



BERNHARD-NOCHT-INSTITUT
FÜR TROPENMEDIZIN



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Hamburg University of Applied Sciences

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Darstellung und Untersuchung von ZIKV-prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln

Masterarbeit

im Studiengang Pharmaceutical Biotechnology

vorgelegt von

Patrycja Kadlubowska



Hamburg, 03. September 2018

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

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Claus-Dieter Wacker (HAW Hamburg)
- 2. Gutachter:** Dr. Michael Schreiber (BNITM Hamburg)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Masterarbeit unterstützt und motiviert haben.

Dr. Michael Schreiber danke ich aufrichtig für das Ermöglichen dieser Arbeit und das Bereitstellen des interessanten Themas. Insbesondere möchte ich mich für die konstruktiven Gespräche während der Betreuung und den Freiraum für ein eigenständiges Arbeiten bedanken.

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

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitgliedern der Laborgruppe für die freundliche Unterstützung bedanken. Kerstin Krausz danke ich für die anfängliche Einarbeitung und die Hilfe bei Problemen im Labor. Ganz speziell möchte ich auch Maibritt Kretschmer für ihre Unterstützung besonders bei fachlichen Fragestellungen danken. Für die Materialproben zur Zikavirusklonierung bedanke ich mich recht herzlich bei Heidi Auerswald und Toni Rieger vom EVAg-Programm.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben, gilt mein großer Dank.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund für seine bedingungslose Liebe und hilfreiche Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Pseudotypisierte Viruspartikel	1
1.2	Zikavirus	5
1.3	Struktur des Zikavirus	6
1.4	Zikavirus-Hüllprotein E	8
1.5	Ziel der Arbeit	10
2	Material und Methoden	
2.1	Material	11
2.1.1	Materialien und Geräte	11
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.3	Verwendete Enzyme	15
2.1.4	Verwendete Plasmide	15
2.1.5	Verwendete Zelllinien	15
2.1.6	Verwendete Virusstämme	16
2.3	Mikrobiologische Methoden	17
2.3.1	Medien und Agarplatten	17
2.3.2	Herstellung chemokompetenter Bakterien	17
2.4	Molekularbiologische Methoden	18
2.4.1	Extraktion viraler RNA	18
2.4.2	cDNA-Synthese	18
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	18
2.4.3.1	Amplifikationen von PrM/E-Fragmenten	19
2.4.3.2	Herstellung chimärer Genfragmente	19
2.4.4	Agarosegelelektrophorese	20
2.4.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
2.4.6	Transformation von Plasmid-DNA in chemokompetente E. coli-Zellen	21

2.4.7	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA	21
2.4.7.1	Minipräparation durch alkalische Lyse	21
2.4.7.2	CsCl-Plasmidpräparation	22
2.4.7.3	Miraprep-Plasmidpräparation.....	23
2.4.8	Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA.....	23
2.4.9	Restriktionsendonukleasespaltung	23
2.4.10	Herstellung von prM/E-Expressionsvektoren	24
2.4.10.1	Klonierung von prM/E-Fragmenten in TA-Klonierungsvektor	24
2.4.10.2	Klonierung von prM/E-Fragmenten in Expressionsvektor	24
2.4.11	DNA-Sequenzierung	25
2.5	Zellbiologische Methoden.....	25
2.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	25
2.5.2	Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikel	26
2.5.3	Infektion eukaryotischer Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln.....	27
2.5.4	Luciferase-Assay	27
3	Ergebnisse	
3.1	Klonierung der Flavivirus-Hüllproteine für die Expression in 293T-Zellen	28
3.1.1	Klonierung der M/E-Hüllproteine des Usutuvirus	28
3.1.2	Klonierung der prM/E-Hüllproteine des West-Nil-Virus	32
3.1.3	Klonierung der prM/E-Hüllproteine des Japanische-Enzephalitis-Virus.....	34
3.1.4	Klonierung der prM/E-Hüllproteine des Gelbfiebervirus	36
3.1.5	Klonierung der Zikavirus prM/E-Hüllproteine	38
3.1.5.1	Klonierung der prM/E-Hüllproteine von ZIKV Dakar41519	39
3.1.5.2	Klonierung der prM/E-Hüllproteine von ZIKV ArD158084.....	41
3.1.5.3	Klonierung der prM/E-Hüllproteine von ZIKV Dakar41524	43
3.1.5.4	Klonierung der prM/E-Hüllproteine von ZIKV H/PF/2013	45
3.2	Klonierung der Zika-Usutu-Chimäre	48
3.2.1	Klonierung der Usutu-Zika-Chimäre U12Z3	50
3.2.2	Klonierung der Zika-Usutu-Chimäre Z12U3	53

3.3	Transfektion von 293T-Zellen zur Herstellung pseudotypisierter Partikel.....	56
3.3.1	Etablierung eines Transfektionssystems für prM/E pseudotypisiertes HIV-1 .	58
3.3.1.1	Ermittlung der benötigten Menge an PEI-Transfektionsreagenz.....	59
3.3.1.2	Vergleich der Transfektionseffizienz der Reagenzien PEI und ScreenFect® A	60
3.3.2	Herstellung von USUV-, WNV-, JEV- und YFV-prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln	62
3.3.3	Herstellung von ZIKV-prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln	63
3.3.4	Herstellung von pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der USUV-ZIKV-Chimären	64
3.4	Infektion von VeroB4-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln.....	65
3.4.1	Infektion von VeroB4-Zellen mit USUV-, WNV-, JEV- und YFV-prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln	66
3.4.2	Infektion von VeroB4-Zellen mit ZIKV-HIV-1-pseudotypisierten Partikeln	69
3.4.3	Infektion von VeroB4-Zellen mit USUV-ZIKV-Chimären- pseudotypisierter HIV-1-Partikel	71
4	Diskussion	
4.1	Etablierung eines kostensenkenden Transfektionsmodells.....	74
4.2	Flavivirus pseudotypisierte HIV-1-Partikel	75
4.3	Infektion von VeroB4-Zellen mit Usutu-Zika-Chimären	77
5	Zusammenfassung	81
6	Literaturverzeichnis	82
7	Eidesstattliche Erklärung	88
8	Anhang	
8.1	Plasmidkarten.....	89
8.1.1	pCR™2.1.....	89
8.1.2	pHA	90

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Struktur eines Denguevirus-prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikels.....	2
Abb. 2	Der HIV-1 <i>budding</i> -Prozess	4
Abb. 3	Aufbau und Struktur des Zikavirus.....	7
Abb. 4	Aufbau und Struktur des Zikavirus E-Proteins.....	9
Abb. 5	Amplifiziertes prM/E-DNA-Fragment des Usutuvirus-Isolats BH65/11-02-03 ..	29
Abb. 6	Restriktionsanalyse des prM/E Expressionsplasmids pHA-USU-BH65.....	30
Abb. 7	pHA-USU-BH65 prM/E-Sequenz	31
Abb. 8	Aufgereinigtes prM/E-PCR-Amplifikat von WNV New York	32
Abb. 9	pHA-JE-NAK prM/E-Sequenz	33
Abb. 10	Aufgereinigtes prM/E-PCR-Amplifikat von JEV Nakayama	34
Abb. 11	pHA-JE-NAK prM/E-Sequenz	35
Abb. 12	Aufgereinigtes prM/E-PCR-Amplifikat von YFV 17D	36
Abb. 13	pHA-YF-17D prM/E-Sequenz	37
Abb. 14	Amplifikation des prM/E-Fragments des Zikavirus Dakar41519	39
Abb. 15	pHA-Z41519 prM/E-Sequenz	40
Abb. 16	Amplifikation des prM/E-Fragments des Zikavirus ArD158084.....	41
Abb. 17	pHA-ZIKA-ARD prM/E –Sequenz.....	42
Abb. 18	Aufgereinigtes prM/E-PCR Amplifikat von Dakar41524.....	43
Abb. 19	pHA-Z41524 prM/E-Sequenz	44
Abb. 20	Gelanalyse der Amplifikation des ZIKV-H/PF prM/E-Genfragments.....	46
Abb. 21	pHA-ZIKA-H/PF prM/E-Sequenz.....	47
Abb. 22	Klonierungsstrategie der Zika--Usutu-Chimären	49
Abb. 23	<i>Assembly</i> der Usutu-Zika-Chimäre $U_{12}Z_3$	51
Abb. 24	pHA- $U_{12}Z_3$ prM/E-Sequenz.....	52
Abb. 25	<i>Assembly</i> der Zika-Usutu Chimäre $Z_{12}U_3$	54
Abb. 26	pHA- $Z_{12}U_3$ prM/E-Sequenz.....	55
Abb. 27	Klonierungsstrategie für HIV-1-Pseudotypen	57
Abb. 28	Infektion mit USU-, WN-, JE- und YF-Pseudotypen.....	68
Abb. 29	Infektion mit Zika--Usutu-Pseudotypen	73

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Pseudotypen und Verpackungssysteme	3
Tab. 2	Materialien	11
Tab. 3	Geräte	11
Tab. 4	Chemikalien	12
Tab. 5	Reagenzien und Kits	14
Tab. 6	Enzyme	15
Tab. 7	Plasmide	15
Tab. 8	Zellen	15
Tab. 9	Virusstämme	16
Tab. 10	Luciferase-Aktivitäten der pNL Luc AM-transfizierten HEK293T-Zellen zur Ermittlung des DNA-PEI-Verhältnisses	59
Tab. 11	Luciferase-Aktivitäten der pNL Luc AM-transfizierten HEK293T-Zellen zum Transfektionsvergleich PEI/ScreenFect® A	61
Tab. 12	Luciferase-Aktivitäten der USUV, WNV, JEV und YFV transfizierten HEK293T-Zellen	62
Tab. 13	Luciferase-Aktivitäten der ZIKV-transfizierten HEK293T-Zellen	63
Tab. 14	Luciferase-Aktivitäten der mit pHA-U ₁₂ Z ₃ und pHA-Z ₁₂ U ₃ transfizierten HEK293T-Zellen	64
Tab. 15	Luciferase-Aktivitäten der mit USUV, WNV, JEV und YFV infizierten VeroB4-Zellen	67
Tab. 16	Luciferase-Aktivitäten der mit ZIKV infizierten VeroB4-Zellen	70
Tab. 17	Luciferase-Aktivitäten der mit USUV-ZIKV-Chimären infizierten VeroB4-Zellen	72

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
C-Protein	Kapsidprotein (<i>capsid protein</i>)
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DENV	Denguevirus
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED1	E-Protein Domäne 1 (<i>envelope protein domain 1</i>)
ED2	E-Protein Domäne 2 (<i>envelope protein domain 2</i>)
ED3	E-Protein Domäne 3 (<i>envelope protein domain 3</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
<i>env</i>	<i>envelope</i>
E-Protein	Hüllprotein (<i>envelope protein</i>)
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	Fetales Rinderserum (<i>fetale bovine serum</i>)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
kb	Kilobasenpaar
Luc	Luciferase
M-Protein	Membranprotein (<i>membrane protein</i>)
<i>nef</i>	<i>negative regulatory factor</i>
OD	Optische Dichte
OE-PCR	<i>Overlap Extension</i> -Polymerase-Kettenreaktion
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
Pen	Penicillin

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
prM-Protein	Vorläufer des M-Proteins (<i>precursor membrane protein</i>)
RLU	Relative Lichteinheiten (<i>relative light units</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1640
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Strep	Streptomycin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (DNA-Polymerase)
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
USUV	Usutuvirus
UV	Ultraviolettstrahlung
ü.N.	über Nacht
VLP	Virus-ähnliche Partikel (<i>virus-like particle</i>)
<i>vpr</i>	virales Protein R
VSV	Vesicular stomatitis virus
VSV-G	Hüllprotein des Vesicular stomatitis virus
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume by volume</i>)
w/v	Masse pro Volumen (<i>weight by volume</i>)
WNV	West-Nil-Virus
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YFV	Gelbfiebervirus (<i>yellow fever virus</i>)
ZIKV	Zikavirus

Nukleobasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Aminosäuren

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

1 Einleitung

1.1 Pseudotypisierte Viruspartikel

Ein viraler Pseudotyp ist ein rekombinantes Viruspartikel mit einem inneren Kern und Hüllproteinen von einem anderen Virus (Abb. 1). Fehlt der virale Kern bezeichnet man ein solches leeres Partikel auch als Virus-ähnliches-Partikel (*virus like particle*, VLP). Da sich im Inneren keine virale genetische Information befindet, sind VLPs nicht replikationsfähig.

Für die Herstellung von viralen Pseudotypen haben sich verschiedene Verpackungssysteme durchgesetzt. Das Vesicular stomatitis virus (VSV) ist ein System bei dem das virale Hüllprotein G (VSV-G) im Genom deletiert wurde. VSV-G kann durch verschiedenste Hüllproteine substituiert werden, wie z. B. die Hülle des Ebolavirus (EBOV) (Tab. 1). Aktuell wird bei den Ebola-Ausbrüchen in Afrika ein Impfstoff basierend auf einem Ebola-VSV-Pseudotyp eingesetzt.¹ Ein weiteres Verpackungssystem benutzt das Maus-Leukämie-Virus (MULV). In Tabelle 1 sind einige Beispiele für MULV-Pseudotypen aufgeführt, die mit Hüllproteinen von VSV, HIV, MERS-CoV, SARS-CoV und Inflenzaviren hergestellt wurden. Auch das Ebolavirus-Hüllprotein funktioniert zusammen mit dem MULV-Verpackungssystem. Ausnahmen bildet der Hantavirus-Pseudotyp, der nur mit dem MULV-System zu funktionieren scheint.² Am meisten genutzt wird das HIV-1-Verpackungssystem. Hier steht eine Vielzahl von lentiviralen Vektoren und Expressionsplasmiden zur Verfügung. Bisher gibt es aber für die retroviralen Verpackungssysteme MLV und HIV-1 keine Arbeiten zu Flavivirus pseudotypisierten Partikeln. Einzig ein Pseudotyp des VSV mit den prM/E-Hüllproteinen des Japanischen-Enzephalitis-Virus (JEV) ist in der Literatur beschrieben.³ Betrachtet man die Angaben zu den Viren, welche mit dem HIV-1-Verpackungssystem funktionieren, so ist eines auffällig. Alle Viren exprimieren ihre Hüllproteine als in die Zellmembran verankerte Membranproteine und besitzen wenigstens ein Protein, welches ein bestimmtes Sequenzmotiv aufweist, das PTAP-Aminosäuremotiv. In Abbildung 2 ist dargestellt, wie der *budding*-Prozess bei diesen Viren funktioniert. Über das PTAP-Sequenzmotiv verbinden sich die Virusproteine mit den zellulären ESCRT- Sortierkomplexen (*endosomal sorting complexes required for transport*). Die Sortierkomplexe bestehen aus cytosolischen Proteinkomplexen, die ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II und ESCRT-III genannt werden. Bei den Flaviviren gibt es keine Proteine mit einem PTAP-Motiv. Daher wird deren *budding* nicht durch das ESCRT-System unterstützt. Das könnte ein Grund sein, warum es zurzeit keine Berichte zu HIV-1-Pseudotypen mit Flavivirus-Hüllproteinen, wie z. B. dem Zikavirus-prM/E gibt.

