnet. (2) Die pH-Verschiebung in ein saures Milieu bewirkt eine Dissoziation der Dimere. Durch eine daraus folgende Konformationsänderung kann das Fusionspeptid mit der Zell-Endosomenmembran Wechselwirkungen eingehen. (3)-(4) Aufgrund weiterer Konformationsänderungen und der Trimerisierung des E-Proteins werden Zell- und Virusmembran zusammengezogen. (5) Es entsteht eine Fusionspore, durch die das virale Nukleokapsid in das Zytoplasma freigesetzt werden kann.

1.4 Vorarbeiten

Die Forschung an Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln ist immer noch sehr begrenzt. Es wurde erst eine wissenschaftliche Arbeit zu diesem Thema veröffentlicht.²⁶ Mit dem in der Veröffentlichung dargestellten pNL4-3-Luc-RE⁻-Vektor lassen sich die Partikel jedoch nicht produzieren, sodass Verbesserungen vorgenommen werden mussten. Im Zuge einer Dissertation in der LG-Schreiber (BNITM) wurde mit dem Aufbau eines pseudotypisierten HIV-1-Vektorsystems mit den Hüllproteinen des Denguevirus begonnen. Die optimalen HIV-1-Vektoren wurden ermittelt (pNLlucAM). Außerdem wurden die Expressionsplasmide für die Dengue-Hüllproteine konstruiert (pHAD1-D4). Damit wurde erstmals erreicht, dass reproduzierbare Infektionen gemessen werden konnten. Durch eine Transfektion in 6-*well*-Zellkulturplatten konnten z. B. 20 Infektionsexperimente durchgeführt werden.

Während des Praxissemesters wurden die Vektorplasmide und Hüllproteinplasmide vervielfältigt sowie aufgereinigt. Des Weiteren wurden die ersten Transfektionsexperimente durchgeführt. Dabei wurden unter anderem das Protokoll und Transfektions-Reagenz der Firma Incella bei variierenden DNA-Mengen getestet. Auch die optimale Transfektionszeit wurde ermittelt.

1.5 Ziel der Arbeit

Erstes Ziel der Arbeit war die Steigerung der Partikelproduktion. Die Plasmid-Mengen, die für die Transfektion eingesetzt wurden, sollten gesteigert werden und die resultierenden Transfektionsergebnisse und Infektionsergebnisse mit Hilfe der Luciferase-Aktivitäten verglichen werden. Ziel war es, eine größere Ausbeute an pseudotypisierten Partikeln zu erreichen, um mehr Infektionsexperimente mit einer Transfektion durchführen zu können.

Zweites Ziel der Arbeit war die Quantifizierung der Transfektions-Ausbeuten. Durch die TCID₅₀ Bestimmung sollte die infektiöse Dosis ermittelt werden.

Drittes Ziel der Arbeit war die Reproduzierbarkeit des Infektionsmodells. Die Infektionen eukaryotischer Zellen mit den pseudotypisierten Partikeln sollten auf ein 96-*well*-Format übertragen werden, um gleichmäßige Infektionen erreichen und wiedergeben zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

2.1.1 Geräte und Materialien

Gerät/Material	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN	Biorad
Inkubator	Heraeus BBD 220	Thermo Electron Corporation
Küvetten	Mikroküvetten	Shimadzu Corporation
Mikroplatten Luminometer	Centro LB 960	Berthold Technologies
Mikroskop	Diavert	Leitz
Schüttelinkubator	3031	GFL
Sterilwerkbank	Sterilgard III Avance	The Baker Company
Thermocycler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
UV/Vis-Spektrometer	UV-160A	Shimadzu Corporation
Vortexer	D-6012	NeoLab
	VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Zentrifugen	Centrifuge 5810R	Eppendorf
	Avanti J-26	Beckmann Coulter
	Optima XE-90	Beckmann Coulter
	Ultracentrifuge	
	Biofuge pico	Heraeus

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Agar	Difco
Agarose	Biozym
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Caesiumchlorid	Sigma-Aldrich
DMEM	Gibco
DTT	Merck
EDTA	Carl Roth
Eisessig	Merck
Essigsäure	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fötales Rinderserum (FCS)	PanBiotech
Glukose	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Hefeextrakt	Difco
Kaliumacetat	Carl Roth
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	Gibco
RPMI	Gibco
Salzsäure	Carl Roth
SDS	Carl Roth
Tris	Carl Roth
Triton X-100	Merck
Trypton	Carl Roth

2.1.3 Molekulargewichtsstandard

Generuler 1 kb DNA Ladder

Thermo Scientific

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pNLlucAM	Plasmid mit HIV-1 deletiertem Genom (<i>env</i> ⁻ , <i>Luc</i> ⁺)
pgp160	Expressionsvektor für NL43-gp160
pcBD1	Expressionsvektor für DENV-1-M/E
pHAD2	Expressionsvektor für DENV-2-M/E
pHAD3	Expressionsvektor für DENV-3-M/E
pHAD4	Expressionsvektor für DENV-4-M/E

Die verwendeten Plasmide wurden im Vorfeld in der Laborgruppe Schreiber hergestellt.

2.1.5 Zellen

Zellen	Organismus	ATCC	Herkunft
HEK293T	<i>Homo Sapiens</i>	CRL-11268	Friedrich-Löffler-Institut, Riems-Greifswald
U87 CXCR4	<i>Homo Sapiens</i>	-	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
VeroB4	<i>Cercopithecus aethiops</i>	CCL-81	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Medium und Agar-Platten

LB Medium: 10 g Trypton
 10 g NaCl
 5 g Hefeextrakt

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

YT Medium: 8 g Trypton
 5 g NaCl
 5 g Hefeextrakt

LB Agarplatten: 10 g Trypton
 10 g NaCl
 5 g Hefeextrakt
 16 g Agar

YT Agarplatten 8 g Trypton
 5 g Hefeextrakt
 5 g NaCl
 16 g Agar

Für das Ansetzen der Medien und des Agars wurden die aufgelisteten Komponenten eingewogen und mit 1000 ml doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt. Bei 121°C und 1,5 bar wurden die Lösungen autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika Lösungen erfolgte nach dem Abkühlen auf <55°C, da diese Zusätze hitzeempfindlich sind.

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

2.2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Vermehrung von Bakterien (*E. coli* Stamm DH5 α) in einer Flüssigkultur erfolgte durch das Animpfen mit einer Einzelkolonie. Im Schüttelinkubator wurden die Flüssigkulturen über Nacht kultiviert (37°C, 180 rpm, Schüttelinkubator GFL, 3031).

Für Vermehrung von Bakterien auf YT-Agar wurden Bakterien-Flüssigkulturen ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.3 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Die Herstellung chemokompetenter Zellen geschah mittels der Calciumchlorid-Methode. DH5 α -Zellen wurden auf LB-Agar ohne Antibiotikazusätze ausgestrichen. Drei ml YT-Medium wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Rotor kultiviert. Mit 1 ml der Vorkultur wurden 100 ml YT-Medium inokuliert. Im Schüttelinkubator wurden die Bakterien inkubiert, bis eine optische Dichte von OD₅₆₀ = 0,4 erreicht wurde. Bei 4°C und 5000 rpm wurden die Bakterien für 15 min abzentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5810R; Rotor FA-45-6-30). Die Bakterien wurden in 40 ml sterilfiltriertem 50 mM CaCl₂ resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4°C, 5000 rpm, 15 min; Eppendorf, Centrifuge 5810R, Rotor FA-45-6-30). Die Bakterien wurden in 2 ml 50 mM CaCl₂ suspendiert und über Nacht auf Eis gestellt. Die Suspension wurde mit 2 ml 50 %igem Glycerin versetzt und in 200 μ l Portionen aufgeteilt. Nach dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei -70°C gelagert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmid Transformation in *E. coli*

Chemokompetente DH5 α -Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 μ l Plasmid versetzt (100 ng Plasmid/100 ml Zellen). Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock im Heizblock bei 42°C für 3 min. Die abgekühlten Bakterien wurden mit 800 μ l YT-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C und 800 rpm inkubiert. Je 200 μ l der Bakterienkultur wurden auf eine YT-Amp-Platte ausplattiert. Der Rest der Bakterienkultur wurde für 5 min bei 8000 rpm zentrifugiert, in 200 μ l YT-Medium resuspendiert und ebenfalls ausgestrichen. Über Nacht inkubierten die Platten bei 37°C.

2.3.2 Plasmid-Präparation

Plasmide wurden mit Hilfe der CsCl-Methode im Zuge einer Plasmid Maxipräparation isoliert und aufgereinigt. Je 200 ml einer Bakterienkultur wurden in der Beckmann Zentrifuge (Beckmann Coulter, Avanti J-26; Rotor JA-14) auf 10.000 rpm beschleunigt. Die Zellen wurden in 5 ml der Lösung 1 resuspendiert, in 50 ml Falcon Tubes überführt und in 10 ml der Lösung 2 lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation wurden 7,5 ml der Lösung 3 zur Neutralisation hinzugegeben. Die Suspension wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 8000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5810R; Rotor FA-45-6-30). Der Überstand wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und für 20 min inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm und 18°C für 20 min (Eppendorf, Centrifuge 5810R; Rotor FA-45-6-30) der nach dem Waschen des Sediments mit 10 ml 70%igem Ethanol wiederholt wurde. Die DNA wurde anschließend in 4 ml TE Puffer gelöst und 150 µl EtBr (10 mg/ml) sowie 4,9 g CsCl hinzugegeben. Die Lösung wurde bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5810R; Rotor FA-45-6-30). Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde die DNA-Lösung in 5 ml Quick Seal Tubes gegeben. Mit Hilfe von 0,9 mm x 40 mm Kanülen sowie 5ml Spritzen ohne Kolben ließen sich die Röhrenchen befüllen, exakt austarieren und zuschmelzen. Vor dem Beladen wurde die Dichte durch Drücken der Röhrenchen überprüft. Über Nacht wurden die Tubes bei 70000 rpm und 25°C zentrifugiert (Beckman Coulter, Optima XE-90 Ultracentrifuge; Rotor NVT90). Mittels einer Kanüle und einer Spritze wurde die untere Plasmid-DNA Bande aus dem Röhrenchen gezogen. Um einen Unterdruck zu verhindern, wurde mit einer kleinen Kanüle ein Luftloch in den oberen Teil des Quick Seal Tubes gestochen. Zum Schutz vor Verletzungen und dem Durchstechen wurde eine abgeschnittene Pipettenspitze auf die 0,9 mm x 40 mm Kanüle gesteckt, sodass nur ca. 0,8 cm der Kanüle freilagen. Mit der Kanüle wurde an dem unteren Rand der Bande in das Röhrenchen gestochen und die Plasmid-DNA durch Aufziehen der 2 ml Spritze extrahiert. Die Plasmid-DNA wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Durch dreimaliges behandeln der wässrigen Phase mittels Zugabe von 1 Vol. n-Butanol, wurde das EtBr extrahiert. Die Lösung wurde mit 0,7 Vol. NaAc und 2 Vol. 97 %igem EtOH versetzt und für 20 min bei 10000 rpm zentrifugiert (Heraeus, Biofuge pico). Die Plasmide wurden zweimal mit 70 %igem EtOH gewaschen und anschließend in 500 µl TE Puffer gelöst.

Lösung 1:	50 mM Glukose	
	10 mM EDTA	
	25 mM Tris-HCl	pH 8,0
Lösung 2:	0,2 M NaOH	
	1 % SDS	
Lösung 3:	3 M Kaliumacetat	
	2 M Essigsäure	
TE-Puffer:	10 mM Tris	
	1 M EDTA	pH 8,0

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmide und DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Für die Gele wurde eine 0,9 %ige Agarosekonzentration benötigt. Zum Lösen wurde die Agarose in TBE-Puffer aufgekocht. In ein vorbereitetes Gelbett (7 cm x 7 cm) wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) pipettiert und die Gelflüssigkeit nach dem Abkühlen auf ca. 56°C in das Bett gegossen. Der Kamm mit der benötigten Taschenanzahl wurde eingesetzt. Das ausgehärtete Agarosegel wurde mit dem Gelbett in eine Elektrophoresekammer gesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Der Kamm wurde entfernt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 6-fach Ladebuffer und 3 Vol. ddH₂O versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Bei einer Spannung von 100 V wurden die DNA-Proben für 1h aufgetrennt. Die Banden wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Kontrolle der Proben dienten probenspezifische Marker. Zum Bestimmen der Molekulargewichte lief ein 1 kb Molekulargewichtsmarker im Gel mit.

TBE-Puffer:	90 mM Tris
	90 mM Borsäure
	2,5 mM EDTA

DNA Ladepuffer: 50 % Glycerin
 0,25 % Bromphenolblau
 in 1 Vol. TAE-Puffer

TAE-Puffer: 40 mM Tris
 2 mM EDTA
 20 mM Eisessig

2.3.4 DNA-Sequenzierung

Die isolierte Plasmid-DNA der Denguefieber Serotypen (pHAD1, pHAD2, pHAD3, pHAD4) wurden von der Firma LGC Genomics sequenziert.

Die Proben wiesen alle eine Konzentration von 1 µg/µl auf. Für die Sequenzierung wurde ein Probenvolumen von je 3 µl Plasmid und 10 µl ddH₂O benötigt. Die Primer wurden im Voraus ausgewählt und von LGC Genomics hinzugefügt. Es wurde jeweils ein Lauf in Vorwärtsrichtung (forward, F) und ein 2. Lauf in entgegengesetzter Richtung (reverse, R) durchgeführt.

Nach der Sequenzierung wurden die Ergebnisse mit den Sequenzen verglichen, die in der Genbank hinterlegt sind, und auf Fehler geprüft.

<u>Vektor</u>	<u>Sequenz-Primer</u>	
pHAD1	CMV-F	(CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG)
	pcDNA3.1-R	(TAGAAGGCACAGTCGAGGCT)
pHAD2	CMV-F	(CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG)
	pcDNA3.1-R	(TAGAAGGCACAGTCGAGGCT)
pHAD3	CMV-F	(CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG)
	pcDNA3.1-R	(TAGAAGGCACAGTCGAGGCT)
pHAD4	CMV-F	(CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG)
	pcDNA3.1-R	(TAGAAGGCACAGTCGAGGCT)

Die Zellsuspension wurde zusammen mit dem Transfektionskomplex in die Zellkulturplatten (Sarstedt) ausgesät und für drei Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert (Inkubationsschrank; Heraeus, BBD 6220). Anschließend wurde der Zellkulturüberstand verworfen und durch neues RPMI suppl. (mit 10 % FCS) ersetzt. Nach 2-3 Tagen konnten die Überstände und die Zellen analysiert werden.

Transfektionsschema

- 1.) Transfektionskomplex aus Transfektions-Reagenz + Verdünnungspuffer und Plasmid-DNA + Verdünnungspuffer
- 2.) Inkubation für 20 min bei RT
- 3.) Zugabe der Zellsuspension und Aussäen in die Zellkulturplatten
- 4.) Inkubation für 3 h (Heraeus, BBD 6220; 37°C, 5 % CO₂)

Für weitere Details bezüglich der Transfektionen in 6-*well*- und 24-*well*-Zellkulturplatten siehe Tab.2, Tab.3)

2.4.3 Infektion eukaryotischer Zellen mit partikelhaltigen Überständen

Die Infektion eukaryotischer Zellen mit den pseudotypisierten HIV-1-Partikeln aus den Zellkulturüberständen der Transfektion wurde in 96-*well*-Platten durchgeführt. Nierenzellen von Grünen Meerkatzen (VeroB4-Zellen) können mit Dengue pseudotypisierten Partikeln infiziert werden, während für die Übertragung von Viruspartikeln mit den Hüllproteinen des HIV-1 eine menschliche Glioblastom Zelllinie (U87-Zellen) verwendet wurde. Die jeweiligen Zellen waren in supplementiertem DMEM-Medium (mit 10 % FCS) suspendiert. Sie wurden in die Zellkulturplatten (Sarstedt bzw. Thermo Fisher Scientific) ausgesät und im Brutschrank (Heraeus, BBD 6220; 37°C, 5 % CO₂) inkubiert, bis die Kavitäten bis zu 80 % bedeckt waren. Für die Infektion wurden die partikelhaltigen Zellkulturüberstände verdünnt. Die Verdünnungen wurden auf ein Endvolumen von 200 µl bezogen. Die Proben wurden zusammen mit dem DMEM-Medium so auf die Zellen gegeben, dass ein Volumen von 100 µl entstand. Nach einer einstündigen Adsorption im Inkubationsschrank bei 37°C und 5 % CO₂ (Heraeus, BBD 6220) erfolgte die Zugabe von weiteren 100 µl Medium pro *well*.

Die infizierten Zellen wurden in den Zellkulturplatten für 2-3 Tage inkubiert (Heraeus, BBD 6220; 37°C, 5 % CO₂) und anschließend analysiert.

2.4.4 Luciferase-Assay

Die Effizienz der Transfektion von Plasmiden, sowie die Effizienz der Infektion mit pseudotypisierten Partikeln wurde mit Hilfe eines Luciferase-Assays überprüft. Sowohl die Plasmide, die in HEK293T-Zellen transfiziert wurden, als auch die pseudotypisierten Partikel exprimieren das Enzym Luciferase.

Für die Messung der Transfektions-Effizienz wurden die transfizierten Zellen zusammen mit dem darüber liegenden partikelhaltigen Zellkulturüberstand entnommen und in 1,5ml Eppendorf-Gefäße überführt. Die Zellen wurden bei 10000 rpm kurz abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico; 1 min, RT) und mit Lysispuffer versetzt. Bei -20°C wurden die lysierten Zellen gelagert. Die Bestimmung der Luciferase-Aktivität in den transfizierten, lysierten Zellen erfolgte mit Hilfe des Mikroplatten Luminometers (Berthold Technologies, Centro LB 960) und des *Luciferase Assay Reagent* (LAR, Promega). Je 10 µl lysierte Zellen wurden mit 50 µl LAR-Substrat in die *wells* von weißen 96-*well*-Platten (Thermo Fisher Scientific, unbeschichtet) gegeben. Direkt im Anschluss wurden die Proben im Gerät gemischt und vermessen.

Für die Messung der Infektionsraten wurden die infizierten Zellen lysiert und unmittelbar vermessen. Der Zellkulturüberstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 96-*well*-Platten mit 10 µl Lysispuffer gelöst. Nach der Zugabe von 50 µl LAR-Substrat pro *well* wurde die Platte direkt im Luminometer (Berthold Technologies, Centro LB 960) vermessen.

Das Luminometer wurde so eingestellt, dass die Platte für zwei Sekunden geschüttelt wird. Die Messzeit betrug eine Sekunde pro *well*.

Die Lichtemission, die bei der Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin durch Luciferase entsteht, wurde als relative Lichteinheit (relative light units, RLU) detektiert.

Lysepuffer:	25 mM Tris
	2 mM EDTA
	2 mM DTT
	10 % Glycerol
	1 % Triton x-100

Luminometer Protokoll

- 1.) *shake by plate* (2 sec, speed slow, diameter 0.1)
- 2.) *measurement by wells* (1 sec)

2.4.5 Bestimmung der TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose*)

Mit Hilfe von Infektionsreihen lässt sich die infektiöse Dosis der partikelhaltigen Zellkulturüberstände messen, sodass 50 % Infektionsexperimente erfolgreich verlaufen. Die infektiöse Dosis ist z. B. bei der vierten Verdünnung erreicht, wenn bei acht Infektionsexperimenten die ersten vier positiv waren und die restlichen negativ. Die serielle 1:2-Partikelverdünnung (1:5 bis 1:10240) wurde in beschichteten 96-*well*-Platten durchgeführt. Die verwendeten Zellen (VeroB4-Zellen bzw. U87-Zellen) wurden zuvor ausgesät und inkubiert, sodass eine 80 %ige Konfluenz erreicht war. In die 96-*wells* wurden jeweils 100 µl DMEM-Medium vorgelegt. Für die anfängliche Partikelverdünnung von 1:5 wurden 80 µl partikelhaltiger Überstand und 20 µl Medium zusätzlich in die Reihe der Zellkulturplatte hinzugefügt. Die infektiösen Überstände (100 µl) wurden für eine Stunde auf den Zellen adsorbiert (Inkubationsschrank Heraeus, BBD 6220; 37°C, 5 % CO₂). Anschließend wurden weitere 100 µl DMEM-Medium hinzugegeben. Nach 2-3 tägiger Inkubation konnten die Ergebnisse der TCID₅₀-Reihen mittels des Luciferase-Assays ermittelt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikel

In dieser Arbeit wurde die Herstellung der Dengue-pseudotypisierten HIV-1-Partikel erweitert und optimiert. Für die Transfektion wurden die aufgereinigten HIV-1 Plasmide gp160 und pNLlucAM sowie die DENV-Plasmide pHAD1-pHAD4 verwendet. Das Plasmid pNLlucAM dient als rekombinanter Vektor, welcher durch die Deletion der Hüllproteine einen Replikations-inkompetenten HIV-1-Vektor darstellt. Auf dem rekombinanten Vektor ist außerdem das Luciferase-Reportergen lokalisiert. Im Zuge der Transfektion wird das Reportergen abgelesen und Luciferase in den Zellen gebildet. Die Luciferase wirkt als Katalysator für die oxidative Umwandlung von Luciferin zu Oxiluciferin, wodurch eine Biolumineszenz verursacht wird. Diese kann im Luminometer detektiert werden.

Mit Hilfe des *Screenfect* A-Reagenzes (Incella) wurden verschiedene DNA-Verhältnisse von Vektor- und Hüllplasmid auf ihre Transfektionseffizienz getestet. Die DNA-Menge der Hüllplasmide überwog bei allen folgenden Transfektionsexperimenten. DNA-Verhältnisse zwischen 2µl/4µl und 10µl/50µl bzw. zwischen 0,6µl/1,4µl und 3,3µl/16,7µl wurden für die Partikelbildung getestet (siehe Tab. 2, Tab. 3). Durch das bereits erfolgreich etablierte HIV-1 pseudotypisierte HIV-1-System galt die Transfektion mit den Plasmiden pNLlucAM und pgp160 als Kontrolle für die Funktionalität des Systems. Die Entstehung der Partikel wurde durch die Luciferase-Aktivität in den transfizierten Zellen mittels des Luciferase-Assays nachgewiesen. Der Transfektionskomplex wurde aus dem *Screenfect* A-Reagenz und der DNA angesetzt, die jeweils zuvor mit dem *Screenfect* A-Puffer verdünnt wurden. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Komplex auf die Zellen gegeben. Je nach Transfektionsmethode wurden die Zellen am Tag zuvor in 6-*well*- bzw. 24-*well*-Platten ausgesät oder als Zellsuspension erst zusammen mit dem Transfektionskomplex ausgesät. Die effektivste Transfektionszeit wurde im Voraus bereits getestet. Demnach wurde der Transfektionskomplex für 3 h im Brutschrank (Heraeus, BBD 6220; 37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Abschließend wurde der Komplex verworfen und 3 ml (6-*well*) bzw. 1 ml (24-*well*) RPMI-Medium wurde auf die Zellen gegeben.

Je nach Methode blieben auch hier die Zellen entweder komplett adhärent oder wurden vom Boden der *wells* gelöst. Nach zweitägiger Inkubation im Brutschrank wurden die partikelhaltigen Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. Die Zellkulturüberstände wurden in 200 µl Aliquots eingeteilt und bei -70°C gelagert, um diese stabil zu halten. (2.4.2)

Das Luciferase-Assay der transfizierten HEK293T-Zellen wurde ausschließlich mit dem LAR-Substrat durchgeführt. Die abzentrifugierten Zellen wurden mit 200 µl (Transfektion in der 6-well-Platte) bzw. 100 µl (Transfektion in der 24-well-Platte) Lysepuffer versetzt und darin gelöst. Das Assay erfolgte für jede Transfektion einmalig und jeweils nach dem Einfrieren der lysierten Zellen bei -20°C. (2.4.4)

Tab. 2: DNA-Verhältnisse der Transfektionsexperimente (6-well-Platte).

Plasmide	DNA-Mengen ^{*1}	Gesamtmenge	Reagenz-Menge ^{*2}
Vektor pNLlucAM	2 µl	6 µl	21 µl
Hüllproteine	4 µl		
Vektor pNLlucAM	3 µl	10 µl	33 µl
Hüllproteine	7 µl		
Vektor pNLlucAM	5 µl	20 µl	63 µl
Hüllproteine	15 µl		
Vektor pNLlucAM	7 µl	30 µl	93 µl
Hüllproteine	23 µl		
Vektor pNLlucAM	8 µl	45 µl	138 µl
Hüllproteine	37 µl		
Vektor pNLlucAM	10 µl	60 µl	183 µl
Hüllproteine	50 µl		
Puffermenge DNA-Verdünnung		120 µl	
Puffermenge Reagenz-Verdünnung		120 µl	
Menge Zellsuspension		1250 µl	

^{*1} DNA-Konzentration: 1 µg/µl

^{*2} *Screenfect A* (Incella)

Tab. 3: DNA-Verhältnisse der Transfektionsexperimente (24-well-Platte).