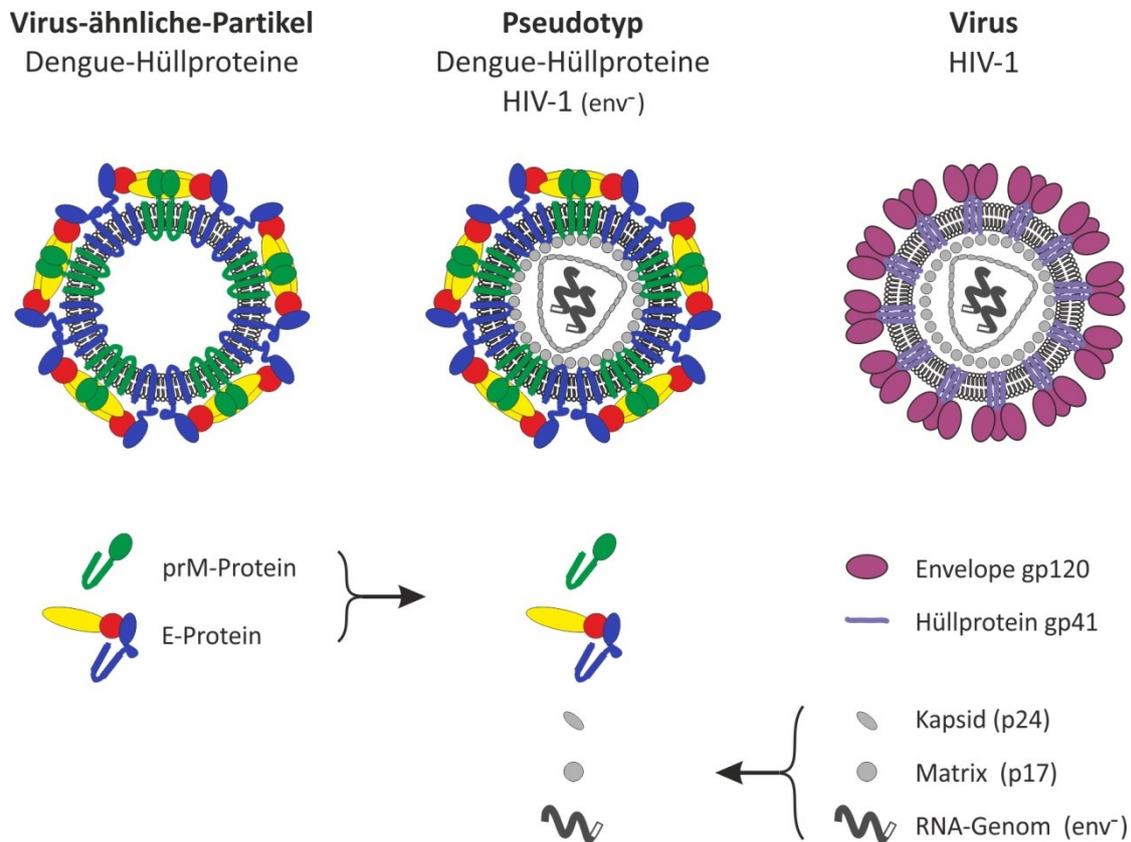


Abb. 1: Struktur eines Denguevirus-prM/E pseudotypierten HIV-1-Partikels

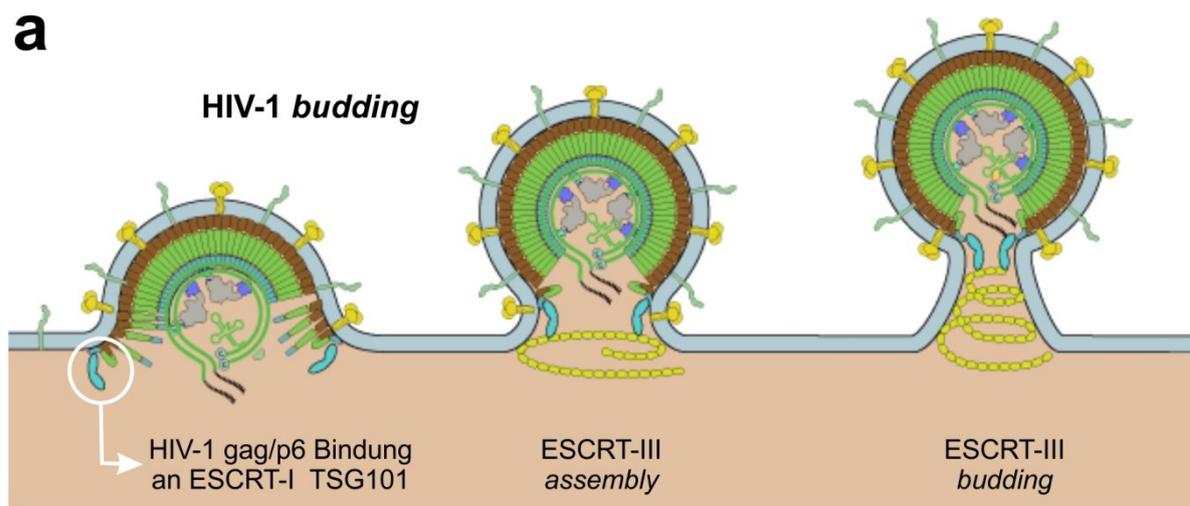
Denguevirus-ähnliche-Partikel entstehen bei der Expression der beiden Hüllproteine prM und E an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Diese Partikel sind leer, es befindet sich kein Virusgenom im Inneren. Das HIV-1 besteht aus zwei Einheiten, dem Kern und der Hülle. Den inneren Kern bildet das p17-Kapsid. In diesem Kapsid befinden sich die beiden identischen RNA-Genome umgeben vom p24-Nukleokapsidprotein. Die Hülle wird von der Membran und den beiden Glykoproteinen gp41 und gp120 gebildet. Das externe Hüllprotein gp120 ist an das in der Membran verankerte gp41 gebunden. Das Gen für die HIV-1-Hüllproteine (env) kann im Virusgenom inaktiviert werden (env^-), dann entstehen nur HIV-1-Viruspartikel ohne äußere Hüllproteine. Durch die gleichzeitige Expression eines Virusgenoms mit dem env^- Phänotyp und einem Expressionsvektor für Denguevirus-prM/E (env^+) in eukaryotischen Zellen kommt es zur Ausbildung des gemischten Viruspartikels, dem Pseudotyp.

Methodisch lassen sich virale Pseudotypen durch eine Kotransfektion von eukaryotischen Zellen mit verschiedenen Vektoren herstellen. Der Vektor pNL4-3.Luc.R-E- dient in dem ersten Beispiel in Tabelle 1 als Verpackungssystem für einen VSV-G-Pseudotypen und produziert alles was zur Ausbildung des inneren HIV-Kerns nötig ist. Der Vektor kodiert für das HIV-1-Genom des Virusisolats NL4-3, ist jedoch durch Mutationen im *vpr*- und *env*-Gen für die Proteine R und gp120 negativ und daher nicht in der Lage die Hüllproteine gp41/120 des HIV-1 zu exprimieren. Zusätzlich ist der Vektor aufgrund eines Austauschs des *nef*-Gens gegen das Luciferase-Gen *nef*-defizient aber Luciferase-positiv (*Luc*⁺). Ein zweiter Vektor, der nicht ins Partikel integriert, exprimiert das Hüllprotein VSV-G des Vesicular stomatis virus. Eine gleichzeitige Transfektion beider Vektoren führt zur Bildung von HIV-1-Partikeln, die auf der Oberfläche das VSV-G-Protein tragen. Bisher gibt es allerdings keine Berichte zu HIV-1-Pseudotypen mit Flavivirus-Hüllproteinen. Lediglich im Zuge einer Dissertation und Bachelorarbeit in der LG-Schreiber (BNITM, Hamburg) ist es bisher gelungen ein System für DENV-prM/E pseudotypisierte HIV-1-Partikeln zu etablieren.^{4,5}

Tab. 1: Pseudotypen und Verpackungssysteme*

Virus	Verpackungssystem			Reporter	Lit.
	HIV-1	VSV	MULV		
VSV	pNL4-3.Luc.R-E-	+	+	Luciferase	
EBOV	pR8ΔEnv	+	pHIT60	β-gal	6–8
HIV	pNL4-3.Luc.R-E-	+	+	Luciferase	9
CHIKV	psPAX2	+	-	Luciferase	10
MARV	pNL4-3.Luc.R-E-	-	-	Luciferase	11,12
LASV	pJK2	-	-	β-gal	13
MERS-CoV	pCSFLW	-	+	Luciferase	14
SARS-CoV	pHR'-CMVLacZ	-	+	β-gal	15
Influenzavirus	pHxEGFPWP	+	+	GFP	16
Hantavirus	-	-	pcGP	β-gal	2
JEV prM/E	-	pVSVΔG-GFP	-	Luciferase	3

* exemplarische Auswahl aus dem Übersichtsartikel von Li *et al.* (2017)¹⁷



b

	Virales Protein	Motiv der L-Domäne	ESCRT Protein	Ort des Budding
Retroviridae				
HIV-1	P6 - gag	PTAP	TSG101	Zellmembran
SIV	P6 - gag	PTAP	TSG101	Zellmembran
HTLV-1	P19 - gag	PTAP	TSG101	Zellmembran
MULV	P12 - gag	PTAP	TSG101	Zellmembran
Flaviviridae				
HepatitisC-Virus	? Core Protein	?	?	Endoplasmatisches Retikulum
Denguevirus	?	?	?	Endoplasmatisches Retikulum
Gelbfiebervirus	?	?	?	Endoplasmatisches Retikulum
West-Nil-Virus	?	?	?	Endoplasmatisches Retikulum
Usutuvirus	?	?	?	Endoplasmatisches Retikulum

Abb. 2: Der HIV-1 budding-Prozess

- a) Im HIV-1 gag/p6 befindet sich das PTAP-Aminosäuremotiv, welches die Bindung mit dem TSG101 des ESCRT-I-Komplexes einleitet. Über das TSG101 werden die ESCRT-III-Proteine angelagert und durch die Bildung einer Spirale und deren Verengung wird das virale Partikel ausgeschleust. *Bildnachweis: ViralZone, www.expasy.org/viralzone, Swiss Institute of Bioinformatics*
- b) Exemplarisch ist der Unterschied beim Virus-budding für HIV-1, bzw. den Retroviren und den Flaviviren aufgezeigt. Bei den Flaviviren gibt es kein virales Protein, welches das PTAP-Motiv besitzt. Daher werden Flaviviren nicht durch das ESCRT-System ausgeschleust. Dies ist ein prinzipieller Unterschied der Flaviviren zu HIV-1 aber auch zu anderen Viren, wie z. B. VSV, EBOV, CHIKV, MARV, LASV, MERS-CoV, SARS-CoV, Influenzavirus, die alle mit dem HIV-1-Verpackungssystem Pseudotypen bilden (siehe Tab. 1).

1.2 Zikavirus

Das Zikavirus (ZIKV) aus dem Genus *Flavivirus* gehört zu der Familie *Flaviviridae*. Hierzu werden auch das Usutu-, West-Nil-, Japanische-Enzephalitis-, Gelbfieber- und Denguevirus gezählt. Seit der Identifizierung im Jahr 1947 zirkuliert das Zikavirus in Afrika vorwiegend in nichtmenschlichen Primaten, die den Hauptwirt für das ZIKV darstellen. Als Vektor fungieren hauptsächlich Mücken der Gattung *Aedes*. Ursprünglich wurde das Virus in Rhesus-Makaken gefunden und nach dem Waldgebiet, dem Zika-Wald in Uganda benannt.¹⁸ Eine durch Mücken verursachte Übertragung des ZIKV auf den Menschen verursacht zu 80 % asymptomatische Infektionen. Merkmale einer symptomatischen Infektion sind meist milde, nicht lebensbedrohliche fieberhafte Erkrankungen mit Hautausschlag, Kopfschmerzen und Konjunktivitis.¹⁹

Die globale Aufmerksamkeit für ZIKV-Infektionen hat sich jedoch in den letzten Jahrzehnten drastisch verändert.²⁰⁻²² Seit 2015 hat sich das Zikavirus in Südamerika, ausgehend von Brasilien, stark verbreitet.²³ Es ist davon auszugehen, dass sich das ZIKV überall dort verbreiten wird, wo auch der entsprechende Mücken-Vektor vorkommt. So findet man das ZIKV nicht nur in Afrika, sondern auch in Südamerika und Asien. Bei ZIKV unterscheidet man prinzipiell zwischen afrikanischen und asiatischen Virusisolaten.²¹ Die Zikaviren, die für die neusten Ausbrüche in Südamerika verantwortlich waren, bilden dabei eine Untergruppe der asiatischen Linie.²⁴ Nach einer ZIKV-Epidemie in Französisch-Polynesien wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang des Guillain-Barré-Syndroms (GBS) mit einer früheren oder erst kürzlich erfolgten Infektion mit dem Zikavirus festgestellt.²⁵⁻²⁷ Es wurden immer mehr Belege dafür gefunden, dass eine ZIKV-Infektion neben dem GBS, einer autoimmun-neurologischen Erkrankung, auch die Mikrozephalie bei Föten und Neugeborenen verursacht.^{28,29} Weiterhin wurde bekannt, dass eine Infektion diaplazentar oder auch in seltenen Fällen sexuell übertragen werden kann.³⁰⁻³²

Wie bereits erwähnt, kann eine ZIKV-Infektion zu schweren Gehirnschädigungen (Mikrozephalie) führen. Das ZIKV besitzt daher im Unterschied zu anderen Flaviviren, die alle keine dauerhaften Schäden verursachen, einen speziellen Tropismus und auch eine gesonderte Pathogenese. Anhand der epidemiologischen Daten der südamerikanischen ZIKV-Epidemien würde man annehmen, dass sich ausgehend von den afrikanischen ZIKV-Varianten eine pathogenere, neuroinvasive Form entwickelt hat. Neu ist nun die Beobachtung, dass sich in allen bisher gefundenen ZIKV-Isolaten aus den letzten Epidemien das Sequenzmotiv VN₁DT befindet. Diese E-Proteinsequenz beinhaltet die Erkennungssequenz

NxT/S für die N-Glykosylierung und eine solche Sequenz fehlt in den meisten afrikanischen ZIKV-Isolaten. Daher wird vermutet, dass die N-Glykosylierung entscheidend dazu beiträgt schwere Krankheitsverläufe und Missbildungen bei Neugeborenen auszulösen. Untersuchungen bei Mäusen zeigten eine hohe Letalität, wenn sie mit VNNT-ZIKV infiziert wurden, im Unterschied zu Infektionen mit einem VNDI-ZIKV-Isolat. Auch wurde eine stark verringerte Aktivität der VNDI-ZIKV im Gehirn der Mäuse nachgewiesen.³³ Somit spielt die N-Glykosylierung für den Tropismus und die Pathogenese der ZIKV-Erkrankung eine wichtige Rolle.³³⁻³⁵ Daher wurden in dieser Arbeit die E-Proteine von ZIKV-Varianten mit und ohne einer NxT/S-Erkennungsstelle für die N-Glykosylierung kloniert.

1.3 Struktur des Zikavirus

Prinzipiell unterscheidet sich das Zikavirus hinsichtlich seines Aufbaus und seiner Struktur nicht wesentlich von anderen Flaviviren. Zikaviren enthalten ein positiv-orientiertes einzelsträngiges RNA-Genom von etwa 10,8 kb und gehören somit entsprechend der Baltimore-Nomenklatur zur Gruppe IV der einzelsträngigen RNA-Viren mit positiver Polarität (*positive-sense ssRNA virus*) (Abb. 3).³⁶ Das Genom besitzt ein offenes Leseraster (*open reading frame*, ORF), das am 5'- und 3'-Ende von nicht-kodierenden regulatorischen Sequenzen flankiert ist. Das durch das ORF kodierte Polyprotein wird durch virale und zelluläre Proteasen in die verschiedenen Virusproteine gespalten. Die drei Strukturproteine sind das Kapsidprotein (*capsid protein*, C), das Membranprotein bzw. dessen Vorläufer (*premembrane protein*, prM) und das Hüllprotein (*envelope protein*, E). Daneben entstehen noch sieben Nichtstrukturproteine, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5.³⁷ Die Neubildung eines Virions findet an der Oberfläche des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. Dabei befinden sich die Teile des Polyproteins, die später auf der Oberfläche des Virions lokalisiert sind, prM und E, im Lumen des ER. Nach der proteolytischen Spaltung bilden homodimere C-Proteine und die virale RNA das Nukleokapsid. Die Lipiddoppelschicht, die das Kapsid umgibt, entstammt dabei der Membran des ER.

Die äußeren beiden Hüllproteine prM und E sind mit ihrem C-terminalen Ende in der Membran verankert, wobei der C-Terminus sowie der N-Terminus beider Proteine extern lokalisiert sind. Dies unterscheidet Flaviviren von anderen Viren, wie z. B. HIV-1, wo das membranverankerte HIV-gp41 mit seinem C-Terminus im Inneren des Viruspartikels eine Bindung zum gag- und gagpol-Polyprotein ausbildet. Eine solche Eigenschaft von prM oder E ist bei Flaviviren nicht bekannt.

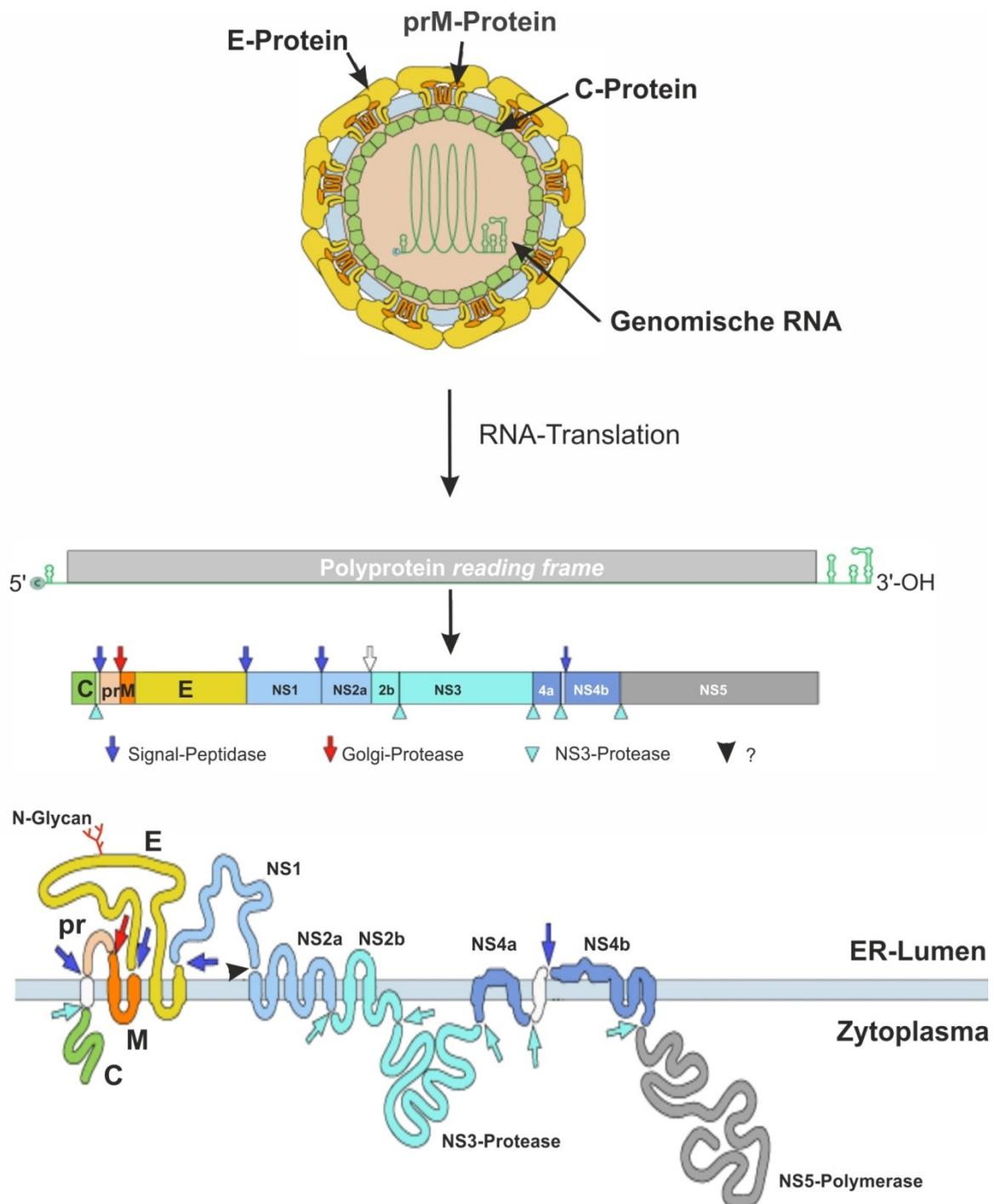


Abb. 3: Aufbau und Struktur des Zikavirus

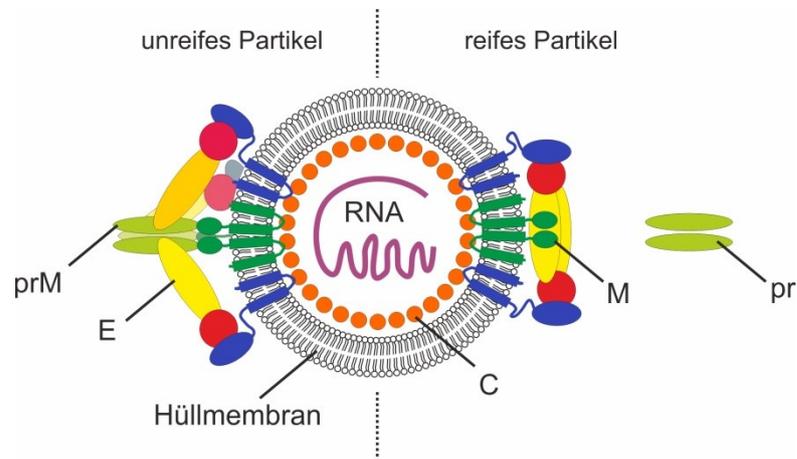
Das Zikavirus hat einen Durchmesser von ca. 50 nm. Die beiden Hüllproteine prM und E sind in der Membran verankert. Von der genomischen RNA wird ein Polyprotein abgelesen, welches durch zelluläre Peptidasen und Proteasen in die viralen Proteine gespalten wird. Im E-Protein befindet sich eine N_XT/S Erkennungssequenz für die N-Glykosylierung an Position N154. *Modifiziert aus: ViralZone: www.expasy.org/viralzone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics*

1.4 Zikavirus-Hüllprotein E

Membranhüllte Viren werden durch den *budding*-Prozess aus Zellen ausgeschleust (Abb. 2a). Bei HIV-1 z. B. verlässt das Virus die Zelle in einem vollständigen infektiösen Zustand. Die Hüllproteine sind in diesem Stadium aktiv in der Lage an den CD4-Rezeptor zu binden. Daher programmiert HIV-1 die virusproduzierende Zelle um, macht sie CD4 negativ, sodass sie nicht mehr für HIV-1 empfänglich, *non-permissive* sind. Bei Flaviviren dagegen bleiben die infizierten Zellen permissiv. Das Virus verlässt die Zelle dagegen in einer nicht-infektiösen Form als unreifes Partikel. Erst durch die Abspaltung des pr-Anteils vom prM-Protein wird die äußere Struktur der Flaviviren in eine aktive Form, das reife Partikel überführt (Abb. 4a). Im Stadium der unreifen Form besteht die Virusoberfläche aus 60 prM/E-Heterodimeren, die als Trimere, von der Membran abstehend, angeordnet sind.³⁸ In Abbildung 4a ist zur Vereinfachung eine zweidimensionale Form mit zwei prM/E-Heterodimeren dargestellt. Während der Partikelreifung werden die Heterodimere durch einen niedrigen pH-Wert im trans-Golgi-Netzwerk zu E-Homodimeren reorganisiert. Durch die strukturelle Veränderung wird die Furin-Spaltstelle von prM zugänglich. Es kommt zur Spaltung von prM in pr und M. Im unreifen Partikel schützt das noch im Hüllproteinkomplex gebundene pr-Peptid die Fusionsschleife (*fusion loop*) an der Spitze der ED2-Domäne (Abb. 4b). Eine Dissoziation des pr-Peptids findet dann bei der Freisetzung in den pH-neutralen extrazellulären Raum statt. Während der Reifung werden nicht alle prM/E-Heterodimere durch Furin gespalten, so dass ein Teil der prM/E-Komplexe wieder in die unreife Struktur zurückkehrt.³⁹

Das E-Protein ist für den Viruseintritt verantwortlich und stellt einen wichtigen Ansatzpunkt für neutralisierende Antikörper dar.³⁷ Das Protein besteht aus den drei strukturell voneinander getrennten Domänen ED1, ED2 und ED3 (Abb. 4b). Eine *stem*-Region verbindet die ED3 mit der Membrananker-Region. Die dargestellte Struktur basiert auf einem Trypsin-Fragment, dem E-Protein-Anteil der durch Trypsin von der Virusoberfläche abgespalten werden kann (Abb. 4b).⁴⁰ Dieser Teil beinhaltet die drei Domänen ED1, ED2 und ED3. Die Abfolge der kodierenden Genabschnitte für das E-Protein ist ED1-ED2-ED1-ED2-ED1-ED3. ED1 bildet eine β -barrel-Struktur, und ist mit ED2 über vier Linker und mit ED3 über eine Linkersequenz verbunden. Da ED3 direkt an ED1 anschließt können ED1ED2--ED3-Chimäre leicht per PCR hergestellt werden. ED2 ist für die Dimerisierung des E-Proteins verantwortlich und besitzt zudem die konservierte Fusionsschleife (*fusion loop*), die mit der Membran der Wirtszelle interagiert und die Membranverschmelzung initiiert. ED3 bindet an zelluläre Rezeptoren und ist eine prinzipielle Neutralisationsdomäne für Antikörper.⁴¹⁻⁴³

a



b

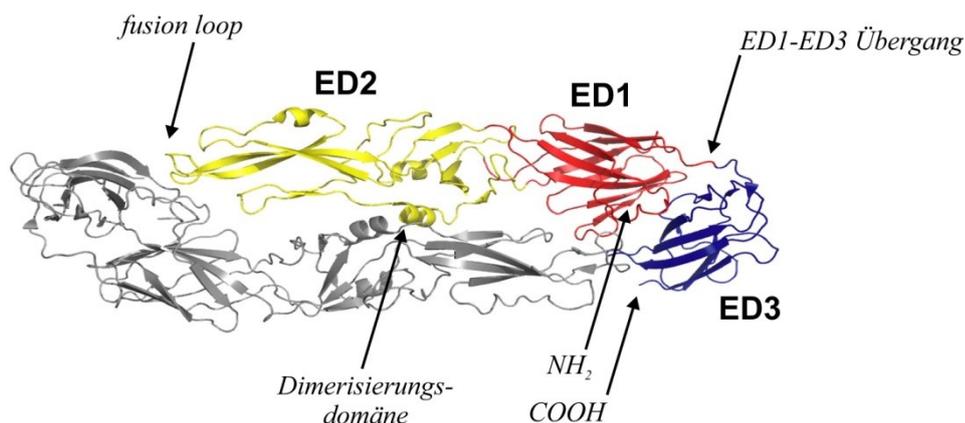


Abb. 4: Aufbau und Struktur des Zikavirus E-Proteins

- a) Zikaviren werden als unreife Partikel freigesetzt. Die Umwandlung in reife, bzw. infektiöse Partikel erfolgt durch die proteolytische Abspaltung des pr-Peptides durch eine zelluläre Furin-Protease.
- b) Durch die Protease Trypsin kann der externe Teil des E-Proteins von der Virusmembran abgespalten werden. Dadurch war es möglich die 3D-Struktur des Proteins aufzuklären. Das Protein unterteilt sich in drei wesentliche Domänen, ED1, ED2 und ED3. ED2 (gelb) besitzt den Fusionsloop, der sich in die Membran der Zielzelle einlagern kann, und die Dimerisierungsdomäne für die Bildung des E-Protein Homodimers. ED3 (blau) hat die Rezeptor-bindende Funktion. Da ED3 direkt an die ED1-Sequenz anschließt und linear codiert ist, können ED1ED2 - ED3-Viruschimären einfach hergestellt werden. *Abbildung modifiziert aus: Wahala et al., (2012)*⁴⁴

1.5 Ziel der Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit sollte das in der LG-Schreiber existierende HIV-1-basierende Pseudotypen-System für Dengueviren auf weitere Flaviviren, insbesondere für Zikaviren erweitert werden. Hierfür sollten Expressionvektoren hergestellt werden, welche die entsprechenden Hüllproteine prM und E von verschiedenen Zikaviren der afrikanischen und asiatischen Linie, sowie dem Usutu-, West-Nil-, Japanische-Enzephalitis- und Gelbfieberevirus exprimieren. Genomische RNA der Viren sollte isoliert, in cDNA umgeschrieben und das pr/M-DNA-Fragment mit Hilfe der PCR amplifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten chimäre E-Proteine von Usutu- und Zikaviren kloniert werden. Dafür sollte bei jedem der Viren die ED3 Region gegen die ED3 Region des anderen Virus ausgetauscht werden. Als Resultat sollte jeweils ein Zika-ED1ED2--Usutu-ED3 und ein Usutu-ED1ED2--Zika-ED3 Klon erhalten werden. Als *Zika-template* sollte eine pathogene Variante mit der NDT Sequenz für die N-Glykosylierung verwendet werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollten pseudotypisierte Partikel mit prM/E-Hüllen von den unter Teil 1 und 2 genannten Flaviviren und Viruschimären hergestellt werden. Dafür sollten die Vektoren in Bakterien vermehrt und in großem Maßstab mit der klassischen CsCl-Methode isoliert werden. Für die Transfektion in Zellen soll die Methode mit Polyethylenimin als Reagenz angewendet und für die Transfektion von 293T-Zellen adaptiert werden. Damit würde auch gleichzeitig eine stark kostensenkende Alternative zu kommerziellen Transfektionsreagenzien in der Laborgruppe etabliert werden.

Im vierten Teil sollten die erzeugten prM/E-Pseudotypen für Infektionsversuche eingesetzt werden. Zellkulturüberstände von transfizierten 293T-Zellen sollten zu VeroB4, Flavivirus permissiven Zellen, gegeben werden. Anhand der Expression des Luciferase-Reportergens (*fire fly luciferase*) sollte die Effizienz der Infektionen im Luminometer gemessen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien und Geräte

Tab. 2: Materialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T25	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
	TC-Flasche T75	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
Zellkulturplatten	TC-Platte 6 <i>well</i>	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
	TC-Platte 24 <i>well</i>	SARSTEDT AG & Co. KG; Nümbrecht
	Nunc™ F96 MicroWell™	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA

Tab. 3: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Extend ED3202S- CW	Sartorius AG; Göttingen
Elektrophoresekammer	-	Cti GmbH; Idstein
Inkubatoren	CB 150	BINDER GmbH; Tuttlingen
	INE 500	Memmert GmbH & Co.KG; Schwabach
Küvetten	Mikroküvetten	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
Magnetrührer	IKAMAG RCT	IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen
Mikroplattenluminometer	Centro LB 960	Berthold Technologies GmbH & Co.KG; Bad Wildbad
Mikroskop	Diavert	Leitz; Wetzlar
pH-Meter	CG 840	Schott AG; Mainz
Rollertrommel	TC-7	Eppendorf AG; Hamburg

Schüttelinkubator	3031	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel
Spektralphotometer	UV-160A	Shimadzu Corporation; Kyōto, Japan
Sterilwerkbank	SterilGARD® III Advance	The Baker Company; Sanford, Maine, USA
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG; Hamburg
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf AG; Hamburg
Vortexschüttler	VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen
Zentrifugen	Avanti J-26XP	Beckman Coulter GmbH; Krefeld
	Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH; Hanau
	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG; Hamburg
	Megafuge 3.0R	Heraeus Holding GmbH; Hanau
	Optima XE-90	Beckman Coulter GmbH; Krefeld

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 4: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal)	PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen
Agar	Becton, Dickinson and Company Corporation; Franklin Lakes, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH; Hessisch Oldendorf
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck KGaA; Darmstadt
Caesiumchlorid	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA

Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Chloroquindiphosphat Salz	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Eisessig	neoLab Migge GmbH; Heidelberg
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA
Glukose	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Hefeextrakt	Becton, Dickinson and Company Corporation; Franklin Lakes, USA
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Polyethylenimin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Corporation; St. Louis, USA
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Trypton	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe

Tab. 5: Reagenzien und Kits

Reagenzien	Hersteller
10x PCR Puffer ohne MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
CutSmart [®] Puffer	New England Biolabs; Ipswich, USA
dNTP Set (100 mM)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX [™]	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Fetales Rinderserum (FBS)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach
GeneRuler [™] 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
GeneRuler [™] 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
MgCl ₂ (25 mM)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
OptiPRO SFM	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin (5.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640 Medium) + GlutaMAX [™]	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Trypsin/EDTA (0,05 % / 0,02 % in PBS)	PAN-Biotech GmbH; Aidenbach
Reagenzien-Kits	Hersteller
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
Bright-Glo [™] Luciferase Assay System	Promega Corporation; Madison, USA
QIAamp [®] Viral RNA Mini Kit	QIAGEN GmbH; Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH; Hilden
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
ScreenFect [®] A	ScreenFect GmbH; Eggenstein-Leopoldshafen
TA Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA

2.1.3 Verwendete Enzyme

Tab. 6: Enzyme

Enzym-Bezeichnung	U/ μ l	Hersteller
KpnI-HF [®] -Restriktionsendonuklease	20 U/ μ l	New England Biolabs; Ipswich, USA
NotI-HF [®] - Restriktionsendonuklease	20 U/ μ l	New England Biolabs; Ipswich, USA
T4-DNA-Ligase	1 U/ μ l	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	1 U/ μ l	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA

2.1.4 Verwendete Plasmide

Tab. 7: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pCR [™] 2.1	TA-Klonierungsvektor	Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA
pNL Luc AM	Luciferase-Reporter-Vektor	J.P.Moore; USA ⁴⁵
pHA	Expressionsvektor	Laborgruppe Schreiber Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM); Hamburg

2.1.5 Verwendete Zelllinien

Tab. 8: Zellen

Zellen	Ursprungsorganismus	ATCC	Herkunft
HEK293T	<i>Homo sapiens</i>	CRL-11268	Friedrich-Löffler-Institut, Riems-Greifswald
VeroB4	<i>Cercopithecus aethiops</i>	CCL-81	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

2.1.6 Verwendete Virusstämme

Tab. 9: Virusstämme

Virus	Stamm	GenBank-Nr.	Herkunft
Zika	ArD158084	KF383119	Pasteur-Instituts Kambodscha (IPC)
	Dakar41524	KX601166	Pasteur-Instituts Kambodscha (IPC)
	Dakar41519	HQ234501	Pasteur-Instituts Kambodscha (IPC)
	H/PF/2013	KJ776791	Euroean Virus Archive goes global (EVAg); Unité des Virus Emergents; Marseille, France
Usutu	BH65/11-02-03	HE599647	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM); Hamburg
West-Nil	NY-99	KC407666	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM); Hamburg
Japanische- Enzephalitis	Nakayama	HE861351	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM); Hamburg
Gelbfieber	17D	MG051217	Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin (BNITM); Hamburg

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Medien und Agarplatten

Die angegebenen Mengen wurden auf 1 Liter mit doppelt destilliertem Wasser aufgefüllt. Spezielle Zusätze wurden den Medien bei ca. 50°C zugegeben.