Plasmide	DNA-Mengen ^{*1}	Gesamtmenge	Reagenz-Menge ^{*2}
Vektor pNLlucAM	0,6 µl	2 µl	3 µl
Hüllproteine	1,4 µl		
Vektor pNLlucAM	1 µl	3,5 µl	4,5 µl
Hüllproteine	2,5 µl		
Vektor pNLlucAM	1,6 µl	6,5 µl	7,5 µl
Hüllproteine	4,9 µl		
Vektor pNLlucAM	2,3 µl	10 µl	11 µl
Hüllproteine	7,7 µl		
Vektor pNLlucAM	2,6 µl	15 µl	16 µl
Hüllproteine	12,4 µl		
Vektor pNLlucAM	3,3 µl	20 µl	21 µl
Hüllproteine	16,7 µl		
Puffermenge DNA-Verdünnung		40 µl	
Puffermenge Reagenz-Verdünnung		40 µl	
Menge Zellsuspension		420 µl	

^{*1} DNA-Konzentration: 1 µg/µl

^{*2} *Screenfect A* (Incella)

3.1.1 Herstellung der DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikel in 6-well-Zellkulturplatten

Begonnen wurden die Transfektionsexperimente in 6-well-Zellkulturplatten (Sarstedt). In der Literatur werden pseudotypisierte DENV-2-Partikel bevorzugt, da diese die besten Ergebnisse aufweisen. Demnach wurde das lentivirale System zuerst mit DENV-2 Hüllproteinen durchgeführt. Nach erfolgreicher Transfektion wurden zusätzlich DENV-3 pseudotypisierte HIV-1-Partikel hergestellt. Das Austesten des Protokolls und des Transfektionsreagenzes mit variierenden DNA-Mengen ergab veränderte Luciferase-Aktivitäten bei höheren DNA-Mengen. Somit wurden für die Co-Transfektionen mit Vektor- und Hüll-Plasmid die DNA-Mengen in verschiedenen Verhältnissen erweitert, um eine Limitation der Luciferase-Aktivität in den transfizierten Zellen zu ermitteln. Die Transfektionen der HEK293T-Zellen wurden für alle DNA-Verhältnisse gleichzeitig in einer 6-well-Platte durchgeführt. Aufgrund möglicher Wechselwirkungen werden in einer Zellkulturplatte nur Pseudotypen mit denselben Hüllplasmiden transfiziert. Die HEK293T-Zellen wurden in großen Zellkulturflaschen (Sarstedt) gezüchtet, von der Wand gelöst und als Zellsuspension zusammen mit dem Transfektionskomplex in die *wells* ausgesät. Während der Zugabe des neuen RPMI-Mediums wurden die adhärennten Zellen erneut vom Boden gespült. Die Zellkulturplatten wurden jeweils 2 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ (Haraeus, BBD 6220) inkubiert.

Die variierenden DNA-Mengen während der Transfektion sorgen für eine erkennbare Abnahme in den Luciferase-Aktivitäten der HEK293T-Zellen. Je mehr Plasmid in die Zellen gegeben wurde, desto weniger Luciferin wurde in den Zellen umgesetzt. Wie in Tab. 4 gezeigt, sinken die Luciferase-Aktivitäten mit jedem DNA-Verhältnis. Ab einer transfizierten Plasmid-Gesamtmenge von 30 µl stabilisieren sich die Werte im Bereich von 10⁵ RLU.

Die Luciferase-Aktivitäten der pNLucAM/pHAD3 transfizierten HEK293T-Zellen zeigen eine ähnliche Entwicklung, wie die Transfektionen mit den DENV-2 Hüllproteinen. Ebenfalls sinken die Luciferase-Aktivitäten in den Zellen mit steigender Plasmid-Menge. Allerdings nimmt die Luciferase-Aktivität langsamer ab. Wie Tab. 5 zeigt, stabilisieren sich die Luciferase-Aktivitäten der DENV-3 transfizierten Zellen bei höheren 10⁶ RLU.

Die Leerwerte des Luciferase-Assays weisen leichte Schwankungen auf, befinden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von <130 relativen Lichteinheiten.

Die Ergebnisse dieser Transfektionen ergaben die höchsten Luciferase-Aktivitäten bei einer transfizierten Plasmid-Gesamtmenge von 6 µl. Dies entspricht einem molaren Verhältnis von 1:6 (HIV-1-Vektor zu DENV-Hüllplasmid).

Tab. 4: Luciferase-Aktivitäten der DENV-2 transfizierten HEK293T-Zellen.

pNLucAM/pHAD2

DNA-Verhältnis *	2 μ l +4 μ l	3 μ l +7 μ l	5 μ l +15 μ l	7 μ l +23 μ l	8 μ l +37 μ l	10 μ l +50 μ l
Luciferase-Aktivität [RLU]	$2 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^7$	$4,9 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 μ g/ μ l

Tab. 5: Luciferase-Aktivitäten der DENV-3 transfizierten HEK293T-Zellen.

pNLucAM/pHAD3

DNA-Verhältnis *	2 μ l +4 μ l	3 μ l +7 μ l	5 μ l +15 μ l	7 μ l +23 μ l	8 μ l +37 μ l	10 μ l +50 μ l
Luciferase-Aktivität [RLU]	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 μ g/ μ l

3.1.2 Herstellung der HIV-1 pseudotypisierten Partikel in 6-well Zellkulturplatten

Zum Vergleich der hergestellten Dengue M/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikel mit dem bereits etablierten HIV-1-System wurden zusätzlich Transfektionen mit einem gp160-Plasmid durchgeführt. Erneut wurde in den 6-well-Platten transfiziert. Allerdings wurden anfänglich nur die Plasmid-Mengen 2 μ l+4 μ l, 3 μ l+7 μ l und 5 μ l+15 μ l eingesetzt und anschließend die HEK293T-Zellen auf ihre Luciferase-Aktivität getestet. Die Herstellung der partikelhaltigen Überstände erfolgte identisch zu der Transfektion der DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikel in 6-well-Zellkulturplatten (Sarstedt).

Die unterschiedlichen DNA-Mengen, die während der Transfektion eingesetzt wurden, haben bei den HIV-1 pseudotypisierten HIV-1 Partikeln den gleichen Transfektionseffekt, wie bei den DENV pseudotypierten HIV-1 Partikeln. Je mehr Plasmid in die HEK293T-Zellen gegeben wurde, desto weniger Luciferin wurde in den Zellen umgesetzt. Wie Tab. 6 zeigt, sinken die Luciferase-Aktivitäten der transfizierten Zellen bei jedem steigenden DNA-Verhältnis um eine Zehnerpotenz. Es wurden Luciferin Umsätze zwischen 10^7 und 10^5 detektiert.

Die Leerwerte des Luciferase-Assays weisen leichte Schwankungen auf, befinden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von <130 relativen Lichteinheiten.

Die Ergebnisse waren ähnlich, wie bei den Transfektionen DENV pseudotypisierter HIV-1-Partikel. Die höchsten Luciferase-Aktivitäten entwickelten sich bei einer transfizierten Plasmid-Gesamtmenge von 6 μ l, was einem molaren Verhältnis von 1:6 (HIV-1-Vektor zu HIV-1-Hüllplasmid) entspricht.

Tab. 6: Luciferase-Aktivitäten der HIV-1 transfizierten HEK293T-Zellen. pNLucAM/pgp160

DNA-Verhältnis *	2 μ l+4 μ l	3 μ l+7 μ l	5 μ l+15 μ l
Luciferase-Aktivität [RLU]	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 μ g/ μ l

3.1.3 Herstellung der pseudotypisierten Partikel mit den Hüllproteinen aller vier Dengue Serotypen

Im weiteren Vorgehen wurden die Transfektionen mit allen vier Dengue Serotypen durchgeführt. Um die Ergebnisse besser reproduzieren zu können, wurde in 24-*well*-Platten (Sarstedt) mit Dreifachbestimmungen transfiziert. Die DNA-Verhältnisse der 6-*well*-Transfektionen sollten beibehalten werden, um dieselben Ergebnisse zu erzielen. Anhand des *Screenfect* A-Protokolls wurden die Puffer- und Reagenzmengen für die 24-*well*-Transfektionen ermittelt und auf die 6-*well* DNA-Verhältnisse übertragen (siehe Tab. 2).

Für eine gleichmäßige Zellverteilung wurden die HEK293T-Zellen einen Tag vor der Transfektion in den *wells* ausgesät, sodass die Kavitäten zu 80 % adhärent bedeckt waren. Daher wurde zu dem Transfektionskomplex lediglich das DMEM-Medium hinzugefügt, bevor alles auf die Zellen gegeben wurde, ohne diese vom Boden der *wells* zu lösen. Die Inkubationszeit der Platten bei 37°C und 5 %CO₂ (Haraeus, BBD 6220) für 3 h blieb unverändert. Bei der Zugabe des Mediums wurde erneut darauf geachtet, dass die Zellen nicht gelöst werden. Die Zellkulturplatten wurden jeweils 2 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ (Haraeus, BBD 6220) inkubiert.

Die Luciferase-Aktivitäten der transfizierten und lysierten HEK293T-Zellen sollen die Ergebnisse der 6-*well*-Transfektionen widerspiegeln und die Gleichmäßigkeit darstellen.

Bei allen Serotypen zeigen die Luciferase-Aktivitäten der transfizierten Zellen ähnliche Entwicklungen. Wie in Tab. 7, lässt sich trotz steigender eingesetzter DNA-Menge kein Verlauf in den Messwerten bestimmen. Die Dreifachbestimmungen der gleichen Plasmid-Verhältnisse schwanken stark untereinander, sodass Luciferase-Aktivitäten zwischen 10⁴ und 10⁹ RLUs detektiert wurden.

Die Leerwerte des Luciferase-Assays weisen leichte Schwankungen auf, befinden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von <130 relativen Lichteinheiten.

Ergebnis war, dass die Transfektionen Dengue-M/E pseudotypisierter HIV-1-Partikel auch in 24-*well*-Zellkulturplatten mit den angepassten und umgerechneten DNA-Verhältnissen erfolgreich verlaufen. Es wurden hohe Luciferase-Aktivitäten zwischen 10⁴ und 10⁹ RLUs gemessen, wobei sich die Entwicklungen der Transfektionen in der 6-*well*-Zellkulturplatte nicht bestätigen ließen. Zusätzlich sind erste Unregelmäßigkeiten im System aufgetreten.

Tab. 7: Luciferase-Aktivitäten der transfizierten HEK293T-Zellen in 24-well-Zellkulturplatten.

pNLucAM/pcBD1

DNA-Verhältnis *	0,6 µl + 1,4 µl	1 µl + 2,5 µl	1,6 µl + 4,9 µl	2,3 µl + 7,7 µl	2,6 µl + 12,4 µl	3,3 µl + 16,7 µl
Luciferase-Aktivität [RLU]	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$6,5 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	$6,8 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
	$1,5 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^6$	$2,7 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$

pNLucAM/pHAD2

DNA-Verhältnis *	0,6 µl + 1,4 µl	1 µl + 2,5 µl	1,6 µl + 4,9 µl	2,3 µl + 7,7 µl	2,6 µl + 12,4 µl	3,3 µl + 16,7 µl
Luciferase-Aktivität [RLU]	$8 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$
	$3,9 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$
	$5,9 \cdot 10^6$	$3,8 \cdot 10^6$	$9,9 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$

pNLucAM/pHAD3

DNA-Verhältnis *	0,6 µl + 1,4 µl	1 µl + 2,5 µl	1,6 µl + 4,9 µl	2,3 µl + 7,7 µl	2,6 µl + 12,4 µl	3,3 µl + 16,7 µl
Luciferase-Aktivität [RLU]	$1,8 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^5$
	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^5$
	$2 \cdot 10^5$	$8,9 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^5$	$5,7 \cdot 10^5$

pNLucAM/pHAD4

DNA-Verhältnis *	0,6 µl + 1,4 µl	1 µl + 2,5 µl	1,6 µl + 4,9 µl	2,3 µl + 7,7 µl	2,6 µl + 12,4 µl	3,3 µl + 16,7 µl
Luciferase-Aktivität [RLU]	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^9$
	$2,7 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^9$	$2,8 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$
	$1 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$1,5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^9$	$5,6 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^9$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 µg/µl

3.2 Infektion eukaryotischer Zellen mit pseudotypisierten Partikeln

Während der lipophilen Co-Transfektion mit den Vektor- und den Hüllplasmiden werden die pseudotypisierten Partikel aus den HEK293T-Zellen geschleust. Mit Hilfe der partikelhaltigen Zellkulturüberstände lassen sich entsprechende eukaryotische Zelllinien infizieren. Die pseudotypisierten Partikel tragen durch die Co-Transfektion ebenfalls das Luciferase-Reportergen. Nach dem Virus-Eintritt in die Zelle wird das Genom der Partikel abgelesen. Demnach kann die Infektion in den Zellen mittels des Luciferase-Assays nachgewiesen werden.

Die Infektionen wurden in 96-*well*-Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die eukaryotischen Zellen wurden im Vorwege ausgesät, sodass die Fläche der *wells* zum Zeitpunkt der Infektion zu ca. 80 % adhärent bedeckt war. Alle partikelhaltigen Überstände wurden für die Infektionen verdünnt. Überwiegend wurden Infektionen angesetzt, um die Gleichmäßigkeit des lentiviralen Systems zu überprüfen. Allerdings wurde mit Hilfe der Infektionen auch die Herstellung der pseudotypisierten Partikel aus den Transfektionen überprüft und es wurden Verdünnungsreihen für TCID₅₀-Experimente eingesetzt. Jede der Infektionen wurden mit einem Volumen von 100 µl pro *well* angesetzt. Die partikelhaltigen Überstände wurden für eine Stunde auf den Zellen im Inkubationsschrank (Heraeus, BBD 6220; 37°C, 5 % CO₂) adsorbiert. Anschließend wurden jeweils weitere 100 µl Medium hinzugegeben. (2.4.3)

Zusätzlich wurden die Zellkulturplatten für 2-3 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert (Heraeus, BBD 6220), bevor die infizierten Zellen lysiert und auf ihre Luciferase-Aktivität getestet wurden. (2.4.4)

3.2.1 Infektion eukaryotischer Zellen mit DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikeln

Die ersten Infektionsexperimente wurden durchgeführt, um die Herstellung der pseudotypisierten Partikel nachzuweisen. Die partikelhaltigen Überstände aus den 6-*well*-Transfektionen wurden 1:5 verdünnt. Auf den adhärent ausgesäten VeroB4-Zellen, wurden 40 µl Überstand und 60 µl DMEM-Medium für 1 h im Inkubationsschrank adsorbiert. Anschließend wurden 100 µl Medium hinzugefügt.