YT-Medium

Hefeextrakt	5 g
Trypton	8 g
NaCl	5 g

dYT-Medium

	10 g
	16 g
	5 g

YT-Agarplatten

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

Zusätze

Ampicillin	(60 mg/ml)	4 ml/l
IPTG	(0,1 M)	3,3 ml/l
X-Gal	(2 % in DMF)	3,3 ml/l

2.3.2 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Am Tag zuvor wurde eine Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes DH5 α von einer YT-Agarplatte in ein Kulturröhrchen mit 3 ml YT-Medium überführt und über Nacht in einer Rollertrommel bei 37 °C inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 100 ml YT-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation der Bakterien bei 37 °C und 180 rpm erfolgte bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=0,4. Nach Abkühlung auf Eis, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 5.000 rpm für 15 min. Die abzentrifugierten Bakterien wurden anschließend in 40 ml sterilfiltriertem 50 mM CaCl₂ suspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien zentrifugiert (4 °C, 5.000 rpm, 15 min). Das Pellet wurde in 2 ml 50 mM CaCl₂ suspendiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Suspension mit 2 ml 50 %igem Glycerin versetzt. Aliquots zu 200 μ l wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -70 °C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Extraktion viraler RNA

Die Isolation viraler RNA Serien erfolgte mit dem QIAamp[®] Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH) nach dem Protokoll für Mikrozentrifugen des Herstellers.

2.4.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Fisher Scientific) wurde die cDNA-Synthese nach Herstellerangaben durchgeführt. Als *template* für die RT-PCR wurden hierbei 5 µl der zuvor isolierten Virus-RNA (2.4.1) verwendet.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Spezifische Genfragmente wurden mit Hilfe einer PCR amplifiziert und vervielfältigt. Der Reaktionsansatz für eine Standard-PCR ist unten aufgelistet. Die hierfür verwendete dNTP-Lösung wurde zuvor aus 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in wässriger Lösung (Thermo Fisher Scientific) hergestellt. Die für die Amplifikation benötigten Oligonukleotide wurden durch die Firma metabion international AG (Planegg) synthetisiert und anschließend mit ddH₂O auf eine Endkonzentration von 10 pmol/µl gebracht. Die optimale *annealing*-Temperatur jedes Primerpaares wurde durch eine Gradienten-PCR bestimmt und das verwendete PCR-Programm entsprechend angepasst.

Standard-PCR-Reaktionsansatz

ddH ₂ O		31,5 µl
10x PCR Puffer	(ohne MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂	(25 mM)	5 µl
dNTPs	(10 mM/dNTP)	1 µl
<i>forward</i> -Primer	(10 pmol/µl)	2,5 µl
<i>reverse</i> -Primer	(10 pmol/µl)	2,5 µl
DNA <i>template</i>		1 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	(1 U/µl)	1,5 µl

Standard-PCR-Programm

Denaturierung	95 °C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Hybridisierung	°C-Primerabhängig	30 sec	
Elongation	72 °C	Sequenzabhängig (1 min/1 kb)	
Elongation	72 °C	7 min	

2.4.3.1 Amplifikation von prM/E-Fragmenten

Die prM/E-Fragmenten der verschiedenen Flaviviren wurden mittels einer Standard-PCR (2.4.3), bei der die jeweilige cDNA als *template* verwendet wurde, amplifiziert. Spezifische Oligonukleotide, mit einer zuvor ermittelten optimalen *annealing*-Temperatur, erlaubten die Amplifikation eines Fragments, das die vollständigen Gene für prM und E sowie einen Teil des C-Gens enthielt. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen (2.4.4), die entsprechende Bande ausgeschnitten und aufgereinigt (2.4.5).

Primer für die Amplifikation von prM/E-Fragmenten

	<i>for- & rev-Primer</i>	<i>Fragmentannealing</i>
ZIKV	ZIKA-KpnI- <i>for</i> + ZIKA-NotI- <i>rev</i>	≈ 2.100 bp 61 °C
USUV	USU-KpnI- <i>for</i> + USU-NotI- <i>rev</i>	≈ 2.100 bp 50 °C
WNV	WN-KpnI- <i>for</i> + WN-NotI- <i>rev</i>	≈ 2.100 bp 61 °C
JEV	JE-KpnI- <i>for</i> + JE-NotI- <i>rev</i>	≈ 2.100 bp 46 °C
YFV	YF-KpnI- <i>for</i> + YF-NotI- <i>rev</i>	≈ 2.100 bp 48 °C

2.4.3.2 Herstellung chimärer Genfragmente

Um chimäre Genfragmente zu erhalten, wurde die Technik der *Overlap Extension*-PCR verwendet. Für diese Methode wurden zunächst zwei zueinander komplementäre Mutationsprimer, die ebenfalls komplementär zum Zielgen sind, definiert. Im ersten Schritt wurden in zwei getrennten PCR-Ansätzen diese Oligonukleotide mit dem jeweiligen passenden flankierenden Primer kombiniert, um überlappende Gensequenzen zu erhalten. Sowohl die Amplifikation, als auch die Ermittlung der optimalen *annealing*-Temperatur erfolgte mittels Standard-PCR-Protokoll (2.4.3). Die Fragmente wurden mit einer präparativen Gelelektrophorese gereinigt (2.4.5) und als DNA-*template* in einer selbst primenden Überlappungs-PCR eingesetzt. Die Reaktion wurde mit Standard-PCR-Reaktionsansatz ohne Oligonukleotide nach dem Standard-PCR-Programm mit 15 Zyklen durchgeführt. Mit einer PCR wurde die vollständige chimäre Gensequenz durch Zugabe von je 2,5 µl 5'- und 3'-flankierender Primer mit 20 Zyklen des Standard-PCR-Programms amplifiziert. Die amplifizierte DNA wurde in einem 0,8 %igem Agarosegel aufgetrennt (2.4.4) und isoliert (2.4.5). Durch Sequenzierung (2.4.11) wurde die Gensequenz überprüft, bevor diese im weiteren Verlauf kloniert wurde (2.4.10).

Primer für die Herstellung chimärer Genfragmente

	<i>for- & rev-Primer</i>	<i>Fragment annealing</i>
USUV-E1E2	USU-KpnI- <i>for</i> + USU-E1E2- <i>rev</i>	≈ 1.450 bp 53 °C
ZIKV-E3	ZIKA-E3- <i>for</i> + ZIKA-NotI- <i>rev</i>	≈ 700 bp 53 °C
ZIKV-E1E2	ZIKA-KpnI- <i>for</i> + ZIKA-E1E2- <i>rev</i>	≈ 1.450 bp 50 °C
USUV-E3	USU-E3- <i>for</i> + USU-NotI- <i>rev</i>	≈ 700 bp 50 °C
USUV-E1E2-ZIKV-E3	USU-KpnI- <i>for</i> + ZIKA-NotI- <i>rev</i>	≈ 2.100 bp 53 °C
ZIKV-E1E2-USUV-E3	ZIKA-KpnI- <i>for</i> + USU-NotI- <i>rev</i>	≈ 2.100 bp 50 °C

2.4.4 Agarosegelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde die Methode der Gelelektrophorese verwendet. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde 0,8 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und auf 56 °C abgekühlt. Bevor die Gelflüssigkeit in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen wurde, wurde 1 µl EtBr (10 mg/ml) hinein pipettiert. Nach dem Gießen wurde der Kamm mit der benötigten Größe und Anzahl an Taschen in die Gelapparatur eingesetzt, der nach dem Erstarren der Agarose wieder entfernt wurde. Das Gel mit dem Schlitten wurde in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Für die Auftragung von Proben zur anschließenden Gelextraktion (2.4.5) wurden 25 µl dieser mit 5 µl 6x Ladepuffer versetzt und anschließend in die Taschen pipettiert. Die Analyse von Plasmidpräparationen (2.4.7) geschah mit 2 µl Probe, die mit 3 µl 6x Ladepuffer und 3 µl ddH₂O versetzt wurde. Als Größenstandard wurden 5 µl GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder und GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für 1 h bei einer Spannung von 100 V. Schließlich wurden die angefärbten Banden unter UV-Licht detektiert und fotografisch festgehalten.

TAE-Puffer:	40 mM TRIS	6x Ladepuffer:	50 % Glycerin
	20 mM Eisessig		0,25 % Bromphenolblau
	2 mM EDTA		in 1x Vol. TAE-Puffer

2.4.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschten Fragmentbanden wurden unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH) laut Anleitung des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 50 µl des, im Kit enthaltenen, EB-Puffers aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.4.6 Transformation von Plasmid-DNA in chemokompetente *E. coli*-Zellen

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde diese in *E. coli* DH5 α transformiert. Die bei -70 °C gelagerten chemokompetente Zellen (2.3.2) wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 μ g DNA oder dem gesamten Ligationsansatzes folgte eine weitere Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Mittels eines Hitzeschocks bei 42 °C für 90 Sekunden und einer anschließenden Abkühlung auf Eis wurde die Plasmid-DNA in *E. coli* DH5 α eingebracht. Zu den abgekühlten Bakterien wurden 800 μ l YT-Medium gegeben, worauf ein Inkubationsschritt für 45 Minuten bei 37 °C und 300 rpm im Thermoschüttler folgte. Anschließend wurde die Bakterienkultur bei 8.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, 600 μ l des Überstandes wurden verworfen und das Pellet in dem restlichen Medium resuspendiert. Schließlich wurde die Bakteriensuspension auf eine YT-Agarplatte mit erforderlichen Zusätzen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.4.7 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von *E. coli* DH5 α vervielfältigt. Je nach Anwendungsart der isolierten DNA wurden unterschiedliche Präparationsarten, die nachfolgend beschrieben sind, verwendet.

2.4.7.1 Minipräparation durch alkalische Lyse

Die analytische Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Dazu wurden zuvor 4 ml Amp/dYT-Medium mit einer Einzelkolonie der transformierten Zellen (2.4.6) angeimpft, über Nacht in einer Rollertrommel bei 37 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (8.000 rpm, RT, 5 min). Die anschließende Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Eluation wurden 50 μ l des, im Kit enthaltenen, EB-Puffers verwendet. Die so gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.4.7.2 CsCl-Plasmidpräparation

Für die Herstellung pseudotypisierter Partikel wurde Plasmid-DNA mit der CsCl-Methode in größerem Maßstab isoliert. 200 ml dYT-Medium mit Ampicillinzusatz wurden mit einer Kolonie der transformierten Zellen (2.4.6) angeimpft und über Nacht inkubiert (37 °C, 180 rpm). Nach einem kurzen Beschleunigen der Bakterienkultur auf 10.000 rpm wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 5 ml der Lösung 1 resuspendiert. Nach einer Überführung der Suspension in 50 ml-Falconröhrchen, wurden die Bakterien durch Zugabe von 10 ml Lösung 2 und einer 5-minütigen Inkubation bei RT lysiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 7,5 ml der Lösung 3 mit anschließender Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Die Abtrennung der Präzipitate wurde durch einen Zentrifugationsschritt bei 8.000 rpm und 4 °C für 20 Minuten realisiert. Zusätzlich wurde der Überstand durch Baumwolle gefiltert. Das Filtrat wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol versetzt und bei RT für 20 Minuten inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5.000 rpm für 20 Minuten bei RT, der nach dem Waschen des Sediments mit 10 ml 70 %igem Ethanol wiederholt wurde. Im nächsten Schritt wurde die DNA in 4 ml TE-Puffer gelöst und mit 4,9 g CsCl sowie 150 µl EtBr (10 mg/ml) versetzt. Die Lösung wurde mit Hilfe von einer Kanüle und Spritze in Quick Seal Tubes (Beckman Coulter GmbH) überführt, austariert (± 50 mg) und dicht verschlossen. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 70.000 rpm und 25 °C über Nacht. Die Entnahme der Plasmid-DNA aus dem Röhrchen wurde mittels einer 0,9 mm x 40 mm Kanüle und einer 2 ml-Spritze realisiert. Auf die Kanüle wurde zum Schutz eine abgeschnittene Pipettenspitze gesetzt. Um einen Unterdruck zu verhindern, wurde vor der Entnahme der DNA aus dem Quick Seal Tube in den oberen Teil desselben ein Luftloch gestochen. Die untere Plasmid-DNA-Bande wurde schließlich entnommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Ethidiumbromid wurde durch dreimalige Zugabe von jeweils 1 ml n-Butanol extrahiert. Die DNA-Präzipitation erfolgte mittels Zugabe von 0,7 Vol. 3 M Natriumacetat und 2 Vol. 97 %igem Ethanol und anschließender Zentrifugation (10.000 rpm, RT, 20 min.). Die Plasmid-DNA wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich in 500 µl TE-Puffer gelöst. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm bestimmt und anschließend auf einen einheitlichen Wert von 1 µg/µl gebracht. Dies geschah entweder durch die Verdünnung mit TE-Puffer oder eine erneute Ethanolpräzipitation (2.4.8).

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 mM EDTA pH 8,0

2.4.7.3 Miraprep-Plasmidpräparation

Bei der Miraprep-Plasmidpräparation handelt es sich um eine Methode, welche mit Hilfe eines Minipräparations-Kits Ausbeuten eines Maxipräparations-Kits erreichen kann. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte nach Protokoll des Autors.⁴⁶ Mittels der Bestimmung von OD₂₆₀ wurde die Konzentration der eluierten DNA ermittelt. Durch eine Verdünnung mit doppelt destilliertem Wasser oder eine Konzentrierung durch Ethanol-fällung (2.4.8) wurde die Lösung auf eine Endkonzentration von 1 µg Plasmid-DNA pro 1 µl gebracht.

2.4.8 Aufkonzentrierung von Plasmid-DNA

Eine Konzentrierung von Plasmid-DNA wurde mittels einer Ethanol-fällung erreicht. Hierfür wurde die DNA-Lösung zunächst mit 0,1 Vol. NaOAc (3 M, pH 5,2) und 2,5 Vol. 100 %igem EtOH versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei -70 °C wurde die DNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 20 min) pelletiert. Die DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, 5 min auf Eis inkubiert und schließlich erneut bei 13.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Pellet in TE-Puffer oder ddH₂O gelöst, so dass die DNA-Lösung eine Endkonzentration von 1 µg/µl aufwies.

2.4.9 Restriktionsendonukleasespaltung

Der Restriktionsverdau wurde mit je 20 U KpnI-/NotI-HF in einem Volumen von 30 µl in CutSmart[®] Puffer (New England Biolabs) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (2.4.4) analysiert und aus dem Gel aufgereinigt (2.4.5).

2.4.10 Herstellung von prM/E-Expressionsvektoren

2.4.10.1 Klonierung von prM/E-Fragmenten in TA-Klonierungsvektor

Die amplifizierten prM/E-Sequenzen (2.4.3.1 und 2.4.3.2) wurden mit Hilfe des TA Cloning Kits (Thermo Fisher Scientific) in den Vektor pCR™ 2.1 nach Herstellerangaben kloniert. Anschließend wurde eine Transformation in chemokompetente *E. coli* DH5 α durchgeführt (2.4.6). Um eine Blau-Weiß-Selektion zu ermöglichen, wurden den verwendeten Agarplatten neben Ampicillin zusätzlich IPTG und X-Gal zugesetzt. Von diesen Platten wurden weiße Kolonien gepickt und über Nacht in je 4 ml Amp/dYT-Medium bei 37 °C in einer Rollertrommel inkubiert. Die Isolation der Plasmid-DNA wurde mittels des GeneJET Plasmid Miniprep Kits realisiert (2.4.7.1) und der Erfolg durch Sequenzierung (2.4.11) überprüft.

2.4.10.2 Klonierung von prM/E-Fragmenten in Expressionsvektor

Enthielten die zuvor hergestellten Klonierungsvektoren das gewünschte prM/E-Fragment (2.4.10.1) wurden diese mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen KpnI-HF und NotI-HF geschnitten (2.4.9). Nach einer Agarosegelelektrophorese (2.4.4) wurden die entsprechenden Banden der prM/E-Fragmente aus dem Agarosegel geschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits isoliert und aufgereinigt (2.4.5). Für die Konzentrationsbestimmung wurden die DNA-Fragmente erneut auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen (2.4.4). Anschließend wurden die prM/E-Fragmente mit dem geschnittenen pHA-Vektor in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 4 gemischt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 2 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer bei 4 °C über Nacht. Nach einer Transformation des Ligationsansatzes in chemokompetente *E. coli* (2.4.6) wurde erneut eine Plasmid-Minipräparation (2.4.7.1) durchgeführt. Mittels einer Gelelektrophorese (2.4.4) wurde die Größe abgeschätzt und die Sequenz schließlich durch Sequenzierung überprüft (2.4.11). Für die Verwendung der Expressionsvektoren zur Herstellung pseudotypisierter Partikel wurden diese im Anschluss mit einer Plasmidpräparation im größeren Maßstab isoliert und aufgereinigt (2.4.7).

2.4.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der DNA wurden an die Firma LGC Genomics (Berlin, www.lgcgroup.com) in Auftrag gegeben und dort mit einem automatisierten Verfahren nach Sanger durchgeführt. Für die Sequenzierung der pCRTM2.1-Vektoren wurden die Oligonukleotide M13(-21)F und M13(-29)R verwendet, für pHA-Expressionsvektoren T7prom und pcDNA3.1-R. Die elektronisch übermittelten Sequenzen wurden mit den Programmen MEGA 7⁴⁷, ClustalX 2.1⁴⁸ und BioEdit analysiert. Zusätzlich erfolgte ein Abgleich mit dem *Basic Local Alignment Search Tool* (kurz BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) in der DNA-Sequenzdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Anzucht eukaryotischer Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellkulturflaschen mit supplementiertem DMEM- oder RPMI-Medium. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen von 3-5 Tagen, je nach Zelldichte rekultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin/EDTA inkubiert um sie abzulösen. Für die Rekultivierung wurde die Zellsuspension in Medium aufgenommen, nach Wunsch verdünnt und erneut in einer Zellkulturflasche ausgesät.