Die weißen Zellkulturplatten wurden für zwei Tage bei 37°C und 5 %CO₂ (Haraeus, BBD 6220) inkubiert. Jede dieser Infektionen wurde einmalig und mit Einfachbestimmungen durchgeführt.

Um die Infektionseffizienz zu bestimmen, wurden die Überstände verworfen. Die Platten wurden nicht ausgeklopft. Nach der Lyse und der Zugabe des LAR-Substrats wurden die VeroB4-Zellen im Luminometer (Berthold Technologies, Centro LB 960) vermessen. Die Messung wurde so oft durchgeführt, bis der Höhepunkt der Luciferase-Reaktion erreicht wurde.

Die variierenden DNA-Mengen, die für die Transfektionsexperimente eingesetzt wurden, spiegeln sich auch in den Infektionseffizienzen wieder. Mit steigenden Plasmid-Mengen wurden auch mehr VeroB4-Zellen infiziert. Wie in Tab. 4 aufgezeigt, steigen die Luciferase-Aktivitäten mit jedem DNA-Verhältnis. Ab einer transfizierten Plasmid-Gesamtmenge von 30 µl stabilisieren sich die Werte im Bereich von 10⁵ RLU. In Abb. 4 ist der Zusammenhang zwischen der Herstellung der pseudotypisierten Partikel und der Infektion mit den partikelhaltigen Überständen dargelegt. Während die Luciferase-Aktivitäten der transfizierten Zellen sinken, steigen die Luciferase-Aktivitäten der infizierten Zellen bei höheren DNA-Verhältnissen.

Die infizierten VeroB4-Zellen mit DENV-3 pseudotypisierten Partikeln lassen entsprechende Effizienzen wie die vorherigen Infektionen erkennen. Infolge höherer transfizierter Plasmid-Mengen steigt die Luciferin-Umsetzung in den VeroB4-Zellen. Wie Tab. 9 verdeutlicht, erhöhen sich die Luciferase-Aktivitäten mit jedem DNA-Verhältnis. Bei einer transfizierten Plasmid-Gesamtmenge von 60 µl sinken die Werte von 10⁴ RLU auf 10³ RLU wieder. Der direkte Zusammenhang zwischen Transfektion und Infektion des pseudotypisierten Systems ist in Abb. 5 dargestellt. Mit zunehmenden DNA-Verhältnissen nehmen die Transfektionseffizienzen ab und die Infektionseffizienzen steigen.

Die Leerwerte des Luciferase-Assays weisen leichte Schwankungen auf, befinden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von <130 relativen Lichteinheiten.

Die Ergebnisse brachten die höchsten Luciferase-Aktivitäten durch Infektion eukaryotischer Zellen mit partikelhaltigen Überständen, die mit einer Gesamtmenge von 45 µl transfiziert wurden. Dies gleicht einem Mol-Verhältnis von 1:14 (HIV-1-Vektor zu DENV-Hüllplasmid). Die Resultate sind entgegengesetzt der Transfektionsergebnisse und beschreiben die Verbindung zwischen Transfektion und Infektion. Für weitere Infektionsexperimente wurden ausschließlich die Überstände der DNA-Verhältnisse 8 µl+37 µl verwendet.

Tab. 8: Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – Infektion mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln.

pNLlucAM/pHAD2						
DNA-Verhältnis *	2 μ l +4 μ l	3 μ l +7 μ l	5 μ l +15 μ l	7 μ l +23 μ l	8 μ l +37 μ l	10 μ l +50 μ l
Luciferase-Aktivität [RLU]	$5 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 μ g/ μ l

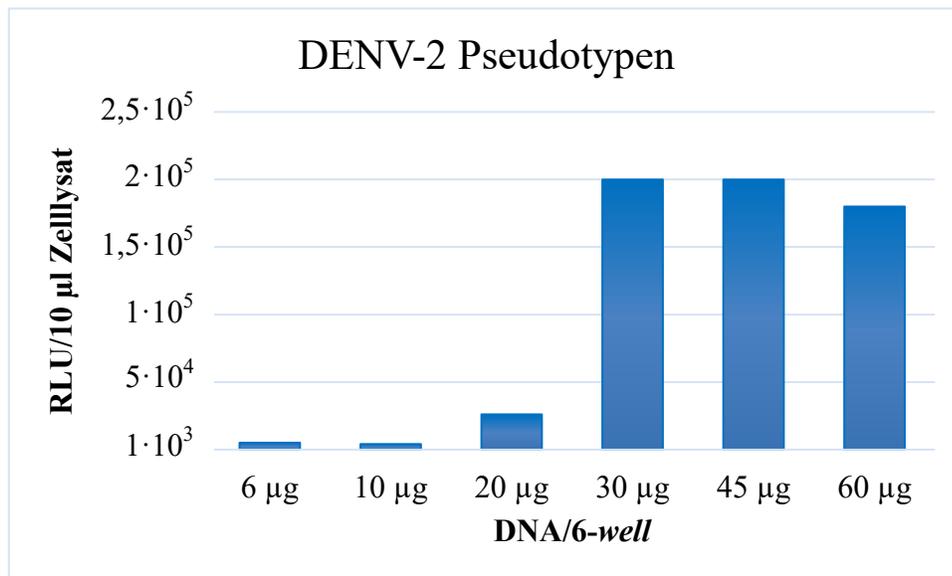


Abb. 4 Ausbeute DENV-2 pseudotypisierter Partikel.

Dargestellt sind die Luciferase-Aktivitäten der VeroB4-Zellen, die mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln infiziert wurden. Die Herstellung der Partikel erfolgte mit den angegebenen DNA-Gesamtmenen in 6-well-Transfektionen. Die partikelhaltigen Überstände wurden für die Infektion 1:5 verdünnt.

Tab. 9: Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – Infektion mit DENV-3 pseudotypisierten Partikeln.

pNLucAM/pHAD3

DNA-Verhältnis *	2 µl +4 µl	3 µl +7 µl	5 µl +15 µl	7 µl +23 µl	8 µl +37 µl	5 µl +15 µl
Luciferase-Aktivität [RLU]	$2 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$5,6 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^3$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 µg/µl

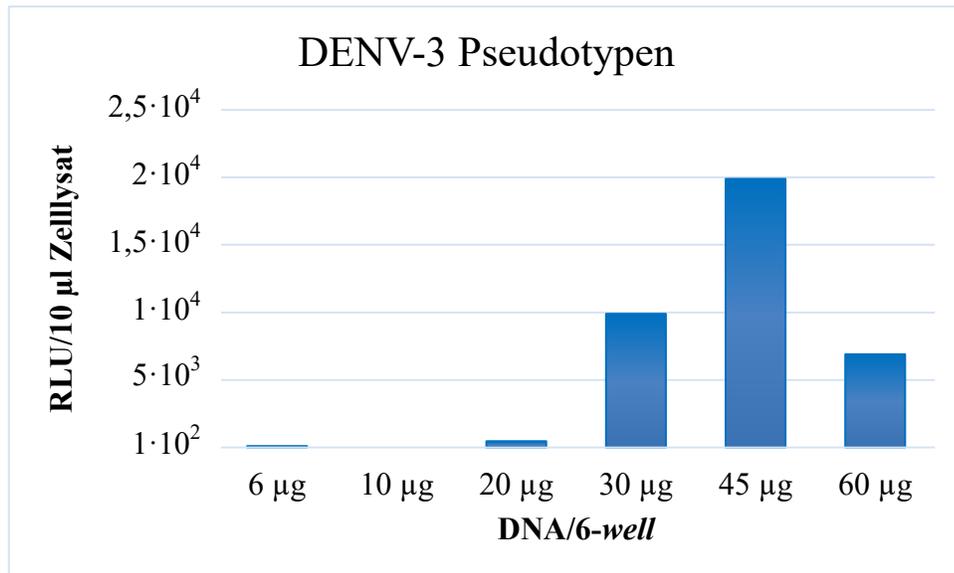


Abb. 5 Ausbeute DENV-3 pseudotypisierter Partikel.

Dargestellt sind die Luciferase-Aktivitäten der VeroB4-Zellen, die mit DENV-3 pseudotypisierten Partikeln infiziert wurden. Die Herstellung der Partikel erfolgte mit den angegebenen DNA-Gesamtmengen in 6-well-Transfektionen. Die partikelhaltigen Überstände wurden für die Infektion 1:5 verdünnt.

3.2.2 Infektion von U87-Zellen mit HIV-1 pseudotypisierten Partikeln

Mit Hilfe von Infektionsexperimenten wurden die HIV-1 pseudotypisierten Partikel in den Zellkulturüberständen, die mittels der drei verschiedenen DNA-Verhältnisse im Zuge der Transfektion hergestellt wurden, detektiert. Auch die partikelhaltigen Überstände mit den ppp160 pseudotypisierten Partikeln wurden für diese Infektionen 1:5 verdünnt. Hingegen wurden Glioblastom-Zellen (U87) anstatt von Nierenzelle (VeroB4) mit HIV-1 infiziert. Die U87-Zellen wurden wie die VeroB4-Zellen im Vorwege in die weißen Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific) ausgesät und die verdünnten partikelhaltigen Überstände bei der richtigen Dichte auf den Zellen adsorbiert. Die Zellkulturplatten wurden ebenfalls für zwei Tage bei 37°C und 5 % CO₂ (Haraeus, BBD 6220) inkubiert. Ferner wurde auch das Luciferase-Assay wie bei der Infektion eukaryotischer Zellen mit DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikeln durchgeführt.

Die partikelhaltigen Überstände der unterschiedlichen DNA-Verhältnisse zeigen umgekehrte Infektionseffizienzen bei steigenden Plasmid-Mengen im Gegensatz zu den DENV pseudotypisierten Partikeln. Mit steigenden DNA-Mengen sinken die relativen Lichteinheiten der infizierten Zellen beträchtlich. Wie in Tab. 10, kamen die höchsten Luciferase-Aktivitäten in den U87-Zellen vor, die mit Überständen infiziert wurden, welche mit der niedrigsten Gesamtmenge transfiziert wurden. Es wurden Infektionseffizienzen zwischen 10⁵ und 60 RLUs detektiert, wobei sich die niedrigen Messwerte im Bereich der Leerwerte <130 relativen Lichteinheiten befinden.

Die Ergebnisse haben die höchsten Luciferase-Aktivitäten bei einer transfizierten Plasmid-Gesamtmenge von 6 µl ergeben, was einem molaren Verhältnis von 1:6 (HIV-1-Vektor zu HIV-1-Hüllplasmid) entspricht. Die Resultate überschneiden sich mit den Transfektionseffizienzen der HIV-1 pseudotypisierter HIV-1-Partikel, unterscheiden sich jedoch von den Infektionseffizienzen Dengue-M/E pseudotypisierter HIV-1-Partikel. Für weitere Infektionsexperimente wurden die Überstände der DNA-Verhältnisse 2 µl+4 µl verwendet.

Tab. 10: Luciferase-Aktivitäten infizierter U87-Zellen – Infektion mit HIV-1 pseudotypisierten Partikeln.

pNLucAM/pgp160			
DNA-Verhältnis *	2 μ l+4 μ l	3 μ l+7 μ l	5 μ l+15 μ l
Luciferase-Aktivität [RLU]	$1 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^1$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 μ g/ μ l

3.2.3 Bestimmung der TCID₅₀ von DENV-2 und DENV-3 Pseudotypen im Zellkulturüberstand

Die partikelhaltigen Zellkulturüberstände mit den enthaltenen DENV-2 und DENV-3 pseudotypisierten Partikeln wurden für weitere Experimente verwendet. Mit den Überständen, welche die höchsten Infektionseffizienzen aufweisen (DNA-Verhältnisse 7 μ l+23 μ l und 8 μ l+37 μ l), wurden Verdünnungsreihen angesetzt, um Infektionsdosen abschätzen zu können, durch die 50 % der Zellkultur infiziert werden. Diese Mengen sind grundlegend für weiterführende Experimente, wie Neutralisationstests. Für die TCID₅₀-Reihen wurden die partikelhaltigen Überstände anfänglich 1:5 und anschließend seriell 1:2 verdünnt. Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Zellkulturplatten wurden für 2 Tage im Brutschrank inkubiert (Haraeus, BBD 6220; 37°C und 5 % CO₂).

Bei höheren Verdünnungen der Überstände wurden die Zellen mit weniger pseudotypisierten Partikeln infiziert. Es wurde daher weniger Luciferin in den VeroB4-Zellen umgesetzt und eine abnehmende Luciferase-Aktivität detektiert. Wie Tab. 11 zeigt, treten innerhalb der Verdünnungsreihen abweichende Messwerte auf, welche die abnehmenden Reihen unterbecken. Außerdem stimmen die Mehrfachbestimmungen nicht immer überein. Die Infektionseffizienzen der DENV-2 pseudotypisierten Partikel ergeben Werte zwischen 10⁶ und 10² RLU, während die Luciferase-Aktivitäten der DENV-3 pseudotypisierten Partikel überwiegend im Bereich von 10² RLU liegen.

Die Leerwerte des Luciferase-Assays weisen leichte Schwankungen auf, befinden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von <130 relativen Lichteinheiten.

Ergebnis war, dass für weitere Infektionsexperimente mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln, wie Neutralisationstests, eine 1:100 Verdünnung optimal ist, sodass die partikelhaltigen Überstände einer Transfektion in 6-well-Zellkulturplatten für 3000 Infektionsexperimente (im 96-well Format) ausreicht. Die Resultate der Infektionen mit DENV-3 pseudotypisierten Partikeln zeigten zu viele Instabilitäten auf, um genaue Aussagen treffen zu können. Die TCID₅₀-Reihen ergaben Unregelmäßigkeiten im Infektionsmodell.

Tab. 11: Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – TCID₅₀-Reihen von DENV-2 und DENV-3 Pseudotypen.

Verdünnungen	pNLlucAM+pHAD2, 7 µl/23 µl				pNLlucAM+pHAD3, 8 µl/37 µl			
1:5	4·10 ⁶	4·10 ⁶	5·10 ⁶	5·10 ⁶	4·10 ⁵	2,7·10 ²	4,7·10 ³	9·10 ³
1:10	4·10 ⁶	2,9·10 ⁶	2·10 ⁶	1·10 ⁶	4,6·10 ²	9,8·10 ⁴	3,8·10 ⁴	9,6·10 ⁴
1:20	2,5·10 ⁶	8,7·10 ⁵	9·10 ⁵	6·10 ⁵	2,5·10 ²	1·10 ⁴	1,7·10 ²	1,5·10 ²
1:40	8,5·10 ⁵	4,5·10 ⁵	4·10 ⁵	5·10 ⁵	2·10 ²	1·10 ⁵	1,8·10 ²	1,7·10 ²
1:80	3,9·10 ⁵	1,5·10 ⁵	1,5·10 ³	8·10 ³	1,8·10 ²	1,8·10 ²	1,5·10 ²	1,6·10 ²
1:160	5,7·10 ⁴	3·10 ⁴	1·10 ⁵	2·10 ³	2·10 ²	1,6·10 ²	1,8·10 ²	1,6·10 ²
1:320	2·10 ²	7·10 ³	1,5·10 ²	1·10 ⁵	1,8·10 ²	1·10 ²	5·10 ³	1,5·10 ²
1:640	1,5·10 ²	3,6·10 ²	1·10 ²	2·10 ³	1,5·10 ²	1,7·10 ²	1,5·10 ²	1,5·10 ²
1:1280	1,7·10 ²	1,7·10 ²	1,7·10 ²	1,5·10 ²	1,5·10 ²	1,5·10 ²	1·10 ²	1·10 ²
1:2560	2·10 ⁴	1,7·10 ²	1,7·10 ²	1,9·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	1,5·10 ²	1,8·10 ²
1:5120	1·10 ²	1,5·10 ²	1,7·10 ²	1,6·10 ²	1,6·10 ²	1,8·10 ²	1·10 ²	1,5·10 ²
1:10240	1,6·10 ²	1,5·10 ²	1,5·10 ²	1,5·10 ²	1,5·10 ²	1·10 ²	1,5·10 ²	1,5·10 ²

3.2.4 Methoden zur Verbesserung des Infektionsmodells

Die Regelmäßigkeit des lentiviralen Vektorsystems wurde zuerst mit den bereits eingeführten HIV-1 pseudotypisierten Partikeln erprobt. Es wurde eine erneute Transfektion mit den Plasmiden pNLlucAM/pgp160, pNLlucAM und pgp160 durchgeführt. Die Hälfte der partikelhaltigen Überstände wurde durch einen 0,45 µm Vorsatzfilter filtriert, um mögliche HEK293T-Zellen aus den Überständen zu entfernen. Die partikelhaltigen Überstände wurden für zwei verschiedene Infektionsexperimente verwendet. Die Experimente unterschieden sich in den verwendeten Zellkulturplatten und der daraus folgenden Durchführung des Luciferase-Assays. Im ersten Versuch wurden die Zellen in klare Zellkulturplatten (Sarstedt) ausgesät und nach der Zellyse in unbeschichtete, weiße Zellkulturplatten überführt. Im zweiten Experiment wurden die Zellen in speziell beschichtete weiße Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific) ausgesät und während des kompletten Prozesses in den Platten behalten.

Die Kenntnisse aus den Infektionen eukaryotischer Zellen mit pseudotypisierten Partikeln zur Stabilisierung des Infektionsmodells wurden auf die Infektionen mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln übertragen. Es wurde eine mögliche Beeinflussung des Infektionsmodells durch das im Medium enthaltene FCS vermutet. Demnach wurden VeroB4-Zellen infiziert, die sowohl im DMEM-Medium mit als auch im DMEM ohne FCS ausgesät wurden. Auch die partikelhaltigen Überstände wurden mit den entsprechenden Medien verdünnt.

Die Ergebnisse zeigten, dass der Vergleich der Infektionen mit nicht filtrierten und filtrierten partikelhaltigen Überständen keine Unterschiede in den Verteilungen darlegt. Die Doppelbestimmungen ergaben keine übereinstimmenden Messwerte und auch die Luciferase-Aktivitäten der 1:50-Verdünnungen schwankten. Die Messungen der infizierten U87-Zellen in den weißen Zellkulturplatten ließen keine Luciferase-Aktivitäten im Bereich der Leerwerte ermitteln, dennoch konnte keine Stabilität erreicht werden.

Die unterschiedlichen Medien haben keine Divergenzen in den Messergebnissen aufgezeigt. Allerdings ist eine Wirkung des FCS auf die pseudotypisierten Partikel trotzdem nicht ausgeschlossen, da die Plasmide mit FCS-haltigem Medium transfiziert wurden und die Überstände demnach auch FCS enthalten.

Tab. 12: Luciferase-Aktivitäten infizierter U87-Zellen – Infektionen und TCID₅₀-Reihen mit HIV-1 pseudotypisierten Partikeln. *

Verdünnungen	pNLlucAM+pgp160 2 µl+4 µl, nicht filtriert		pNLlucAM+pgp160 2 µl+4 µl, filtriert		pNLlucAM+pgp160 2 µl+4 µl vorherige Transfektion	
	1:5	$3,5 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$
1:10	$1,9 \cdot 10^4$	$5,6 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^4$	$2,9 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^3$
1:20	$4,9 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^1$	$1,6 \cdot 10^2$
1:40	$1,5 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$	$9 \cdot 10^1$	$3,5 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$
1:80	$3 \cdot 10^1$	$8,7 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^1$	$7 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^2$
1:160	$4 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$
1:320	$3 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^1$	$8,7 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^1$
1:640	$3 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$2,8 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^1$

Verdünnung	pNLlucAM +pgp160 2 µl+4 µl nicht filtriert	pNLlucAM +pgp160 2 µl/4 µl filtriert	pNLlucAM +pgp160 2 µl/4 µl vorherige Transfektion	pNLlucAM 2 µl nicht filtriert	pNLlucAM 2 µl filtriert	pgp160 2 µl filtriert
	1:50	$3 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^2$	$6,7 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$
$8,6 \cdot 10^3$		$6 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^1$
$1 \cdot 10^4$		$1,6 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$
$2 \cdot 10^3$		$7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$
$2,8 \cdot 10^2$		$3 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$
$3 \cdot 10^4$		$1 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$
$3,9 \cdot 10^3$		$1,7 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$
$8 \cdot 10^3$		$4,6 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$5 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^1$

* Die Infektionen wurden in klaren, beschichteten 96-well-Zellkulturplatten (Sarstedt) durchgeführt.

Tab. 13: Luciferase-Aktivitäten infizierter U87-Zellen – Infektionen und TCID₅₀-Reihen mit HIV-1 pseudotypierten. *

Verdünnungen	pNLucAM+pgp160 2 µl/4 µl, nicht filtriert		pNLucAM+pgp160 2 µl/4 µl, filtriert		pNLucAM+pgp160 2 µl/4 µl vorherige Transfektion	
	1:5	$2,9 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$
1:10	$4,5 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$
1:20	$7 \cdot 10^3$	$2,6 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^4$
1:40	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^4$
1:80	$1 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^4$
1:160	$3 \cdot 10^1$	$6 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^1$
1:320	$3 \cdot 10^1$	$4 \cdot 10^1$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^1$	$7 \cdot 10^3$
1:640	$5 \cdot 10^1$	$2 \cdot 10^1$	$5,7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^1$	$3 \cdot 10^1$

Verdünnung	pNLucAM/pgp160 2 µl/4 µl, nicht filtriert		pNLucAM/pgp160 2 µl/4 µl, filtriert		pNLucAM/pgp160 2 µl/4 µl vorherige Transfektion	
	1:50		$3,5 \cdot 10^4$		$5,6 \cdot 10^3$	
		$3 \cdot 10^4$		$1,6 \cdot 10^4$		$1,7 \cdot 10^4$
		$1,5 \cdot 10^3$		$7,5 \cdot 10^3$		$8,8 \cdot 10^3$
		$1 \cdot 10^4$		$5 \cdot 10^2$		$2 \cdot 10^3$
		$2 \cdot 10^4$		$4 \cdot 10^2$		$9,9 \cdot 10^2$
		$1 \cdot 10^4$		$2 \cdot 10^4$		$3 \cdot 10^3$
		$3 \cdot 10^4$		$1 \cdot 10^4$		$1 \cdot 10^4$
		$5,5 \cdot 10^4$		$1,8 \cdot 10^4$		$1,7 \cdot 10^3$

* Die Infektionen wurden in weißen, beschichteten 96-well-Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific, Nunc™, 137101) durchgeführt.

Tab. 14: Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – Infektionen mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln in Abhängigkeit von FCS.

pNLucAM/pHAD2, 7 μ l+23 μ l, 1:50

DMEM	$5,6 \cdot 10^4$	$7,7 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
mit FCS	$2,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^4$
DMEM	$6,5 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$	$6 \cdot 10^4$
ohne FCS	$1,9 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^4$	$9,7 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$7 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$

3.2.5 Einfluss der Zelldichte auf das Infektionsmodell

Bei zu hohen Zelldichten kann es zu Zellkontakthemmungen kommen. Dadurch kann die Zellteilung eingestellt und die Infektion beeinflusst werden. Demnach wurden VeroB4-Zellen in drei verschiedenen Zelldichten ausgesät. Die Zellen einer vollgewachsenen Zellkulturflasche (Sarstedt, 75 cm²) wurden mit 5 ml Trypsin/EDTA (Pan Biotech) für 10 min inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Wand der Flasche gelöst und in ein 50 ml Falcon (Sarstedt) überführt. Das Falcon wurde mit DMEM-Medium ohne weitere Zusätze aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 15 min abzentrifugiert (Beckmann Coulter Avanti J-26; Rotor JA-14). Nach dem Ersetzen des Überstands durch neues Medium erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die VeroB4-Zellen wurden in weiße, beschichtete Zellkulturplatten mit klarem Flachboden (Thermo Fisher Scientific) ausgesät, um das Zellwachstum nachvollziehen zu können. Die Infektion wurde mit einer 1:50-Verdünnung der partikelhaltigen Überstände durchgeführt. Es wurde erneut lediglich mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln infiziert.

Die Zellkulturplatte wurde für zwei Tage inkubiert (Haraeus, BBD 6220; 37°C und 5 % CO₂). Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden die klaren Böden mit einer weißen Folie verschlossen. Das Luciferase-Assay wurde mit Hilfe des Lyse-Puffers und des LAR-Substrats ausgeführt.

Die Messergebnisse des Luciferase-Assays bestätigen die angenommenen Zellkontakthemmungen bei zu hohen Zelldichten. Die Zelldichte 1 wurde so ausgesät, dass die 96-wells vollgewachsen waren, bei der Zelldichte 2 waren die Flächen zu ca. 85% adhärent bedeckt. Bei einer Zelldichte von ca. 70%, die bei der Zelldichte 3 ausgesät wurde, sind die Infektionsraten am gleichmäßigsten. Wie Tab. 15 zeigt, werden die Luciferase-Aktivitäten bei geringeren Zelldichten stabiler. Bei der Zelldichte 3 werden alle Aktivitäten im Bereich von 10⁴ RLU_s detektiert.

Die Leerwerte des Luciferase-Assays weisen leichte Schwankungen auf, befinden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von <130 relativen Lichteinheiten.

Das Ergebnis war ein Einfluss der Zelldichte auf das Infektionsmodell. Die Zelldichte von ca. 70 % ergaben die gleichmäßigsten Infektionsergebnisse. Der klare Boden der Zellkulturplatten ermöglicht eine Kontrolle der Zelldichten und des Zellwachstums.