Medien für die Zellkultur

DMEM suppl.	DMEM (1x) + GlutaMAX TM -I 10 % FBS 1 % Pen-Strep
RPMI suppl.	RPMI 1640 (1x) + GlutaMAX TM -I 10 % FBS 1 % Pen-Strep

2.5.2 Herstellung pseudotypisierter HIV-1-Partikel

Die pseudotypisierten Partikel wurden durch eine Kotransfektion in HEK293T-Zellen mit Hilfe von PEI hergestellt. Vor den Versuchen wurde eine sterilfiltrierte 25 mM Chloroquindiphosphat-Lösung hergestellt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurde eine PEI-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -70 °C. Das Auftauen der Lösungen geschah bei 4 °C mit einer maximalen Lagerung von zwei Monaten bei dieser Temperatur. Für jeden neuen PEI-Ansatz muss das optimale DNA zu PEI Verhältnis empirisch ermittelt werden. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen so in die Kavität einer 24-well-Platte ausgesät, dass diese nach 20 Stunden Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) zu 80 % bedeckt waren. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und durch 420 µl DMEM suppl. mit 25 µM Chloroquindiphosphat ersetzt und für 5 h inkubiert. Die DNA wurde zunächst in einem Reaktionsgefäß mit OptiPro SFM versetzt – 12,4 µg des Expressionsvektors und 2,6 µg des Luciferase-Reporter-Vektors wurden auf ein Gesamtvolumen von 40 µl gebracht. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde die Verdünnung von PEI durchgeführt, bevor letztere langsam zu der verdünnten DNA getropft wurde. Nach einer Inkubation für 20 Minuten bei RT wurde die Transfektionslösung vorsichtig zu den ausgesäten HEK293T-Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Transfektionslösung vorsichtig abgenommen und durch 1 ml DMEM suppl. ersetzt. Die Auswertung der Transfektion erfolgte nach 48 h. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe des Mediums gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für 1 min wurde der partikelhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -70 °C gelagert. Die Zellen wurden in 100 µl Lysispuffer gelöst und bei -20 °C aufbewahrt.

Lysispuffer:	25 mM TRIS
	2 mM EDTA
	2 mM DTT
	10 % Glycerol
	1 % Triton X-100

2.5.3 Infektion eukaryotischer Zellen mit pseudotypisierten HIV-1-Partikeln

Die Infektion eukaryotischer Zellen mit den partikelhaltigen Überständen aus der Transfektion wurde in weißen 96-*well*-Platten durchgeführt. Die zu infizierenden Zellen wurden einen Tag zuvor mit einer Dichte ausgesät, dass zum Zeitpunkt der Infektion eine Konfluenz von 80 % resultierte. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht. Das Medium wurde verworfen und die Zellen wurden mit den pseudotypisierten HIV-1-Partikeln infiziert. Dafür wurden zunächst definierte Verdünnungen (bezogen auf 200 µl Gesamtvolumen zum Ende der Infektion) der Überstände mit DMEM suppl. in einem Volumen von 100 µl hergestellt. Die entsprechende Menge des Mediums wurde zunächst in die Kavitäten mit den Zellen vorgelegt und anschließend die partikelhaltigen Überstände hinzugegeben. Anschließend an eine einstündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂, wurden weitere 100 µl DMEM suppl. hinzugegeben. Nach weiteren drei Tagen Inkubation wurde die Infektionseffizienz mit Hilfe des Luciferase-Assays gemessen (2.5.4).

2.5.4 Luciferase-Assay

Sowohl die Transfektionseffizienz, als auch die Effizienz der Infektion von eukaryotischen Zellen mit pseudotypisierten Partikeln wurden mittels eines Luciferase-Assays ermittelt. Die Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde in einer unbeschichteten, weißen 96-*well*-Platte durchgeführt. Hierfür wurden 50 µl der aufgetauten, lysierten Zellen mit 50 µl Bright-Glo™ (Promega Corporation) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Für die Messung der Infektionseffizienz wurde das Medium verworfen. Zu den Zellen wurden 100 µl Bright-Glo™ gegeben und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Die anschließende Messung wurde mit Hilfe eines Mikroplattenluminometers und dem Programm Mikro Win 2000 durchgeführt. Für eine Durchmischung der Probe mit dem Substrat wurde die Platte zu Beginn für zwei Sekunden geschüttelt. Die eigentliche Messung wurde auf eine Sekunde pro *well* eingestellt. Die detektierten relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLUs) beschreiben die Lichtemission, die bei der Umsetzung des luciferinhaltigen Substrats zu Oxiluciferin durch Luciferase entsteht.

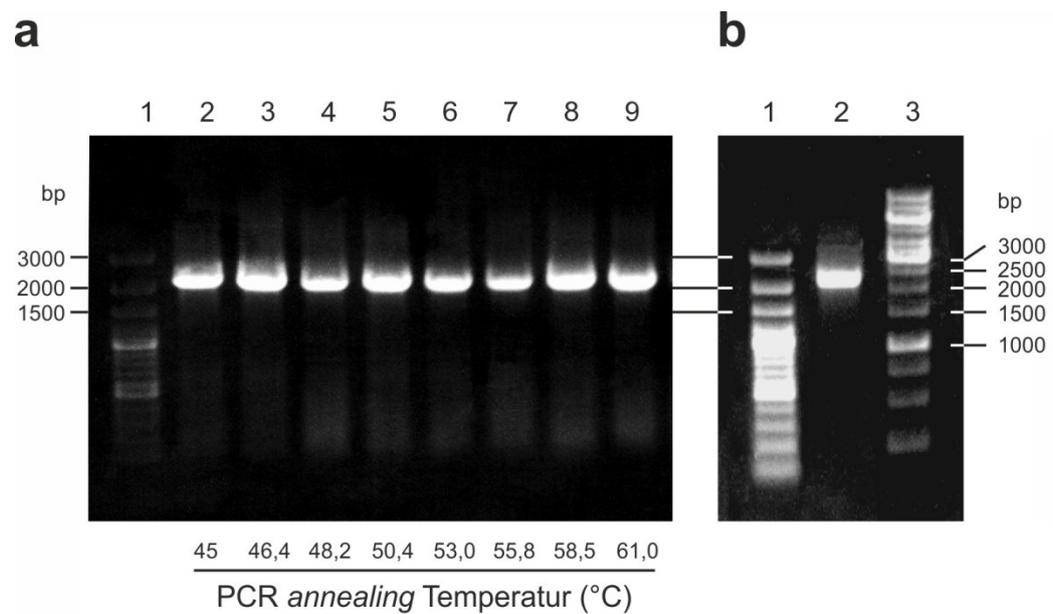


Abb. 5: Amplifiziertes prM/E-DNA-Fragment des Usutuvirus-Isolats BH65/11-02-03

- a) Temperatur-Gradienten-Amplifikation des prM/E-kodierenden Abschnitts. Das mit den PCR-Primern *USUKpnl-for* und *USUNotI-rev* amplifizierte DNA-Fragment besaß die erwartete Größe von 2.095 bp.

Spur 1: DNA-Marker, GeneRuler™ 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific)

Spur 2-9: amplifiziertes prM/E-DNA-Fragment.

- b) Das prM/E-DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aufgereinigt. Die Bande in Spur 2 entspricht 25 µl von insgesamt 50 µl aufgereinigter prM/E-DNA. Ein Fünftel der dargestellt DNA Menge (5µl) wurde für die Ligation in pCR™ 2.1 eingesetzt.

Spur 1: DNA-Marker, GeneRuler™ 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific)

Spur 2: aufgereinigtes prM/E-DNA-Fragment, USUV BH65/11-02-03

Spur 3: DNA-Marker, GeneRuler™ 1 kb (Thermo Fisher Scientific)

<u>CTT</u>	<u>GGT</u>	<u>ACC</u>	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ATG</u>	<u>GGC</u>	<u>AAC</u>	<u>AAT</u>	<u>GGA</u>	<u>CCA</u>	<u>GGA</u>	<u>CTA</u>	<u>GTG</u>	<u>ATG</u>	<u>ATC</u>	<u>ATA</u>	<u>ACA</u>	<u>CTC</u>	<u>ATG</u>	<u>ACG</u>	<u>GTT</u>	<u>GTT</u>	<u>TCA</u>	<u>ATG</u>	<u>GTT</u>	<u>TCC</u>	<u>TCT</u>	<u>TTA</u>	
			10			M	G	N	N	G	P	G	L	V	M	I	I	T	L	M	T	V	V	S	M	V	S	S	S	L
						20	->C			30			40			50			60			70			80					
AAG	CTT	TCC	AAC	TTC	CAG	GGG	AAA	GTC	ATG	ATG	ACC	ATC	AAC	CGC	ACT	GAT	ATG	GCA	GAT	GTC	ATT	GTT	GTT	CCC	ACG	CAA	CAT	GGG	AAA	
K	L	S	N	F	Q	G	K	V	M	M	T	I	N	A	T	D	M	A	D	V	I	V	V	P	T	Q	H	G	K	
->prM			100			110			120			130			140			150			160			170						
AAC	CAG	TGC	TGG	ATT	AGA	GCC	ATG	GAT	GTC	GGG	TAC	ATG	TGT	GAT	GAT	ACC	ATC	ACT	TAT	GAA	TGC	CCC	AAA	CTG	GAT	GCA	GGA	AAT	GAC	
N	Q	C	W	I	R	A	M	D	V	G	Y	M	C	D	D	T	I	T	Y	E	C	P	K	L	D	A	G	N	D	
			190			200			210			220			230			240			250			260						
CCA	GAA	GAC	ATT	GAC	TGT	TGG	TGT	GAC	AAA	CAA	CCC	ATG	TAC	GTC	CAC	TAT	GGA	AGG	TGC	ACA	AGA	ACC	AGA	CAC	TCG	AAG	CGG	AGT	CGG	
P	E	D	I	D	C	W	C	D	K	Q	P	M	A	V	H	G	R	C	T	R	R	T	H	S	K	R	S	R		
			280			290			300			310			320			330			340			350						
CGG	TCG	ATC	GCA	GTG	CAG	ACG	CAC	GGG	GAG	AGT	ATG	CTG	GCT	AAC	AAG	AAG	GAT	GCT	TGG	CTA	GAC	TCA	ACC	AAG	GCT	TCG	AGA	TAC	CTG	
R	S	I	A	V	Q	T	H	G	E	S	M	L	A	N	K	K	D	A	W	L	D	S	T	K	A	S	R	Y	L	
->M			370			380			390			400			410			420			430			440						
ATG	AAG	ACT	GAG	AAT	TGG	ATT	ATC	AGG	AAT	CCT	GGG	TAT	GCT	TTT	GTA	GCT	GTC	CTC	TTG	GGC	TGG	ATG	CTG	GGA	AGC	AAC	AAT	GGA	CAA	
M	K	T	E	N	W	I	I	R	N	P	G	Y	A	F	V	A	V	L	L	G	W	M	L	G	S	N	N	G	Q	
			460			470			480			490			500			510			520			530						
AGG	GTC	GTT	TTC	GTC	GTT	CTC	TTG	CTC	CTT	GTG	GCG	CCT	GCT	TAT	AGC	TTC	AAC	TGC	CTT	GGT	ATG	AGC	AAC	AGA	GAC	TTC	CTT	GAG	GGA	
R	V	V	F	V	V	L	L	L	L	V	A	P	A	S	C	I	N	C	L	G	M	S	N	R	D	F	L	E	G	
			550			560			570			580			590			600			610			620						
GTC	TCT	GGT	GCT	ACC	TGG	GTT	GAC	GTG	GTT	TTG	GAA	GGT	GAC	AGC	TGC	ATA	ACC	ATC	ATG	GCC	AAG	GAC	AAG	CCG	ACC	ATT	GAC	ATT	AAG	
V	S	G	A	T	W	V	D	V	V	L	E	G	D	S	C	I	T	I	M	A	K	D	K	P	T	I	D	I	K	
			640			650			660			670			680			690			700			710						
ATG	ATG	GAA	ACT	GAA	GCC	ACG	AAC	CTG	GCT	GAA	GTG	AGA	AGC	TAC	TGC	TAT	CTA	GCC	ACT	GTC	TCA	GAT	GTT	TCA	ACT	GTC	TCC	AAC	TGT	
M	M	E	T	A	A	T	N	L	A	E	V	R	S	Y	C	Y	L	A	T	V	S	D	V	S	T	V	S	N	C	
			730			740			750			760			770			780			790			800						
CCA	ACA	ACT	GGG	GAG	GCC	CAC	AAT	CCT	AAG	AGA	GCT	GAG	GAC	ACG	TAC	GTG	TGC	AAA	AGT	GGT	GTC	ACT	GAC	AGG	GGC	TGG	GGC	AAT	GGC	
P	T	T	G	E	A	H	N	P	K	R	A	E	D	T	Y	V	C	K	S	G	V	T	D	R	G	W	G	N	G	
			820			830			840			850			860			870			880			890						
TGT	GGA	CTA	TTT	GGC	AAA	GGA	AGT	ATA	GAC	ACG	TGT	GCC	AAC	TTC	ACC	TGC	TCC	CTG	AAA	GCG	ATG	GGC	CGG	ATG	ATC	CAA	CCG	GAA	AAT	
C	G	L	F	G	K	G	S	I	D	T	C	A	N	F	T	C	S	L	K	A	M	G	R	M	I	Q	P	E	N	
			910			920			930			940			950			960			970			980						
GTT	AAG	TAT	GAA	GTG	GGA	ATC	TTT	ATA	CAT	GGT	TCT	ACC	AGC	TCT	GAC	ACT	CAC	GGC	AAC	TAT	TCT	TCA	CAA	CTA	GGA	GCA	TCA	CAG	GCT	
V	K	Y	E	V	G	I	F	I	H	G	S	T	S	S	D	T	H	G	N	Y	S	S	Q	L	G	A	S	Q	A	
			1000			1010			1020			1030			1040			1050			1060			1070						
GGG	CGG	TTT	ACC	ATC	ACT	CCC	AAC	TCC	CCA	GCC	ATC	ACT	GTG	AAG	ATG	GGT	GAC	TAT	GGA	GAA	ATA	TCA	GTT	GAG	TGT	GAA	CCA	AGA	AAC	
G	R	F	T	I	T	P	N	S	P	A	I	T	V	K	M	G	D	Y	G	E	I	S	V	E	C	E	P	R	N	
			1090			1100			1110			1120			1130			1140			1150			1160						
GGG	TTG	AAC	ACC	GAG	GCA	TAC	TAC	ATC	ATG	TCA	GTG	GGC	ACC	AAA	CAC	TTC	CTT	GTC	CAT	AGA	GAA	TGG	TTT	AAT	GAC	TTG	GCC	CTC	CCA	
G	L	N	T	E	A	Y	Y	I	M	S	V	G	T	K	H	F	L	V	H	R	E	W	F	N	D	L	A	L	P	
			1180			1190			1200			1210			1220			1230			1240			1250						
TGG	ACT	TCA	CCA	GCT	AGC	TCA	AAT	TGG	AGA	AAT	AGA	GAG	ATA	CTA	CTA	GAG	TTC	GAA	GAG	CCC	CAT	GCC	ACA	AAG	CAA	TCA	GTT	GTG	GCG	
W	T	S	P	A	S	S	N	W	R	N	R	E	I	L	L	E	F	E	E	P	H	A	T	K	Q	S	V	V	A	
			1270			1280			1290			1300			1310			1320			1330			1340						
CTT	GGT	TCC	CAG	GAA	GGT	GCT	TTG	CAC	CAG	GCC	TTG	GCA	GGA	GCT	GTT	CCA	GTG	TCT	TTT	TCG	GGC	AGT	GTC	AAG	CTC	ACA	<u>TCT</u>	<u>GGT</u>	<u>CAT</u>	
L	G	S	Q	E	G	A	L	H	Q	A	L	A	G	A	V	P	V	S	F	S	G	S	V	K	L	T	S	G	H	
			1360			1370			1380			1390			1400			1410			1420			1430						
<u>CTC</u>	<u>AAG</u>	<u>TGT</u>	<u>CGA</u>	<u>GTC</u>	<u>AAG</u>	<u>ATG</u>	<u>GAA</u>	<u>AGG</u>	<u>TTG</u>	<u>ACA</u>	<u>CTA</u>	<u>AAA</u>	<u>GGC</u>	<u>ACC</u>	<u>ACC</u>	<u>TAC</u>	<u>GGC</u>	<u>ATG</u>	<u>TGC</u>	<u>ACG</u>	<u>GAA</u>	<u>AAG</u>	<u>TTT</u>	<u>TCT</u>	<u>TTT</u>	<u>GCA</u>	<u>AAA</u>	<u>AAT</u>	<u>CCG</u>	
L	K	C	R	V	K	M	E	R	L	T	L	K	G	T	T	Y	G	M	C	T	E	K	F	S	F	A	K	N	P	
			1450			1460			1470			1480			1490			1500			1510			1520						
GCT	GAC	ACG	GGT	CAC	GGC	ACT	GTG	GTC	CTT	GAA	CTG	CAG	TAC	ACG	GGA	TCT	GAC	GGA	CCT	TGC	AAA	ATC	CCA	ATT	TCC	ATT	GTG	GCA	TCA	
A	D	T	G	H	G	T	V	V	L	E	L	Q	Y	T	G	S	D	G	P	C	K	I	P	I	S	I	V	A	S	
			1540			1550			1560			1570			1580			1590			1600			1610						
CTT	TCC	GAT	CTC	ACC	CCC	ATT	GGT	AGA	ATG	GTT	ACA	GCA	AAC	CCT	TAT	GTG	GCT	TCA	TCC	GAA	GCC	AAC	GCG	AAA	GTG	TTG	GTT	GAG	ATG	
L	S	D	L	T	P	I	G	R	M	V	T	A	N	P	Y	V	A	S	S	E	A	N	A	K	V	L	V	E	M	
			1630			1640			1650			1660			1670			1680			1690			1700						
GAA	CCA	CCA	TTT	GGA	GAT	TCA	TAT	ATT	GTG	GTT	GGA	AGA	GGG	GAT	AAG	CAG	ATA	AAC	CAT	CAC	TGG	CAC	AAA	GCA	GGA	AGT	TCC	ATT	GGA	
E	P	P	F	G	D	S	Y	I	V	V	G	R	G	D	K	Q	I	N	H	H	W	H	K	A	G	S	S	I	G	
			1720			1730			1740			1750			1760			1770			1780			1790						
AAA	GCG	TTC	ATC	ACC	ACT	ATC	AAA	GGG	GCA	CAG	CGT	CTA	GCT	GCC	CTA	GGC	GAC	ACA	GCG	TGG	GAC	TTT	GGG	TCG	GTC	GGA	GGG	ATT	TTT	
K	A	F	I	T	T	I	K	G	A	Q	R	L	A	A	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S	V	G	G	I	F	
			1810			1820			1830			1840			1850			1860			1870			1880						
AAT	TCT	GTA	GGA	AAG	GCG	GTA	CAT	CAG	GTC	TTT	GGA	GGA	GCC	TTC	AGA	ACT	CTC	TTT	GGT	GGC	ATG	TCC	TGG	ATC	ACC	CAG	GGT	CTA	ATG	
N	S	V	G	K	A	V	H	Q	V	F	G	G	A	F	R	T	L	F	G	G	M	S	W	I	T	Q	G	L	M	
			1900			1910			1920			1930			1940			1950			1960			1970						
GGA	GCT	CTG	CTT	CTA	TGG	ATG	GGG	GTG	AAT	GCG	AGA	GAT	CGA	TCC	ATC	GCA	CTG	GTG	ATG	TTA	GCC	ACG	GGA	GGG	<u>GTG</u>	<u>CTC</u>	<u>CTC</u>	<u>TTT</u>	<u>CTC</u>	
G	A	L	L	L	W	M	G	V	N	A	R	D	R	S	I	A	L	V	M	L	A	T	G	G	V	L	L	F	L	
			1990			2000			2010			2020			2030			2040			2050			2060						
<u>GCC</u>	<u>ACA</u>	<u>AAC</u> </																												