Tab. 15: Luciferase-Aktivitäten infizierter VeroB4-Zellen – Infektionen mit DENV-2 pseudotypisierten Partikeln bei verschiedenen Zelldichten.

pNLlucAM/pHAD2, 8 μ l/37 μ l, 1:50

Zelldichte 1	$4 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
	$2 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$4 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^4$
Zelldichte 2 1:2	$8,6 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$
	$1 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$
Zelldichte 3 1:4	$1 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
	$9 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$	$8,7 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$

4 Diskussion

4.1 Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel

Pseudotypisierte Viruspartikel dienen zur Untersuchung von Virusinfektionen. Ein Vorteil ist, dass kein Virus-Wildtyp vorhanden sein muss. Amplifizierte DNA oder auch nur Sequenzdaten der Hüllproteine reichen aus, um sie rekombinant herzustellen. Ein weiterer Vorteil ist, dass nicht der vollständige Viruszyklus durchlaufen werden muss und somit nur der Viruseintritt (*single round infection*) beobachtet werden kann. Die von außen intakt aussehenden Viruspartikel tragen virale Hüllproteine, die sich von denen des eigentlichen, partikel-bildenden Virus unterscheiden. Im Genom des Virusvektors sind die homologen Hüllproteine deletiert. Die fremden, heterologen Hüllproteine werden in *trans* von einem zweiten Plasmid exprimiert. Anstelle des Gens für die Hüllproteine (*env*), enthält der Virusvektor ein Reporter-gen für z.B. das Enzym Luciferase. Dadurch kann der Viruseintritt sehr einfach gemessen werden. Mit dieser Methode lassen sich die Eigenschaften von Hüllproteinen, von verschiedenen natürlichen Virusvarianten, von Mutanten oder auch Chimären analysieren.

Mit diversen Hüllproteinen unterschiedlicher Virusklassen wurden pseudotypisierte HIV-1-Partikel erfolgreich eingeführt. Ein Infektionsmodell mit Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln konnte jedoch noch nicht etabliert werden. In der wissenschaftlichen Literatur wurde nur eine Arbeit publiziert, die sich mit kompletten DENV pseudotypisierten HIV-1-Partikeln befasst.²⁶ In dieser Arbeit wurde der Virusvektor NL4-3R^E verwendet der *env* und *vpr* negativ (*env*⁻, *vpr*⁻) ist. Das Reporter-gen ist in diesem Vektor anstelle des *nef* Gens inseriert. Daher ist dieser Vektor zusätzlich auch *nef* negativ (*nef*⁻). Mit diesem Vektor waren infektiöse Dengue-M/E Pseudotypen nicht reproduzierbar herzustellen. Im Zuge einer Dissertation wurde das lentivirale System verbessert.¹⁴ Entgegengesetzt zu der von Hu *et al.* (2007) veröffentlichten Methode, konnte durch die Forschung von Auerswald (2016) der pNLlucAM-Vektor als optimaler Vektor für das System ermittelt werden. Dieser Vektor exprimiert die akzessorischen Faktoren Nef und R und ist somit *nef*⁺ und *vpr*⁺.^{14,26} Das Luciferase-Reporter-gen ersetzt in diesem Vektor das *env* Gen und ist unabhängig von der Regulation des HIV-1 unter der Kontrolle des SV40 Promotors. Unter Verwendung des pNLlucAM Vektors war es möglich, reproduzierbar infektiöse Dengue M/E Pseudotypen zu produzieren, wenn auch in kleinen Mengen. So reichen die gebildeten Partikel-Mengen aus einer 6-well-Transfektion für ca. 15-20 Infektions-experimente (im 96-well Format). Mit einer solchen Transfektion ist es daher nicht möglich, z.B. eine TCID₅₀ zu bestimmen.

Für eine TCID₅₀-Bestimmung müssen mindestens 4x12 Infektionsexperimente (im 96-well-Format) durchgeführt werden.

Bei den Vorarbeiten von Auerswald (2016) war die Co-Transfektion der beiden Plasmide, Virusvektor und Hüllproteinvektor, mithilfe des Luziferase-Reproterenzym kontrolliert und auch optimiert worden. Auerswald (2016) verfolgte die Annahme, dass bei hohen Luciferasewerten auch die Co-Transfektion für die Viruspartikel-Bildung am optimalsten ist. Dies entspricht auch den Vorgehensweisen in der Literatur in Zusammenhang mit der Transfektionen von eukaryotischen Zellen. In dieser Arbeit wurde allerdings dieser indirekte Ansatz zur Kontrolle der Co-Transfektionen verworfen und durch einen direkten Ansatz ersetzt. Die Co-Transfektionen wurden zwar auch anhand der Luciferaseaktivität überprüft. Zusätzlich wurden aber auch gleichzeitig die infektiösen Titer in den Zellkulturüberständen der co-transfizierten Zellen gemessen. Der Ansatz, die Plasmid-DNA-Mengen bei der Co-Transfektion erheblich zu steigern, erwies sich als hilfreich. Durch den Einsatz steigender Plasmid-Mengen wurden zwar sinkende Transfektionsergebnisse in Bezug auf die Luciferaseaktivität gemessen, dennoch beobachtete man eine stark gestiegene Infektionseffizienz der Dengue M/E pseudotypisierten Viruspartikel.

Daran sieht man, dass nur die direkte Kontrolle der infektiösen Titer in den Zellkulturüberständen die Bildung pseudotypisierter Partikel quantitativ nachweisen konnte. Der indirekte Ansatz zur Kontrolle der Co-Transfektionen führt zu falschen Rückschlüssen.

In dieser Arbeit wurden Plasmid-Gesamt mengen zwischen 6 µg und 60 µg transfiziert. Die höchsten Transfektionsergebnisse wurden bei der geringsten DNA-Menge von 6 µg gemessen. Die lysierten, transfizierten HEK293T-Zellen zeigten Luciferase-Aktivitäten bis 10⁹ RLUs. Mit steigenden DNA-Mengen sanken die Messwerte bis auf 10⁵ RLUs. In den Vorarbeiten von Auerswald (2016) wurden die Luciferase-Aktivitäten der transfizierten Zellen mit dem Vektorplasmid und den DENV-Hüllproteinplasmiden nicht gemessen, sodass die Transfektionsergebnisse nicht verglichen werden konnten.

In Form partikelhaltiger Überstände wurden eukaryotische Zellen mit den Pseudotypen infiziert. Bei den Infektionsergebnissen wurde eine umgekehrte Entwicklung im Gegensatz zu den Transfektionsergebnissen gemessen. Die höchsten Ergebnisse infolge der Infektion mit den Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln wurden durch Partikel mit 45 µg transfizierter Plasmid-Menge gemessen. Dies entspricht einem molaren Verhältnis von 1:14 HIV-1-Vektorplasmid zu Hüllproteinplasmid. Die lysierten, infizierten VeroB4-Zellen zeigten Luciferase-Aktivitäten bis 2·10⁵ RLUs. Bei höheren Plasmid-Mengen sanken die Luciferase-Aktivitäten wieder.

Bei niedrigeren Plasmid-Mengen war ein Abfall der Luciferase-Aktivitäten bis zu 10^2 RLU zu messen. In den Vorarbeiten von Auerswald (2016) wurden lediglich 2 μ l Plasmid-DNA transfiziert. Mit den partikelhaltigen Überständen wurden eukaryotische Zellen infiziert und auf ihre Luciferase-Aktivität getestet. Es wurden Luciferase-Aktivitäten bis zu 10^5 RLU gemessen. Diese Werte überschneiden sich mit den in dieser Arbeit gemessenen Luciferase-Aktivitäten. Allerdings ist die Infektiosität der partikelhaltigen Überstände dieser Arbeit deutlich höher, sodass etwa 3000 Infektionsexperimente (im *96-well* Format) mit einer Transfektion in *6-well*-Zellkulturplatten durchgeführt werden können, anstatt 15-20. Zusätzlich wurden die Überstände in dieser Arbeit für die Infektionen 1:5 verdünnt. Dennoch konnten diese hohen Luciferase-Aktivitäten für die infektiösen Pseudotypen gemessen werden.

Aufgrund der hohen Titer wurden die pseudotypisierten Partikel nicht durch Ultrazentrifugationsverfahren wie Differentialzentrifugation aufgereinigt und weiter aufkonzentriert (Vgl. ²⁹), sodass keine zusätzlichen Reinigungsschritte nötig waren.

Eine Erklärung für das Phänomen des umgekehrten Zusammenhangs der Transfektions- und Infektionsergebnisse wäre, dass bei der Plasmid-Co-Transfektion ein Limit überschritten werden muss, um genügend virales Genom zu erzeugen, welches auch in Partikel verpackt werden kann. Gleichzeitig muss auch ein Überschuss an M/E Hüllprotein produziert werden, was sich in die äußere Zellmembran integrieren kann. Infolge einer ansteigenden Partikelproduktion bleibt weniger Vektor-Plasmid in den HEK293T-Zellen zurück, wodurch sich die Aktivität für das Enzym Luciferase verringert. Als optimaler Wert für die Co-Transfektion hat sich in dieser Arbeit die transfizierte Plasmid-Gesamtmenge von 45 μ l bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen in *6-well*-Zellkulturplatten erwiesen. Dies entsprach einer Fläche von 8,87 cm^2 .

Insgesamt betrachtet wurde das Dengue-M/E Pseudotypen-System um den Faktor 100-200 optimiert und seine Ausbeute verbessert.

4.2 Verbesserung des Infektionsmodells

Während der Infektion mit den partikelhaltigen Zellkulturüberständen binden die Hüllproteinen der Partikel an kompatible zelluläre Rezeptoren eukaryotischer Zellen und können dadurch mit der Zellmembran verschmelzen. Wie bei klassischen Infektionen wird das virale Genom in die eukaryotischen Zellen eingebracht.^{15,16,17,18} Ziel eines solchen Systems ist es z.B. Seren von Dengue infizierten Personen auf neutralisierende Antikörper zu untersuchen. Damit kann man den anti-Dengue Immunstatus von Patienten genauer analysieren. Die Bindung von Antikörpern an ein Antigen, wie es in der diagnostischen Routine durchgeführt wird, sagt nichts aus über die neutralisierende Aktivität, den Schutz, den ein Patient gegen das Denguevirus entwickelt hat, aus.

Dafür sind Dengue-Neutralisationstests eine wichtige Methode. Pseudotypisierte Viren fallen außerdem in die Sicherheitsstufe BSL2 und können daher in jedem diagnostischen Labor durchgeführt werden. Arbeiten mit Dengueviren, die normal replizieren, fallen dagegen unter die Sicherheitsstufe BSL3.

Für diagnostische Neutralisationsstudien wird in *96-well*-Mikrotiterplatten gearbeitet. Die bisherigen Arbeiten orientierten sich an Methoden zu HIV-1. Mit Dengue M/E Pseudotypen im *96-well* Format gab es bisher keine genauen Daten zur Durchführung von Infektionsstudien.

In der Arbeit stellte sich heraus, dass es bei der Adaption an das *96-well* Format Schwierigkeiten mit der Reproduktion der Infektionen gab. Obwohl in der Mehrzahl der *96-wells* Infektionen gemessen wurden, schwankten die Werte stark und es wurden sogar vereinzelt Nullwerte beobachtet.

Grund war zum einen die Methode der Lysis. Die in der Literatur beschriebene Methode bei HIV-1 permissiven Zellen funktionierte mit dem Luciferase-Substrat (Bright-Glow, Promega) nicht einwandfrei. Dieses zeitlich stabile Kombinations-Substrat, das die Lyse beinhaltet, zeigte Schwankungen bei den Messungen. Man muss davon ausgehen, dass nur bei vollständiger Lyse gleichmäßige Luciferase-Werte detektiert werden können. Die Verwendung einer Methode bei der Lyse- und Substratreaktion getrennt durchgeführt wurden (LAR Substrat), war erfolgreicher. Hier tritt allerdings das Problem der Zellverschleppung auf, was auch zu Schwankungen bei den Messungen führen kann. Die geeignetste Methode ist die Methode mit dem LAR-Substrat. Hiermit wurden in dieser Arbeit die hohen und stabilen Infektionswerte gemessen. Für zukünftige Arbeiten wäre es eventuell von Bedeutung, das Luciferase-Reportergen gegen eine Konstruktion auszutauschen bei der das Enzym in den Zellkulturüberstand segregiert wird. Dafür müsste allerdings der Virusvektor umgebaut werden.

Zum anderen stellte sich heraus, dass die Zelldichte einen starken Einfluss auf die Messungen hatte. Aus den Infektionsexperimenten in dieser Arbeit geht hervor, dass bei einer etwas geringeren Zelldichte von ca. 70% die größte Stabilität des Infektionsmodells erreicht wird, da die Zellen während der zweitägigen Inkubation sich weiter teilen und die 96-wells zunehmend bedecken. Mit der geringeren Zelldichte konnte gewährleistet werden, dass eine komplette Konfluenz verhindert wurde.