3.1.2 Klonierung der prM/E-Hüllproteine des West-Nil-Virus

Mit dem Virusisolat NY-99 infizierte VeroB4-Zellkulturüberstände wurden für die Klonierung verwendet. Die Vorgehensweise erfolgte hierbei analog zu der beim Usutuvirus (3.1.1). Als PCR-Primer für die Amplifikation der kodierenden Genfragmente dienten ebenfalls jene, denen die Schnittstellen KpnI und NotI angehängt wurden.

Oligo 5 WN-KpnI-*for*: 5'-CTTGGTACCGCCGCGCCCATGGGAGGAA
AGACCGGAATTGCAG

Oligo 6 WN-NotI-*rev*: 5'-CTGCGGCCGCAATTAAGCGTGCACGTTC
ACGGAGAGGAAGAGCAGA

Bei der durchgeführten Gradienten-PCR mit einem Temperaturgradienten von 45-61 °C wurde eine optimale *annealing*-Temperatur von 61 °C ermittelt. Nach der elektrophoretischen Analyse wurden die DNA-Banden, die einer *annealing*-Temperatur von 58,5 °C und 61,0 °C entsprachen ausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 8). Im Anschluss an die Klonierung in den pCRTM2.1-Vektor wurde das Plasmid mit den LGC-Primern M13(-21)F und M13(-29)R sequenziert und anschließend auf ihre Identität überprüft. Hierbei ergaben sich keine Differenzen zu der Sequenz des West-Nil-Virus mit der GenBank-Nr. KC407666 (Abb. 9). Im Anschluss an die Sequenzierung wurde das entsprechende prM/E-Fragment in das linearisierte Plasmid pHA kloniert. Nach einer Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde die Sequenz erneut überprüft und bestätigt (Abb. 9). Der Klon trägt die Bezeichnung pHA-WN-NY.

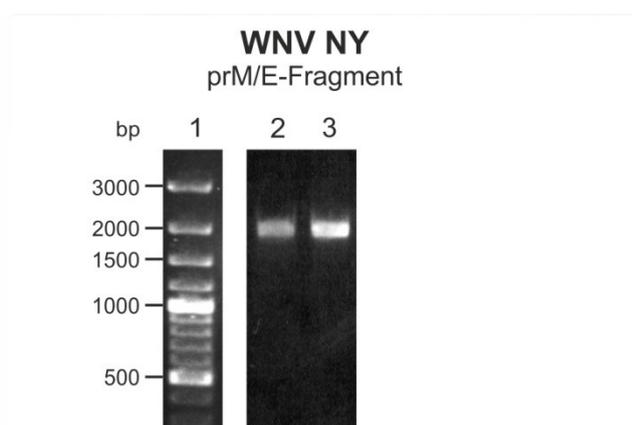


Abb. 8: Aufgereinigtes prM/E-PCR-Amplifikat von WNV New York

- Spur 1: DNA-Marker, GeneRulerTM 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific)
- Spur 2: aufgereinigtes PCR-Amplifikat, *annealing*-Temperatur 58,5 °C
- Spur 3: aufgereinigtes PCR-Amplifikat, *annealing*-Temperatur 61,0 °C

3.1.3 Klonierung der prM/E-Hüllproteine des Japanische-Enzephalitis-Virus

Virale RNA für die Klonierung von prM/E-Hüllproteinen des JEV wurde aus VeroB4-Zellkulturüberständen, die mit JEV Nakayama infiziert waren, isoliert. Dabei wurden zwei verschiedene Proben verwendet und identisch behandelt. Die Klonierung erfolgte wie beim Usutuvirus (3.1.1). Für die Amplifikation wurden folgende Primer benutzt:

Oligo 7 JE-KpnI-*for*: 5'-CTTGGTACCGCCGCGCCCATGCAAAACA
AAAGAGGAGGAAATG

Oligo 8 JE-NotI-*rev*: 5'-CTGCGGCCGCAATTAAGCATGCACATTG
GTCGCTAAGAACACGAGC

Mit Hilfe einer PCR mit einem Temperaturgradienten von 45-65 °C wurde eine optimale *annealing*-Temperatur von 46 °C ermittelt (Abb. 10). Nach der Klonierung der prM/E-Fragmente in den Vektor pCR™2.1 und einer Aufreinigung der DNA-Produkte wurde die Sequenz mittels Sequenzierung mit den M13-Primern überprüft. Bei einem Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der Sequenz des JEV mit der GenBank-Nr. HE861351 wurden zwei stille Mutationen (T676C und G1203A) und zwei sinnverändernde Mutationen (A150C und A1430G) festgestellt (Abb. 11). Auf die Sequenzierung folgte eine Klonierung in den Expressionsvektor pHA. Nach einer erneuten Sequenzierung konnte die Richtigkeit der Insertion bestätigt werden (Abb. 11). Der Klon trägt die Bezeichnung pHA-JE-NAK.

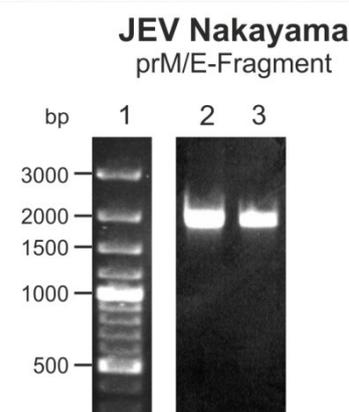


Abb. 10: Aufgereinigtes prM/E-PCR-Amplifikat von JEV Nakayama

- Spur 1: DNA-Marker, GeneRuler™ 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific)
 Spur 2: aufgereinigtes PCR-Amplifikat, *annealing*-Temperatur 46,2 °C
 Spur 3: aufgereinigtes PCR-Amplifikat, *annealing*-Temperatur 48,2 °C

3.1.4 Klonierung der prM/E-Hüllproteine des Gelbfiebervirus

Um die Klonierung der YFV-prM/E-Hüllproteine durchführen zu können, wurden zwei verschiedene Zellkulturüberstände von VeroB4-Zellen benutzt, die mit dem Impfstamm 17D infiziert waren. Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgten analog zu der vom Usutuvirus (3.1.1). Mittels spezifisch designter PCR-Primer mit den Schnittstellen für KpnI und NotI wurde eine PCR durchgeführt.

Oligo 9 YF-KpnI-*for*: 5'-CTTGGTACCGCCGCGCCCATGTCCCATG
ATGTTCTGACTGTGC

Oligo 10 YF-NotI-*rev*: 5'-CTGCGGCCGCAATTATTGATCCGCCCCA
ACTCCTAGAGACAAAAAC

In einem Gradienten-Cycler wurde eine PCR mit einem Temperaturgradienten von 45-65 °C durchgeführt. Die bei einer *annealing*-Temperatur von 45, 46,4 und 48,2 °C amplifizierte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel isoliert und aufgereinigt (Abb. 12). Im Anschluss an die Klonierung wurde die Plasmid-DNA von pCR™2.1-YF-17D sequenziert. Ein Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der Sequenz YF-17D GenBank-Nr. MG051217 ergab dabei keine Differenzen (Abb. 13). Nach der Sequenzanalyse wurde die Klonierung in den Expressionsvektor pHA durchgeführt und im Anschluss die Richtigkeit der Insertion erneut durch Sequenzierung bestätigt (Abb. 13). Der Klon trägt die Bezeichnung pHA-YF-17D.

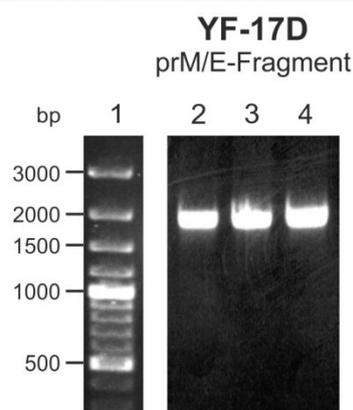


Abb. 12: Aufgereinigtes prM/E-PCR-Amplifikat von YF-17D

- Spur 1: DNA-Marker, GeneRuler™ 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific)
- Spur 2: aufgereinigtes PCR-Amplifikat, *annealing*-Temperatur 45,0 °C
- Spur 3: aufgereinigtes PCR-Amplifikat, *annealing*-Temperatur 46,4 °C
- Spur 4: aufgereinigtes PCR-Amplifikat, *annealing*-Temperatur 48,2 °C

CTT	GGT	ACC	GCC	GCC	GCC	ATG	ATG	TCC	CAT	GAT	GTT	CTG	ACT	GTG	CAA	TTC	CTA	ATT	TTG	GGA	ATG	CTG	TTG	ATG	ACG	GGT	GGA	GTG	ACC		
			10			M	M	S	H	D	V	L	T	V	Q	F	50	L	I	L	G	M	L	L	M	T	G	V	T		
						20						30				40															
TTG	GTG	CGG	AAA	AAC	AGA	TGG	TTG	CTC	CTA	AAT	GTG	ACA	TCT	GAG	GAC	CTC	GGG	AAA	ACA	TTC	TCT	GTG	GGC	ACA	GGC	AAC	TGC	ACA	ACA		
L	V	R	K	N	R	W	L	L	L	N	V	T	S	E	D	L	G	K	T	F	S	V	G	T	G	N	C	T	T		
			100			110					120					130							140								
AAC	ATT	TTG	GAA	GCC	AAG	TAC	TGG	TGC	CCA	GAC	TCA	ATG	GAA	TAC	AAC	TGT	CCC	AAT	CTC	AGT	CCA	AGA	GAG	GAG	CCA	GAT	GAC	ATT	GAT		
N	I	L	E	A	K	Y	W	C	P	D	S	M	E	Y	N	C	P	N	L	S	P	R	E	E	P	D	D	I	D		
			190			200					210					220							230								
TGC	TGG	TGC	TAT	GGG	GTG	GAA	AAC	GTT	AGA	GTC	GCA	TAT	GGT	AAG	TGT	GAC	TCA	GCA	GGC	AGG	TCT	AGG	AGG	TCA	AGA	AGG	GCC	ATT	GAC		
C	W	C	Y	G	V	E	N	V	R	V	A	Y	G	K	C	D	S	A	G	R	S	R	R	S	R	R	A	I	D		
			280			290					300					310							320								
TTG	CCT	ACG	CAT	GAA	AAC	CAT	GGT	TTG	AAG	ACC	CGG	CAA	GAA	AAA	TGG	ATG	ACT	GGA	AGA	ATG	GGT	GAA	AGG	CAA	CTC	CAA	AAG	ATT	GAG		
L	P	T	H	E	N	H	G	L	K	T	R	Q	E	K	W	M	T	G	R	M	G	E	R	Q	L	Q	K	I	E		
			370			380					390					400							410								
AGA	TGG	TTC	GTG	AGG	AAC	CCC	TTT	TTT	GCA	GTG	ACG	GCT	CTG	ACC	ATT	GCC	TAC	CTT	GTG	GGA	AGC	AAC	ATG	ACG	CAA	CGA	GTC	GTG	ATT		
R	W	F	V	R	N	P	F	F	A	V	T	A	L	T	I	A	Y	L	V	G	S	N	M	T	Q	R	V	V	I		
			460			470					480					490							500								
GCC	CTA	CTG	GTC	TTG	GCT	GTT	GGT	CCG	GCC	TAC	TCA	GCT	CAC	TGC	ATT	GGA	ATT	ACT	GAC	AGG	GAT	TTC	ATT	GAG	GGG	GTG	CAT	GGA	GGA		
A	L	L	V	L	A	V	G	P	A	Y	S	A	H	C	I	I	I	T	D	R	D	F	I	E	G	V	H	G	G		
			550			560					570					580							590								
ACT	TGG	GTT	TCA	GCT	ACC	CTG	GAG	CAA	GAC	AAG	TGT	GTC	ACT	GTT	ATG	GCC	CCT	GAC	AAG	CCT	TCA	TTG	GAC	ATC	TCA	CTA	GAG	ACA	GTA		
T	W	V	S	A	T	L	E	Q	D	K	C	V	T	V	M	A	P	D	K	P	S	L	D	I	S	L	E	T	V		
			640			650					660					670							680								
GCC	ATT	GAT	AGA	CCT	GCT	GAG	GTG	AGG	AAA	GTG	TGT	TAC	AAT	GCA	GTT	CTC	ACT	CAT	GTG	AAG	ATT	AAT	GAC	AAG	TGC	CCC	AGC	ACT	GGA		
A	I	D	R	P	A	E	V	R	K	V	C	Y	N	A	V	L	T	H	V	K	I	N	D	K	C	P	S	T	G		
			730			740					750					760							770								
GAG	GCC	CAC	CTA	GCT	GAA	GAG	AAC	GAA	GGG	GAC	AAT	GCG	TGC	AAG	CGC	ACT	TAT	TCT	GAT	AGA	GGC	TGG	GGC	AAT	GGC	TGT	GGC	CTA	TTT		
E	A	H	L	A	E	E	N	E	G	D	N	A	C	K	R	T	Y	S	D	R	G	W	G	N	G	C	G	L	F		
			820			830					840					850							860								
GGG	AAA	GGG	AGC	ATT	GTG	GCA	TGC	GCC	AAA	TTC	ACT	TGT	GCC	AAA	TCC	ATG	AGT	TTG	TTT	GAG	GTT	GAT	CAG	ACC	AAA	ATT	CAG	TAT	GTC		
G	K	G	S	I	V	A	C	A	K	F	T	C	A	K	S	M	S	L	F	E	V	D	Q	T	K	I	Q	Y	V		
			910			920					930					940							950								
ATC	AGA	GCA	CAA	TTG	CAT	GTA	GGG	GCC	AAG	CAG	GAA	AAT	TGG	AAT	ACC	GAC	ATT	AAG	ACT	CTC	AAG	TTT	GAT	GCC	CTG	TCA	GGC	TCC	CAG		
I	R	A	Q	L	H	V	G	A	K	Q	E	N	W	N	T	D	I	K	T	L	K	F	D	A	L	S	G	S	Q		
			1000			1010					1020					1030							1040								
GAA	GTC	GAG	TTC	ATT	GGG	TAT	GGA	AAA	GCT	ACA	CTG	GAA	TGC	CAG	GTG	CAA	ACT	GCG	GTG	GAC	TTT	GGT	AAC	AGT	TAC	ATC	GCT	GAG	ATG		
E	V	E	F	I	G	Y	G	K	A	T	L	E	C	Q	V	T	A	V	D	F	G	N	S	Y	I	A	E	M			
			1090			1100					1110					1120							1130								
GAA	ACA	GAG	AGC	TGG	ATA	GTG	GAC	AGA	CAG	TGG	GCC	CAG	GAC	TTG	ACC	CTG	CCA	TGG	CAG	AGT	GGA	AGT	GGC	GGG	GTG	TGG	AGA	GAG	ATG		
E	T	E	S	W	I	V	D	R	Q	W	A	Q	D	L	T	L	P	W	Q	S	G	S	G	G	V	W	R	E	M		
			1180			1190					1200					1210							1220								
CAT	CAT	CTT	GTC	GAA	TTT	GAA	CCT	CCG	CAT	GCC	GCC	ACT	ATC	AGA	GTA	CTG	GCC	CTG	GGA	AAC	CAG	GAA	GGC	TCC	TTG	AAA	ACA	GCT	CTT		
H	H	L	V	E	F	E	P	P	H	A	A	T	I	R	V	L	A	L	G	N	Q	E	G	S	L	K	T	A	L		
			1270			1280					1290					1300							1310								
ACT	GGC	GCA	ATG	AGG	GTT	ACA	AAG	GAC	ACA	AAT	GAC	AAC	AAC	CTT	TAC	AAA	CTA	CAT	GGT	GGA	CAT	GTT	TCT	TGC	AGA	GTG	AAA	TTG	TCA		
T	G	A	M	R	V	T	K	D	T	N	D	N	N	L	Y	K	L	H	G	G	H	V	S	C	R	V	K	L	S		
			1360			1370					1380					1390							1400								
GCT	TTG	ACA	CTC	AAG	GGG	ACA	TCC	TAC	AAA	ATA	TGC	ACT	GAC	AAA	ATG	TTT	TTT	GTC	AAG	AAC	CCA	ACT	GAC	ACT	GGC	CAT	GGC	ACT	GTT		
A	L	T	L	K	G	T	S	Y	K	I	C	T	D	K	M	F	F	V	K	N	P	T	D	T	G	H	G	T	V		
			1450			1460					1470					1480							1490								
GTG	ATG	CAG	GTG	AAA	GTG	TCA	AAA	GGA	GCC	CCC	TGC	AGG	ATT	CCA	GTG	ATA	GTA	GCT	GAT	GAT	CTT	ACA	GCG	GCA	ATC	AAT	AAA	GGC	ATT		
V	M	Q	V	K	V	S	K	G	A	P	C	R	I	P	V	I	V	A	D	D	L	T	A	A	I	N	K	G	I		
			1540			1550					1560					1570							1580								
TTG	GTT	ACA	GTT	AAC	CCC	ATC	GCC	TCA	ACC	AAT	GAT	GAT	GAA	GTG	CTG	ATT	GAG	GTG	AAC	CCA	CCT	TTT	GGA	GAC	AGC	TAC	ATT	ATC	GTT		
L	V	T	V	N	P	I	A	S	T	N	D	D	E	V	L	I	E	V	N	P	P	F	G	D	S	Y	I	I	V		
			1630			1640					1650					1660							1670								
GGG	AGA	GGA	GAT	TCA	CGT	CTC	ACT	TAC	CAG	TGG	CAC	AAA	GAG	GGA	AGC	TCA	ATA	GGA	AAG	TTG	TTC	ACT	CAG	ACC	ATG	AAA	GGC	GTG	GAA		
G	R	G	D	S	R	L	T	Y	Q	W	H	K	E	G	S	I	G	K	L	F	T	Q	T	M	K	G	V	E			
			1720			1730					1740					1750							1760								
CGC	CTG	GCC	GTC	ATG	GGA	GAC	ACC	GCC	TGG	GAT	TTC	AGC	TCC	GCT	GGA	GGG	TTC	TTC	ACT	TCG	GTT	GGG	AAA	GGA	ATT	CAT	ACG	GTG	TTT		
R	L	A	V	M	G	D	T	A	W	D	F	S	S	A	G	G	F	F	T	S	V	G	K	G	I	H	T	V	F		
			1810			1820					1830					1840							1850								
GGC	TCT	GCC	TTT	CAG	GGG	CTA	TTT	GGC	GGC	TTG	AAC	TGG	ATA	ACA	AAG	GTC	ATC	ATG	GGG	GCG	GTA	CTT	ATA	TGG	GTT	GGC	ATC	AAC	ACA		
G	S	A	F	Q	G	L	F	G	G	L	N	W	I	T	K	V	I	M	G	A	V	L	I	W	V	G	I	N	T		
			1900			1910					1920					1930							1940								
AGA	AAC	ATG	ACA	ATG	TCC	ATG	AGC	ATG	ATC	TTG	GTA	GGA	GTG	ATC	ATG	ATG	TTT	TTG	TCT	CTA	GGA	GTT	GGG	GCG	GAT	CAA	TAA	TTG	CGG		
R	N	M	T	M	S	M	S	M	I	L	V	G	V	I	M	M	F	L	S	L	G	V	G	A	D	Q	A				
			1990			2000					2010					2020							2030								