Es wurden diverse mögliche Einwirkungen auf die Infektionen erwogen und dessen Wirkung untersucht. Den größten Einfluss spielen die eukaryotischen Zelllinien und deren Dichte in den 96-well-Platten. Durch die Wahl der richtigen Zellkulturplatten muss während der gesamten Infektion eine vollständige Adhärenz der Zellen am Boden der Kavitäten gewährleistet sein. Eine Konfluenz der Zellen kann außerdem zu einer Zellkontakthemmung führen.

Dadurch wird die Zellteilungsrate vermindert bzw. verhindert. Infolge eingeschränkter Zellteilung wird auch der Zellmetabolismus reduziert, wodurch auch der Infektionsprozess eingeschränkt wird.^{27,28} Die geringere Zelldichte hatte wahrscheinlich auch einen positiven Einfluss auf die Lyse des Zellrasens und damit auf die Messung der Luciferase-Aktivität.

4.3 Bedeutung des Infektionsmodells für Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel

Die Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1 Partikel ermöglichen nicht nur die genauere Untersuchung der Funktion der Hüllproteine sowie der Interaktionen zwischen dem Virus und der humoralen Immunantwort, oder die Quantifizierung des Viruseintritts in eukaryotische Zellen und dessen Inhibition. Mithilfe der umhüllten pseudotypisierten Partikel können außerdem auch ELISA-Tests durchgeführt werden und die Pseudotypen können die klassischen Dengueviren in Neutralisationstest (NT) ersetzen. Der Neutralisationstest eignet sich besonders gut, um die neutralisierende Immunantwort gegen die verschiedenen DENV-Serotypen zu bestimmen. Das Testen der serotyp-spezifischen Immunantwort wird normalerweise mit Dengueviren im BSL3 Labor durchgeführt. Die Dengueviren stammen zum Teil aus unterschiedlichen Regionen und werden bevorzugt nach den vier Gruppen DENV1, -2, -3 und -4 eingeteilt und verwendet. Bisher stand diese Serotypen-Einteilung im Vordergrund. Allerdings unterscheiden sich Dengueviren auch innerhalb der Serotypen-Gruppe. Daher ist es von Vorteil, den Immunstatus von Patienten, die induzierte DENV neutralisierende Antikörperantwort mit den Viren zu untersuchen die auch in den Regionen vorkommen, in denen die Patienten leben. Dies

ist mit dem Pseudotypensystem möglich, da man nicht auf isolierte Dengueviren sondern nur auf Sequenzdaten angewiesen ist.

Durch das Testen von Patientenisolaten kann mittels des NTs die Neutralisationsprävalenz des Serums und folglich dessen DENV-Serotyp quantifiziert werden. Ein solcher Serotyp-Nachweis kann zum Beispiel bei Impfkandidaten eingesetzt werden.

Das Unternehmen Sanofi Pasteur Ltd. entwickelte einen tetravalenten und rekombinanten Lebendimpfstoff gegen das Denguevirus.^{22,23,24,25} Der Impfstoff Denvaxia® (CYD-TDV) ist das erste DENV-Vakzin, das zugelassen wurde. Dennoch empfiehlt die WHO eine Einführung des Impfstoffs nur in Gebieten mit hohen DENV Infektionsraten. Allerdings ist die Effektivität des Vakzins stark vom Alter der Impfkandidaten abhängig.^{22,25} Bei Erwachsenen wurde eine Verbesserung von ca 35-50% beobachtet. Bei Kindern war das aber erstaunlicherweise nicht so. Es wurde gezeigt, dass in der Gruppe der Kinder < 9 Jahren das Risiko, eine Dengueinfektion zu bekommen nach einer Impfung steigt. Das könnte damit zusammenhängen, dass Erwachsene schon öfters Kontakt mit Dengueviren hatten und die Vakzine eine bestehende Immunantwort verstärkt aber nicht neu initiiert. Damit wäre es eine Verstärkung der durch natürliche Infektionen entstandenen Immunantwort. Bei Kindern könnte es sein, dass sie noch nicht diese Immunantwort entwickelt haben. Die Vakzine initiiert nun eine Vakzine-spezifische Immunantwort, die nicht zu den Viren passt, die in der Gegend der Patienten endemisch sind. Die Antikörper-vermittelte-Verstärkung einer Infektion (ADE, *antibody dependent enhancing*) könnte so zu einem erhöhten Risiko bei Dengue naiven Personen, Kindern < 9 Jahre, führen. Hier könnte das Dengue M/E Pseudotypensystem helfen. Es könnte den Immunstatus der zu impfenden Personen bestimmen und die Impfgruppe würde nicht nach ihrem Alter, sondern nach ihrem anti-Dengue Immunstatus zusammengesetzt. Auch würde es sich eignen, den Impferfolg genauer zu analysieren. Durch die Analyse der Serologie und die zusätzliche Abgrenzung des Serotyps durch das Infektionsmodell mit Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln könnte einen gezielteren Einsatz des DENV Impfstoffs CYD-TDV begünstigt werden. Zusätzlich könnte das Vakzin erweitert werden, sodass der tetravalente Impfstoff in die vier Serotypen aufgespalten wird und somit noch bestimmter immunisiert werden kann und die Nebenwirkungen sowie kreuzweise auftretende Immunverstärkungen weiter reduziert werden.

Die umhüllten pseudotypisierten Partikel bieten viele Vorteile im Gegensatz zu den klassischen Dengueviren. Die Pseudotypen können innerhalb von zwei Tagen hergestellt werden und benötigen demnach nur ein Drittel der Zeit für deren Kultivierung im Unterschied zu normalen Dengueviren. Außerdem besteht durch die Infektionseigenschaften (*single round infection*) der pseudotypisierten Partikel ein deutlich reduzierteres Infektionsrisiko beim Umgang mit den Viruspartikeln. Das Pseudotypen-System kann durch die verschiedenen Hüllproteine beliebig modifiziert, angepasst und spezifiziert werden. Besonders hinsichtlich der vier Serotypen können die Transfektionen einzeln optimiert werden. Die Infektionen eukaryotischer Zellen mit partikelhaltigen Überständen erreichen zudem ähnlich hohe Virustiter, wie die Infektionen mit Virusüberständen (Vgl. ¹⁴).

Aufgrund der Bedeutung der Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln ist es sehr aussichtsreich, ein solches Infektionsmodell weiterzuführen. Im weiteren Verlauf sollten die Co-Transfektionen zur Herstellung der Partikelüberstände mit allen vier Serotypen in 6-well-Zellkulturplatten durchgeführt werden. Mit den partikelhaltigen Überständen sollten mit den in dieser Arbeit beschriebenen Optimierungen stabile Infektionsraten beobachtet werden. Dadurch können die pseudotypisierten Partikel in Zukunft für Neutralisationstests verwendet werden. Um die Perspektiven der Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1-Partikel hinreichend validieren zu können, sollten Patientenseren, die mit klassischen Virusüberständen im Zuge des NTs untersucht wurden, mit den partikelhaltigen Überständen in Kontrollexperimenten getestet werden. Bei deckungsgleichen und übereinstimmenden Ergebnissen kann das Pseudotypen-System die normalen Virusneutralisationstests ersetzen.

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel mit den Hüllproteinen aller DENV Serotypen hergestellt. Dies erfolgte mit Hilfe von jeweils zwei Plasmiden. Ein Plasmid codiert für das Virusgenom (pNLlucAM), das andere Plasmid codiert für die M/E-Hüllproteine des entsprechenden DENV. Um die Menge der infektiösen Titer von M/E-Pseudotypen zu steigern, wurde die Luciferase-Aktivität der co-transfizierten HEK293T-Zellen gemessen. Zusätzlich wurden die partikelhaltigen Zellkultur-überstände auf Infektiosität der Pseudotypen getestet. Ergebnis war ein umgekehrter Zusammenhang. Bei Steigerung der Menge an Plasmid-DNA bei der Transfektion ging die Luciferase-Aktivität in den transfizierten HEK291T-Zellen zurück, während die Infektiosität der Partikel anstieg. Der Schwellenwert für die DNA-Menge war bei 45 µg Plasmid-DNA im molaren Verhältnis 1:14 von Virusvektor zu M/E-Expressionsvektor. Die 45 µg Plasmid-DNA bezog sich auf $5 \cdot 10^6$ Zellen in einem 6-well, was einer Fläche von etwa 9 cm² entsprach. Bei einer transfizierten Plasmid-Menge über 45 µg wurden abnehmende Pseudotypen-Titer gemessen. Bei geringeren Plasmid-Mengen sank die Infektiosität um den Faktor 100. Demnach wurde die transfizierte DNA-Menge gegenüber dem Incella Transfektionsprotokoll und vorherigen Arbeiten um das 17,5-fache gesteigert. In den Kontrollexperimenten mit HIV-1 pseudotypisierten HIV-1-Partikeln hingegen wurden die höchsten Infektiositäten der partikelhaltigen Überstände bei geringen Plasmid-Mengen gemessen, wodurch sich die Resultate konkret auf Dengue-M/E pseudotypisierten HIV-1 Partikel beziehen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss der Partikelfiltration, des FCS und der Zelldichte auf die Infektion untersucht, um das Infektionsmodell zu verbessern. Die größte Bedeutung für die Infektionen zeigten die Zelldichten der DENV permissiven VeroB4-Zelllinie. Bei zu hohen Zelldichten trat eine Zellkontakthemmung auf, welche die Infektion einschränkte und selektiv auch inhibierte. Ergebnis war eine optimale Zelldichte von etwa 70% zum Zeitpunkt der Infektion, um gleichmäßig Infektionsraten zu erzielen. Im dritten Teil der Arbeit wurden die Transfektions-Ausbeuten durch TCID₅₀-Bestimmungen quantifiziert. Die infektiöse Dosis DENV-2 pseudotypisierter HIV-1-Partikel entsprach einer Verdünnung von 1:100. Demnach können mit einer Transfektion in 6-well-Platten etwa 3000 Infektionsexperimente (im 96-well-Format) durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigten eine Steigerung der Infektiosität der partikelhaltigen Zellkulturüberstände um das 150-fache im Gegensatz zu vorherigen Arbeiten. Daher konnten durch die gesteigerten transfizierten Plasmid-Mengen deutlich mehr Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel gebildet werden.

5.1 Summary

In the first part of this study dengue-M/E pseudotyped HIV-1 particles with the envelope proteins of all four DENV serotypes were produced. The particles were made using two plasmids. One plasmid encodes the viral HIV-1 (*env⁻ Luc⁺*) genome (pNLlucAM) while the other plasmid encodes for example the DENV-1-M/E envelope proteins, respectively. To increase the amount of the infectious titers of M/E pseudotypes the luciferase activity of the co-transfected HEK293T cells were measured. Additionally, the infectiosity of the cell culture supernatant containing the particles was tested by VeroB4 infection. The outcome was a reversed correlation. With the increase of transfected plasmid DNA the luciferase activity in the transfected HEK293T cells decreased, whereas the infectiosity of the pseudotyped particles increased. The threshold of the DNA amount was 45 µg plasmid DNA with a molar ratio of 1:14 of viral vector to M/E expression vector. The 45 µg plasmid DNA referred to $5 \cdot 10^6$ cells in the 6-well-cell culture plate which is equivalent to a surface of approximately 9 cm². At a transfected amount of plasmid above 45 µg decreasing infectiosities were detected. At a lower amount of plasmid the infectiosity decreased by a factor of 100. Thus, the transfected amount of DNA was 17,5-fold higher compared to the Incella transfection protocol and previous studies. During the control experiments with HIV-1 pseudotyped HIV-1 particles however the slightest amounts of plasmid DNA resulted in the highest infeciosities of the cell culture supernatant containing the particles. Therefore these results are highly specific for the generation of dengue-M/E pseudotyped HIV-particles.

In the second part of this study the impact of particle filtration, FCS concentration and the cell density on VeroB4 infections were determined to improve the pseudotype infection model. The disseminated cells showed the major significance. At excessive cell densities a cell contact inhibition occurred which restricted and selectively inhibited the infections. The result was an ideal cell density of approximately 70% at the time of the infection to detect consistent infection rates.

In the third part of this study the yields of the transfections were quantified by a TCID₅₀ assay. The infectious dose of DENV-2 pseudotyped HIV-1 particles equated to a dilution of 1:100. Thus, about 3000 infection experiments (in 96-well) can be performed with supernatants transfected in 6-well-cell cultures. The results showed a general 150-fold increase of the infectiosity of the cell culture supernatant containing the particles compared to previous studies. Therefore significantly more dengue-M/E pseudotyped HIV-1 particles were generated by the optimized protocol for pseudotype generation, presented in this study.