CCG CAG < 2076

3.1.5 Klonierung der Zikavirus prM/E-Hüllproteine

Für die Herstellung von Zika pseudotypisierten HIV-1-Partikeln wurden die prM/E-Proteine mit den Aminosäuresequenzen der folgenden Zikaviren in den pHA-Expressionsvektor kloniert:

ZIKV	Herkunft		Genbank-Nr.	Isoliert
Dakar41519	Afrika	Senegal	HQ234501	1984
Dakar41524	Afrika	Senegal	KX601166	1991
ArD158084	Afrika	Senegal	KF383119	2002
H/PF/2013	Asien	Französisch-Polynesien	KJ776791	2013

Zur Herstellung der Zika-HIV-1-Pseudotypen wurden zwei E-Proteinsequenzen ausgewählt, die an der Position 154 ein Asparagin und die funktionelle Erkennungssequenz NxT/S für die N-Glykosylierung des E-Proteins tragen, NDT. Zwei andere Sequenzen haben eine mutierte NDT-Sequenz, NDI. Diese beiden Gruppen wurden gewählt, da die N-Glykosylierung des E-Proteins einen starken Einfluss auf die Infektiosität der Zikaviren hat.^{33–35,41,49} Der Bereich der Sequenz mit der Erkennungssequenz NDT ist hier angegeben:

ZIKV	GenBank-Nr.	E-Protein Position N154			N-Glykan (N-154)
Dakar41519	HQ234501	QHSGMIV	NDT	GHETDE	Ja
Dakar41524	KX601166	-----	-- I	-----	Nein
ArD158084	KF383119	-----	-- I	-----	Nein
H/PF/2013	KJ776791	-----	---	-----	Ja

3.1.5.2 Klonierung der prM/E-Hüllproteine von ZIKV ArD158084

Die Klonierung der prM/E-Hüllproteine des afrikanischen Zikavirus ArD158084 erfolgte analog zu der von ZIKV Dakar41519 (3.1.5.1). Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mittels eines Agarosegels sichtbar gemacht, ausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 16).

Nach einer Ligation des prM/E-Fragments in den Klonierungsvektor, wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Die erhaltene DNA-Sequenz wurde mit der Sequenz des Zikavirus mit der GenBank-Nr. KF383119 verglichen. Dabei wurden an fünf verschiedenen Positionen Aminosäure-Austausche beobachtet:

C719T	Thr > Met
A1525G	Lys > Glu
A1697G	Lys > Arg
A1789G	Ile > Val
A1912G	Ile > Val

Nach einer Umklonierung in den Expressionsvektor pHA erfolgte eine erneute Bestätigung der Gensequenz (Abb. 17) des Klons pHA-ZIKA-ArD.

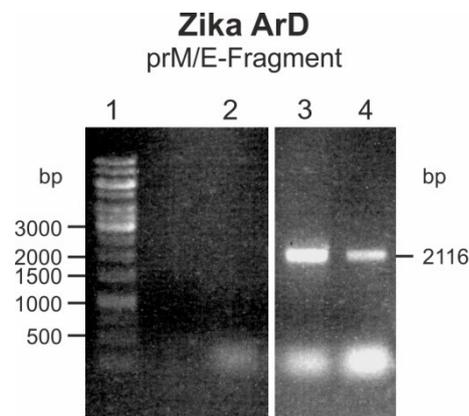


Abb. 16: Amplifikation des prM/E-Fragments des Zikavirus ArD158084

Spur 1:	DNA-Marker, GeneRuler™ 1 kb (Thermo Fisher Scientific)
Spur 2:	PCR-Negativkontrolle
Spur 3:	ArD158084 5 µl PCR-Amplifikat
Spur 4:	ArD158084 1 µl PCR-Amplifikat

CTT	GGT	ACC	GCC	GCC	GCC	ATG	GGC	GCA	GAC	ACC	AGC	ATC	GGA	ATC	GTC	GGC	CTC	CTG	CTG	ACC	ACA	GCC	ATG	GCG	GCT	GAG	ATC	ACT	AGA	
			10			20	M	G	A	D	T	S	I	G	40	I	V	G	L	L	L	T	60	A	A	A	E	I	T	R
CGT	GGG	AGT	GCA	TAC	TAC	ATG	TAC	TTG	GAC	AGG	AGC	GAT	GCT	GGT	AAG	GCC	ATT	TCT	TTT	GCT	ACC	ACA	TTG	GGG	GTG	AAC	AAA	TGC	CAT	
R	G	S	A	Y	Y	M	Y	L	D	R	S	D	A	G	K	A	I	S	F	A	T	T	L	G	V	N	K	C	H	
			100			110				120			130			140				150			160							
GTA	CAG	ATC	ATG	GAC	CTC	GGG	CAC	ATG	TGT	GAC	GCC	ACC	ATG	AGT	TAT	GAG	TGC	CCC	ATG	CTA	GAC	GAG	GGA	GTG	GAG	CCA	GAT	GAC	GTC	
V	Q	I	M	D	L	G	H	M	C	D	A	T	M	S	Y	E	C	P	M	L	D	E	G	V	E	P	D	D	V	
			190			200				210			220			230				240			250							
GAT	TGC	TGG	TGC	AAC	ACG	ACA	TCA	ACT	TGG	GTT	GTG	TAC	GGA	ACC	TGT	CAT	CAT	AAA	AAA	GGT	GAA	GCA	CGA	CGA	TCC	AGA	AGA	GCC	GTG	
D	C	W	C	N	T	T	S	T	W	V	V	Y	G	T	C	H	H	K	K	G	E	A	R	R	S	L	R	A	V	
			280			290				300			310			320				330			340							
ACG	CTT	CCT	TCT	CAC	TCC	ACA	AGG	AAG	CTG	CAA	ACG	CGA	TCG	CAG	ACT	TGG	CTA	GAA	TCA	AGA	GAA	TAC	ACA	AAG	CAC	CTG	ATC	AAG	GTT	
T	L	P	S	H	S	T	R	K	L	Q	T	R	S	Q	T	W	L	E	S	R	E	Y	T	K	H	L	I	K	V	
			370			380				390			400			410				420			430							
GAG	AAT	TGG	ATA	TTC	AGG	AAC	CCC	GGG	TTT	GCG	CTA	GTG	GCT	GTA	GCT	ATT	GCC	TGG	CTC	CTG	GGA	AGC	TCG	ACG	AGC	CAA	AAA	GTC	ATA	
E	N	W	I	F	R	N	P	G	F	A	L	V	A	V	A	I	A	W	L	L	G	S	S	T	S	Q	K	V	I	
			460			470				480			490			500				510			520							
TAC	TTG	GTC	ATG	ATA	TTG	TTG	ATT	GCC	CCG	GCA	TAC	AGC	ATC	AGG	TGC	ATA	GGA	GTT	AGC	AAT	AGA	GAC	TTT	GTG	GAG	GGC	ATG	TCA	GGT	
Y	L	V	M	I	L	L	I	A	P	A	Y	S	I	R	C	I	G	V	S	N	R	D	F	V	E	G	M	S	G	
			550			560				570			580			590				600			610							
GGG	ACC	TGG	GTT	GAT	GTT	GTC	TTG	GAA	CAT	GGG	GGT	TGC	GTC	ACC	GTG	ATG	GCA	CAG	GAC	AAG	CCA	ACA	GTT	GAC	ATT	GAG	TTG	GTC	ATG	
G	T	W	V	D	V	V	L	E	H	G	G	C	V	T	V	M	A	Q	D	K	P	T	V	D	I	E	L	V	M	
			640			650				660			670			680				690			700							
ACA	ACG	GTT	AGC	AAC	ATG	GCC	GAG	GTA	AGA	TCC	TAC	TGC	TAT	GAG	GCA	TCA	ATA	TCG	GAC	ATG	GCT	TCG	GAC	AGC	CGC	TGT	CCA	ACA	CAA	
T	T	V	S	N	M	A	E	V	R	S	Y	C	Y	E	A	I	S	D	M	A	S	D	S	R	R	C	P	T	Q	
			730			740				750			760			770				780			790							
GGT	GAA	GCC	TAC	CTT	GAC	AAG	CAA	TCA	GAC	ACT	CAA	TAT	GTC	TGC	AAG	AGA	ACA	CTG	GTG	GAT	AGA	GGT	TGG	GGA	AAT	GGG	TGT	GGA	CTT	
G	E	A	Y	L	D	K	Q	S	D	T	Q	Y	V	C	K	R	T	L	V	D	R	G	W	G	N	G	C	G	L	
			820			830				840			850			860				870			880							
TTT	GGC	AAA	GGG	AGC	TTG	GTG	ACA	TGT	GCC	AAG	TTT	ACG	TGC	TCC	AAG	AAA	ATG	ACA	GGC	AAG	AGC	ATC	CAG	CCG	GAG	AAC	TTG	GAG	TAC	
F	G	K	G	S	L	V	T	C	A	K	F	T	C	S	K	K	M	T	G	K	S	I	Q	P	E	N	L	E	Y	
			910			920				930			940			950				960			970							
CGG	ATA	ATG	CTA	TCA	GTG	CAT	GGA	TCC	CAG	CAC	AGT	GGG	ATG	ATT	GTG	AAT	GAC	ATA	GGA	CAT	GAA	ACT	GAC	GAA	AAC	AGA	GCA	AAG	GTC	
R	I	M	L	S	V	H	G	S	Q	H	S	G	M	I	V	N	D	I	G	H	E	T	D	E	N	R	A	K	V	
			1000			1010				1020			1030			1040				1050			1060							
GAG	GTC	ACA	CCC	AAT	TCA	CCA	AGA	GCA	GAA	GCA	ACC	TTG	GGA	GGT	TTT	GGA	AGC	TTG	GGA	CTT	GAT	TGT	GAA	CCA	AGG	ACA	GGC	CTT	GAC	
E	V	T	P	N	S	P	R	A	E	A	T	L	G	G	F	G	S	L	G	L	D	C	E	P	R	T	G	L	D	
			1090			1100				1110			1120			1130				1140			1150							
TTC	TCA	GAT	CTA	TAT	TAC	CTG	ACC	ATG	AAC	AAT	AAG	CAT	TGG	TTG	GTG	CAC	AAG	GAG	TGG	TTT	CAT	GAC	ATC	CCA	TTA	CCT	TGG	CAT	GCT	
F	S	D	L	Y	Y	L	T	M	N	N	K	H	W	L	V	H	K	E	W	F	H	D	I	P	L	P	W	H	A	
			1180			1190				1200			1210			1220				1230			1240							
GGT	GCA	GAC	ACT	GGA	ACT	CCA	CAC	TGG	AAC	AAC	AAA	GAG	GCA	TTG	GTG	GAG	TTC	AAG	GAC	GCC	CAC	GCC	AAG	AGG	CAA	ACT	GTT	GTG	GTT	
G	A	D	T	G	T	P	H	W	N	N	K	E	A	L	V	E	F	K	D	A	H	A	K	R	Q	T	V	V	V	
			1270			1280				1290			1300			1310				1320			1330							
CTG	GGG	AGC	CAA	GAG	GGA	GCT	GTT	CAC	ACG	GCC	CTC	GCT	GGA	GCT	TTG	GAG	GCT	GAG	ATG	GAT	GGT	GCA	AAG	GGA	AGG	CTA	TTC	TCT	GGC	
L	G	S	Q	E	G	A	V	H	T	A	L	A	G	A	L	E	A	E	M	D	G	A	K	G	R	L	F	S	G	
			1360			1370				1380			1390			1400				1410			1420							
CAT	TTG	AAA	TGC	CGC	CTA	AAA	ATG	GAC	AAG	CTT	AGG	TTG	AAG	GGT	GTG	TCA	TAT	TCC	CTG	TGT	ACC	GCA	GCG	TTC	ACA	TTT	ACC	GAG	GTC	
H	L	K	C	R	L	K	M	D	K	L	R	L	K	G	V	S	Y	S	L	C	T	A	A	F	T	F	T	E	V	
			1450			1460				1470			1480			1490				1500			1510							
CCA	GCT	GAA	ACA	CTG	CAT	GGA	ACA	GTT	ACA	GTG	GAG	GTG	CAG	TAT	GCA	GGG	ACA	GAT	GGA	CCC	TGC	AAG	GTC	CCA	GCC	CAG	ATG	GCG	GTA	
P	A	E	T	L	H	G	T	V	T	V	E	V	Q	Y	A	G	T	D	G	P	C	K	V	P	A	Q	M	A	V	
			1540			1550				1560			1570			1580				1590			1600							
GAC	ATG	CAG	ACC	CTG	ACC	CCA	GTT	GGA	AGG	CTG	ATA	ACC	GCC	AAC	CCT	GTG	ATC	ACT	GAA	AGC	ACT	GAG	AAT	TCA	AGG	ATG	ATG	TTG	GAA	
D	M	Q	T	L	T	P	V	G	R	L	I	T	A	N	P	V	I	T	E	S	T	E	N	S	R	M	M	L	E	
			1630			1640				1650			1660			1670				1680			1690							
CTC	GAC	CCA	CCA	TTT	GGG	GAT	TCT	TAC	ATT	GTC	ATA	GGA	GTC	GGG	GAC	AAG	AAA	ATC	ACC	CAT	CAC	TGG	CAT	CGG	AGT	GGT	AGC	ACC	GTC	
L	D	P	P	F	G	D	S	Y	I	V	I	G	V	G	D	K	K	I	T	H	H	W	H	R	S	G	S	T	V	
			1720			1730				1740			1750			1760				1770			1780							
GGA	AAG	GCA	TTT	GAA	GCC	ACT	GTG	AGA	GGT	GCC	AAG	AGA	ATG	GCA	GTC	TTG	GGG	GAC	ACA	GCC	TGG	GAC	TTT	GGA	TCA	GTT	GGG	GGT	GTG	
G	K	A	F	E	A	T	V	R	G	A	K	R	M	A	V	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S	V	G			