6 Literaturverzeichnis

1. Sanders, D. A. No false start for novel pseudotyped vectors. *Current Opinion in Biotechnology* **13**(5), 437-442 (2002).
2. Hachiya, A., Sriwiriyanont, P., Patel, A., Saito, N., Ohuchi, A., Kitahara, T., Takema, Y., Tsuboi, R., Boissy, R.E., Visscher, M.O., Wilson, J.M., Kobinger, G.P. Gene transfer in human skin with different pseudotyped HIV-based vectors. *Gene Therapy* **14**, 648-656 (2007).
3. Cronin, J., Zhang, X.-Y., Reiser, J. Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Curr Gene Ther* **5**(4), 387-398 (2005).
4. Strang, B.L., Takeuchi, Y., Relander, T., Richter, J., Bailey, R., Sanders, D.A., Collins, M.K., Ikeda Y. Human immunodeficiency virus type 1 vectors with alphavirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells. *Journal of Virology* **79**(3), 1765-1771 (2005).
5. Kutner, R.H., Zhang, X.-Y., Reisner, J. Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nature Protocols* **4**(4), 495-505 (2009).
6. Perletti, G., Osti, D., Marras, E., Tettamanti, G., de Eguileor, M. Generation of VSV-G pseudotyped lentiviral particles in 293T cells. *J Cell Mol Med* **8**(1), 142-143 (2004).
7. Doerr, H. W., Gerlich, W. H. Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. *Georg Thieme Verlag* **2. Auflage**, 87-94 (2010).
8. McMahon, M. A., Shen, L., Siliciano, R. F. New Approaches for Quantitating the Inhibition of HIV-1 Replication by Antiviral Drugs *in vitro* and *in vivo*. *Curr Opin Infect Dis* **22**(6), 574-582 (2009).
9. Templeton, N. S. Gene and Cell Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies. *CRC Press* **4. Auflage**, 4-24 (2015).
10. Kim, T. K., Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* **397**(8), 3173-3178 (2010).
11. Xie, Z.L., Shao, S.L., Lv, J.W., Wang, C.H., Yuan, C.Z., Zhang, W.W., Xu, X.J. Co-transfection and tandem transfection of HEK293A cells for overexpression and RNAi experiments. *Cell Biol Int* **35**(3), 187-192 (2011).
12. Doerr, H. W., Gerlich W. H. Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. *Georg Thieme Verlag* **2. Auflage**, 315-334 (2010).
13. Munk, K. Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag*, 125-128 (2008).
14. Auerswald, H. Analyse der humoralen, neutralisierenden Immunantwort nach natürlichen Infektionen mit Dengueviren. Dissertation. Universität Hamburg (2016).

15. Shapshak, P., Sinnott, J. T., Sumboonwit, C., Kuhn, J. H. Global Virology I. Identifying and Investigating Viral Diseases. *Springer-Verlag*, 403-418 (2010).
16. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H. Molekulare Virologie. *Spektrum Akademischer Verlag* **3. Auflage**, 196-224 (2010).
17. Heinz, F. X., Stiasny, K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* **30**(29), 4301-4306 (2012).
18. Doerr, H. W., Gerlich W. H. Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. *Georg Thieme Verlag* **2. Auflage**, 380-401 (2010).
19. Sauerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.-D., Kaufmann, S. H. E., Schulz, T. F. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Springer-Verlag* **7. Auflage**, 463-468 (2012).
20. Neumeiser, B., Geiss, H. K., Braun, R. W., Kimmig, P. Mikrobiologische Diagnostik. Bakteriologie-Mykologie-Virologie-Parasitologie. *Georg Thieme Verlag* **2. Auflage**, 895-896 (2009).
21. Schmitz, H. Dengue-Fieber. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **42**(5), 408-410 (1999).
22. World Health Organization. Dengue vaccine: WHO position paper - July 2016. *Weekly epidemiological record* **30**(91), 349-364 (2016).
23. Guy, B., Saville, M., Lang, J. Development of Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Human Vaccines* **6**(9), 696-705 (2010).
24. Guy, B., Briand, O., Lang, J., Saville, M., Jackson, N. Development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine: One more step forward. *Vaccine* **33**(59), 7100-7111 (2015).
25. Ferguson, N. M., Rodríguez-Barraquer, I., Dorigatti, I., Mier-y-Teran-Romeo, L., Laydon, D. J., Cummings, D. A. T. Benefits and risks of the Sanofi-Pasteur Dengue vaccine: Modeling optimal deployment. *Science* **353**(6303), 1033-1036 (2016).
26. Hu, H.-P., Hsieh, S.-C., King, C.-C., Wang, W.-K. Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. *Virology* **368**, 376-387 (2007).
27. Sun, P. Contact inhibition against senescence. *Oncotarget* **5**(17), 7212-7213 (2014).
28. Stoker, M. G. P., Rubin, H. Density Dependent Inhibition of Cell Growth in Culture. *Nature* **215**, 171-172 (1967).
29. Herrera, C. Klasse, P. J., Kibler, K. W., Michael, E., Moore, J. P., Beddows, S. Dominant-negative effect of hetero-oligomerization on the function of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex. *Virology* **351**(1), 121-132 (2006)

Danksagung

Dr. Michael Schreiber danke ich aufrichtig für das Ermöglichen dieser Arbeit, die Aufnahme in seine Laborgruppe und die Vergabe des spannenden Themas. Zusätzlich möchte ich mich für die aufmerksame und engagierte Betreuung sowie für die Übernahme als Zweitgutachter bedanken. Durch unermüdliche Erklärungen, Raum für eigenständiges Arbeiten und die Blickwinkel auf neue Lösungsansätze, konnte ich mich deutlich weiterentwickeln und meine Kenntnisse erweitern.

Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker für die Betreuung der Bachelorarbeit als Erstgutachter. Trotz der vielen Verpflichtungen als Präsident der HAW sowie als Professor und der daraus resultierenden limitierten Zeit konnte ich durch den Erhalt einer sehr entgegenkommenden Unterstützung alle Fragen und Schwierigkeiten schnell klären und erfolgreich arbeiten.

Für die anfängliche Einarbeitung und die freundliche Hilfe bei Problemen im Labor bedanke ich mich bei Kerstin Krausz. Mit ihr und der studentischen Hilfskraft Julian Leefmann entstanden immer nette Gespräche in der Laborgruppe, die den Laboralltag vereinfacht und zu einer angenehmen Laboratmosphäre beigetragen haben.

Meine tiefste Verbundenheit widme ich meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meiner Schwester, die mich während meines Studiums durchgängig unterstützt, bei diversen Zweifeln ermutigt und auch mal vom Stress abgelenkt haben.

II Anhang

A Ergebnisse der 2. Transfektion HIV-1 pseudotypisierter HIV-1-Partikel

DNA-Verhältnis *	pNLlucAM/pgp160		pNLlucAM		pgp160	
	2 µl+4 µl		2 µl		2 µl	
Luciferase-Aktivität [RLU]	filtriert	nicht filtriert	filtriert	nicht filtriert	filtriert	nicht filtriert
	$2 \cdot 10^9$	$1,9 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$4,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$

* zusammengesetzt aus Vektor- und Hüll-Expressionsplasmiden, 1 µg/µl

B prM/E-Sequenzen der DENV-Hüllplasmide

pcBD1

CTCTCTGGCTACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCCT
GTCTGTGACCATGCTCCTTATGCTGCTGCCACAGCCCTGGCGTTCCATCTGACGACA
CGAGGGGGAGAGCCGCACATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGTCACTTTT
GTTCAAGACCTCTGTAGGTGTCAACATGTGCACCCTTATTGCGATGGATCTGGGAGA
GTTGTGTGAGGACACAATGACCTACAAATGCCCCCGGATCACTGAGGCGGAACCAG
ATGATGTTGACTGTTGGTGCAATGCCACGGACACATGGGTGACCTATGGAACGTGTT
TTCAAACCTGGCGAACACCGACGAGACAAACGTTCCGTCGCATTGGCCCCACACGTGG
GGCTTGGCCTAGAAACAAGAGCCGAAACATGGATGTCCTCTGAAGGCGCTTGGAAA
CAGATACAAAAGTAGAGACTTGGGCTCTGAGACACCCAGGATTCACGGTGATAGC
CCTTTTCTAGCACATGCCATAGGAACATCCATCACCCAGAAAGGGATCATTTTTATT
TTGCTGATGCTGGTAACACCATCTATGGCCATGCGATGCGTGGAATAGGCAACAGA
GACTTTGTGGAAGGACTGTCAGGAGCAACATGGGTGGATGTGGTACTGGAGCATGG
AAGTTGCGTCACCACCATGGCAAAAATAAACCAACACTGGACATTGAACTCTTGAA
GACGGAGGTCACAAACCCTGCAGTTCTGCGTAAACTGTGTATTGAAGCTAAAATATC
AAACACAACCACCGATTCGAGATGTCCAACACAAGGAGAAGCCACACTGGTGGAAG
AACAGGACGCGAACTTTGTGTGCCGACGAACGTTTCGT

pHAD2

CTCTCTGGCTACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCTCTAGAGCCG
CCGCCATGGCAGGCATGATCATTATGCTGATTCCAACAGTGGCGTTCATCTAACCA
CACGTAACGGAGAACCACACATGATCGTCAGTATAACAAGAGAAAGGGAAAAGTCTT
CTGTTTAAAACAGAGGATGGCGTGAACATGTGCACCCTCATGGCCATGGACCTTGGT
GAATTGTGTGAAGACACAATCACGTACAAGTGTCCCCTTCTCAGGCAGAATGAGCCA
GAAGACATAGACTGTTGGTGCAACTCCACGTCCACGTGGGTAACCTATGGGACTTGT
ACCACCACGGGAGAACATAGAAGAGAAAAAAGATCAGTGGCACTCGTTCACATGT
GGGAATGGGACTGGAGACGCGAACCGAAACATGGATGTCATCAGAAGGGGCTTGGGA
AACATGCCCAGAGAATTGAAACTTGGATCCTGAGACATCCAGGCTTCACCATAATGG
CAGCAATCTTGGCATAACCCATAGGGACGACACATTTCCAGAGAGCCCTGATTTTCA
TCCTACTGACAGCTGTCGCTCCTTCAATGACAATGCGTTGCATAGGAATATCAAATA
GAGACTTTGTAGAAGGGGTTTCAGGAGGAAGCTGGGTTGACATAGTCTTAGAACATG
GAAGCTGTGTGACGACGATGGCAAAAAACAAACCAACATTGGATTTTGAAGTATA
AAAGCGGAA GCCAAACAGCCTGCCACCCTAAGGAAGTACTG

pHAD3

CTCTCTGGCTACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGCCA
TGACATCGTTCTGTCTCATGATGATGTTACCAGCAACACTTGCTTTCCACTTAACTTC
ACGAGATGGAGAGCCGCGCATGATTGTGGGGAAGAATGAAAGAGGAAAATCCCTAC
TTTTTAAGACAGCCTCTGGAATCAACATGTGCACACTCATAGCCATGGATTTGGGAG
AGATGTGTGATGACACGGTCACTTACAAATGCCCCACATTACCGAAGTGGAGCCTG
AAGACATTGACTGCTGGTGCAACCTTACATCGACATGGGTGACTTATGGAACATGCA
ATCAAGCTGGAGAGCATAGACGCGATAAGAGATCAGTGGCGTTAGCTCCCCATGTC
GGCATGGGACTGGACACACGCACTCAAACCTGGATGTTCGGCTGAAGGAGCTTGGAG
ACAAGTCGAGAAGGTAGAGACATGGGCCCTTAGGCACCCAGGGTTCACCATACTAG
CCCTATTTCTTGCCATTACATAGGCACTTCCTTGACCCAGAAAGTGGTTGTTTTTGT
ACTATTAATGCTGGTTACCCCATCCATGACAATGAGATGTGTGGGAGTAGGAAACAG
AGATTTTGTGGAAGGCCTATCGGGA GCTACGTGGGTTGACGTGGTGCTC

pHAD4

CTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTC
ACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGCCGCCGC
CATGACGATAACATTGCTGTGCTTGATTCCCACCGTAATGGCGTTTCACTTGTCAACA
AGAGATGGCGAACCCCTTATGATAGTGGCAAAACACGAAAGGGGGAGACCTCTCTT
GTTTAAGACAACAGAGGGAATCAACAAATGCACTCTTATTGCCATGGACCTGGGTGA
AATGTGTGAGGACACCGTCACGTATGAATGCCCTCCACTGGTCAATGCCGAACCTGA
GGACATTGATTGCTGGTGCAATCTCACGTCTGCCTGGGTGCATGTATGGGACATGCAC
TCAGAGTGGGGAACGGAGACGGGAGAAGCGCTCAGTAGCCCTAACACCACATTCAG
GAATGGGATTGGAGACAAGGGCTGAGACATGGATGTCATCGGAAGGGGCTTGGAAA
CATGCTCAGAGGGTAGAGAGTTGGATACTCAGAAACCCAGGATTCGCTCTCTTGGCA
GGATTTATGGCCTATATGATTGGGCAAACAGGAATCCAGCGAACAGTCTTCTTTGTT
CTAATGATGCTGGTCGCCCCATCCTACGGAATGCGATGCGTGGGAGTGGGGAACAG
AGACTTTGTGGAAGGAGTCTCAGGTGGAGCATGGGTTCGATTTGGTGCTAGAACATGG
AGGATGTGTCACAACCATGGCCCAGGGAAAACCAACCTTGGATTTTGAACCTGATCAA
GACAACAGCCAAGGAAGTGGCTCTGTTAAGAACCTATTGCATTGAAGCCTCGATATC
AAACATAACCACGGCAACAAGATGTCCAACGCAAGGAGAACCTTATCTCAAAGAGG
AACAAGATCAACAGTACATTTGCCGG