<u>CTT</u>	<u>GGT</u>	<u>ACC</u>	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ATG</u>	GGC	GCA	GAC	ACC	AGC	ATC	GGA	ATC	GTT	GGC	CTC	CTG	CTG	ACC	ACT	GCC	ATG	GCG	GCC	GAG	ATC	ACT	AGA
			10			20	G	A	D	T	S	I	G	I	V	G	L	L	L	T	T	A	M	A	A	E	I	T	R
CGT	GGA	AGT	GCA	TAC	TAC	ATG	TAC	TTG	GAC	AGG	AGC	GAT	GCT	GGT	AAG	GCC	ATT	TCT	TTT	GCT	ACC	ACA	TTG	GGG	GTG	AAC	AAA	TGC	CAT
R	G	S	A	Y	Y	M	Y	L	D	R	S	D	A	G	K	A	I	S	F	A	T	T	L	G	V	N	K	C	H
			100			110				120			130			140				150			160						
GTA	CAG	ATC	ATG	GAC	CTC	GGG	CAC	ATG	TGT	GAC	GCC	ACC	ATG	AGT	TAT	GAG	TGC	CCC	ATG	CTA	GAC	GAG	GGA	GTG	GAG	CCA	GAT	GAC	GTC
V	Q	I	M	D	L	G	H	M	C	D	A	T	M	S	Y	E	C	P	M	L	D	E	G	V	E	P	D	D	V
			190			200				210			220			230				240			250						
GAT	TGC	TGG	TGC	AAC	ACG	ACA	TCA	ACT	TGG	GTT	GTG	TAC	GGA	ACC	TGT	CAT	CAT	AAA	AAA	GGT	GAA	GCA	CGA	CGA	TCC	AGA	AGA	GCC	GTG
D	C	W	C	N	T	T	S	T	W	V	V	Y	G	T	C	H	K	K	G	E	A	R	R	S	S	R	R	A	V
			280			290				300			310			320				330			340						
ACG	CTT	CCT	TCT	CAC	TCC	ACA	AGG	AAG	CTG	CAA	ACG	CGA	TCG	CAG	ACT	TGG	CTA	GAA	TCA	AGA	GAA	TAC	ACA	AAG	CAC	CTG	ATC	AAG	GTT
T	L	P	S	H	S	T	R	K	L	Q	T	R	A	Q	T	W	L	E	S	R	E	Y	T	K	H	L	I	K	V
			370			380				390			400			410				420			430						
GAG	AAA	TGG	ATA	TTC	AGG	AAC	CCC	GGG	TTT	GCG	CTA	GTG	GCT	GTA	GCT	ATT	GCC	TGG	CTC	CTG	GGA	AGC	TCG	ACG	AGC	CAA	AAA	GTC	ATA
E	K	W	I	F	R	N	P	G	F	A	L	V	A	V	A	I	A	W	L	L	G	S	S	T	S	Q	K	V	I
			460			470				480			490			500				510			520						
TAC	TTG	GTC	ATG	ATA	TTG	TTG	ATT	GCC	CCG	GCA	TAC	AGC	ATC	AGG	TGC	ATA	GGA	GTT	AGC	AAT	AGA	GAC	TTC	GTG	GAG	GGC	ATG	TCA	GGT
Y	L	V	M	I	L	L	I	A	P	A	Y	S	I	R	C	I	G	V	S	N	R	D	F	V	E	G	M	S	G
			550			560				570			580			590				600			610						
GGG	ACC	TGG	GTT	GAT	GTT	GTC	TTG	GAA	CAT	GGG	GGT	TGC	GTC	ACC	GTG	ATG	GCA	CAG	GAC	AAG	CCA	ACA	GTT	GAC	ATC	GAG	TTG	GTC	ACG
G	T	W	V	D	V	V	L	E	H	G	G	C	V	T	V	M	A	Q	D	K	P	T	V	D	I	E	L	V	T
			640			650				660			670			680				690			700						
ACA	ACG	GTT	AGC	AAC	ATG	GCC	GAG	GTA	AGA	ACC	TAC	TGC	TAT	GAG	GCA	TCA	ATA	TCG	GAC	ATG	GCT	TCG	GAC	AGC	CGC	TGT	CCA	ACA	CAA
T	T	V	S	N	M	A	E	V	R	T	Y	C	Y	E	A	I	S	D	M	A	S	D	S	R	R	C	P	T	Q
			730			740				750			760			770				780			790						
GGT	GAA	GCC	TAC	CTT	GAC	AAG	CAA	TCA	GAC	ACT	CAA	TAT	GTC	TGT	AAG	AGA	ACA	CTG	GTG	GAT	AGA	GGT	TGG	GGA	AAT	GGG	TGT	GGA	CTT
G	E	A	Y	L	D	K	Q	S	D	T	Q	Y	V	C	K	R	T	L	V	D	R	G	W	G	N	G	C	G	L
			820			830				840			850			860				870			880						
TTT	GGC	AAA	GGG	AGC	TTG	GTG	ACA	TGT	GCC	AAG	TTT	ACT	TGC	TCC	AAG	AAA	ATG	ACA	GGT	AAG	AGC	ATC	CAG	CCG	GAG	AAC	TTG	GAG	TAC
F	G	K	G	S	L	V	T	C	A	K	F	T	C	S	K	K	M	T	G	K	S	I	Q	P	E	N	L	E	Y
			910			920				930			940			950				960			970						
CGG	ATA	ATG	CTA	TCA	GTG	CAT	GGA	TCC	CAG	CAC	AGT	GGG	ATG	ATT	GTG	AAT	GAC	ATA	GGA	CAT	GAA	ACT	GAC	GAA	AAC	AGA	GCA	AAG	GTC
R	I	M	L	S	V	H	G	S	Q	H	S	G	M	I	V	N	D	I	G	G	E	T	D	E	N	R	A	K	V
			1000			1010				1020			1030			1040				1050			1060						
GAG	GTC	ACA	CCC	AAT	TCA	CCA	AGA	GCA	GAA	GCA	ACC	TTG	GGA	GGT	TTT	GGA	AGC	TTG	GGA	CTT	GAC	TGT	GAA	CCA	AGG	ACA	GGC	CTT	GAC
E	V	T	P	N	S	P	A	A	E	A	T	L	G	G	F	G	S	L	G	L	D	C	E	P	R	T	G	L	D
			1090			1100				1110			1120			1130				1140			1150						
TTC	TCA	GAT	CTG	TAT	TAC	CTG	ACC	ATG	AAC	AAC	AAG	CAT	TGG	TTG	GTG	CAC	AAG	GAG	TGG	TTT	CAT	GAC	ATC	CCA	TTA	CCT	TGG	CAT	GCT
F	S	D	L	Y	Y	L	T	M	N	N	K	H	W	L	V	H	K	E	W	F	H	D	I	P	L	P	W	H	A
			1180			1190				1200			1210			1220				1230			1240						
GGT	GCA	GAC	ACT	GGA	ACT	CCA	CAC	TGG	AAC	AAC	AAA	GAG	GCA	TTG	GTG	GAG	TTC	AAG	GAC	GCC	CAC	GCC	AAG	AGG	CAA	ACT	GTT	GTG	GTT
G	A	D	T	G	T	P	H	W	N	N	K	E	A	L	V	E	F	K	D	A	H	A	K	R	Q	T	V	V	
			1270			1280				1290			1300			1310				1320			1330						
CTG	GGG	AGC	CAA	GAG	GGA	GCT	GTT	CAC	ACG	GCC	CTC	GCT	GGA	GCT	CTG	GAG	GCT	GAG	ATG	GAT	GGT	GCA	AAG	GGA	AGG	CTA	TTC	TCT	GGC
L	G	S	Q	E	G	A	V	H	T	A	L	A	G	A	L	E	A	E	M	D	G	A	K	G	R	L	F	S	G
			1360			1370				1380			1390			1400				1410			1420						
CAT	TTG	AAA	TGC	CGC	CTA	AAA	ATG	GAC	AAG	CTT	AGG	TTG	AAG	GGT	GTG	TCA	TAT	TCC	CTG	TGT	ACT	GCA	GCG	TTC	ACA	TTC	ACC	AAG	GTC
H	L	K	C	R	L	K	M	D	K	L	R	L	K	G	V	S	Y	S	L	C	T	A	A	F	T	F	T	K	V
			1450			1460				1470			1480			1490				1500			1510						
CCA	GCT	GAA	ACA	TTG	CAT	GGA	ACA	GTT	ACA	GTG	GAG	GTG	CAG	TAT	GCA	GGG	ACA	GAT	GGA	CCC	TGC	AAG	GTC	CCA	GCC	CAG	ATG	GCG	GTG
P	A	E	T	L	H	G	T	V	T	V	E	V	Q	Y	A	G	T	D	G	P	C	K	V	P	A	Q	M	A	V
			1540			1550				1560			1570			1580				1590			1600						
GAC	ATG	CAG	ACC	CTG	ACC	CCA	GTT	GGA	AGG	CTG	ATA	ACC	GCC	AAC	CCT	GTG	ATC	ACT	GAA	AGT	ACT	GAG	AAT	TCA	AAG	ATG	ATG	TTG	GAA
D	M	Q	T	L	T	P	V	G	R	L	I	T	A	N	P	V	I	T	E	S	T	E	N	S	K	M	M	L	E
			1630			1640				1650			1660			1670				1680			1690						
CTT	GAC	CCA	CCA	TTT	GGG	GAT	TCT	TAC	ATT	GTC	ATA	GGA	ATC	GGG	GAC	AAG	AAA	ATC	ACC	CAT	CAC	TGG	CAT	CGG	AGT	GGT	AGC	ACC	ATC
L	D	P	P	F	G	D	S	Y	I	V	I	G	I	G	D	K	K	I	T	H	H	W	H	R	S	G	S	T	I
			1720			1730				1740			1750			1760				1770			1780						
GGA	AAG	GCA	TTT	GAA	GCC	ACT	GTG	AGA	GGT	GCC	AAG	AGA	ATG	GCA	GTC	TTG	GGG	GAC	ACA	GCC	TGG	GAC	TTT	GGA	TCA	GTT	GGG	GGT	GTG
G	K	A	F	E	A	T	V	R	G	A	K	R	M	A	V	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S	V	G	G	V
			1810			1820				1																			

3.1.5.4 Klonierung der prM/E-Hüllproteine von ZIKV H/PF/2013

Für die Amplifikation der prM/E-Genfragmente des asiatischen Zikastamms H/PF/2013 wurde ebenfalls zur Verfügung gestellte cDNA verwendet. Da die Zika-Primer (3.1.5.1) an den Amplifikationsstellen keine 100 %ige Homologie zu der Sequenz von ZIKV H/PF/2013 (GenBank-Nr. KJ776791) aufwiesen, wurden für diesen Virusstamm eigene Primer entworfen.

Oligo 13 H/PF-KpnI-*for*: 5'-CTTGGTACCGCCGCCGCCATGGGCGCAG
ATACTAGTGTCGG

Oligo 14 H/PF-NotI-*rev*: 5'-CTTCGAGCGGCCGCTCAACTAATTAAGC
AGAGACAGCTGTGG

Mit Hilfe einer PCR mit einem Temperaturgradienten von 45-65 °C wurde schließlich das prM/E-kodierende Genfragment amplifiziert (Abb. 20). Nach einer Klonierung in den pCR™2.1-Vektor wurde die Plasmid-DNA sequenziert (Abb. 21). Ein Sequenzvergleich der erhaltenen Sequenz mit dem Zikavirus GenBank-Nr. KJ776791 ergab die folgenden Mutationen:

Stille Mutation	Sinnverändernde Mutation
A522G	A107G
A1940G	T191C
C1980T	T197C
	T206C
	T463C
	T520A
	G1318A
	T1937C
	G1959A
	G2053A

Mit einer abschließenden Sequenzierung des klonierten Plasmids pHA-ZIKA-H/PF wurden die Ergebnisse verifiziert (Abb. 21).

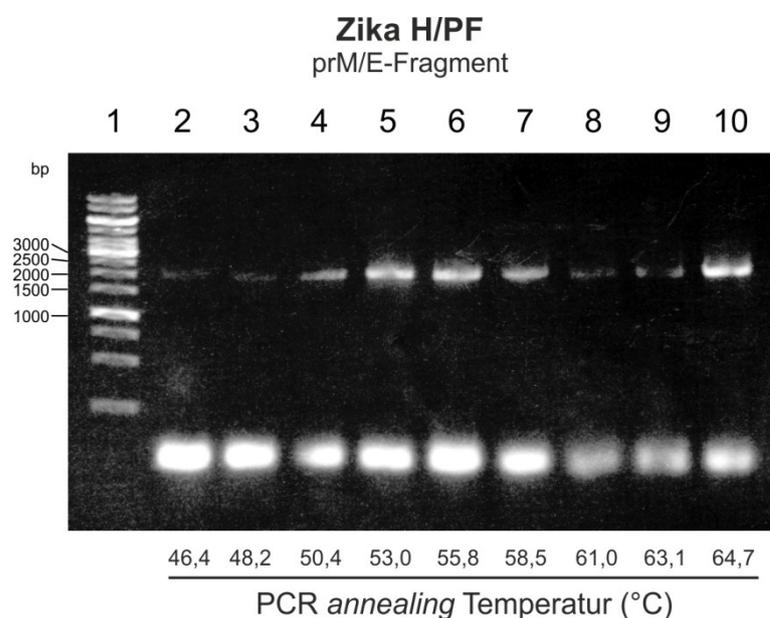


Abb. 20: Gelanalyse der Amplifikation des Zika H/PF prM/E-Genfragments

- Spur 1: DNA-Marker, GeneRuler™ 1 kb (Thermo Fisher Scientific)
- Spur 2: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 46,4 °C
- Spur 3: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 48,2 °C
- Spur 4: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 50,4 °C
- Spur 5: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 53,0 °C
- Spur 6: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 55,8 °C
- Spur 7: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 58,5 °C
- Spur 8: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 61,0 °C
- Spur 9: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 63,1 °C
- Spur 10: PCR-Amplifikation von ZIKV-H/PF, *annealing*-Temperatur 64,7 °C

3.2 Klonierung der Zika-Usutu-Chimäre

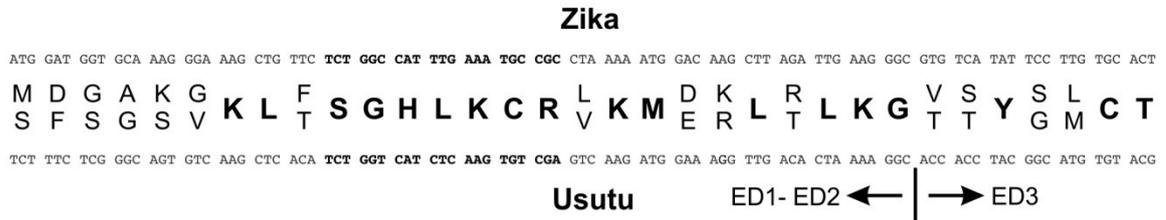
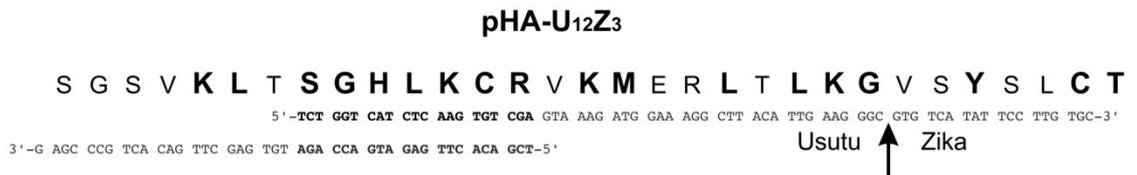
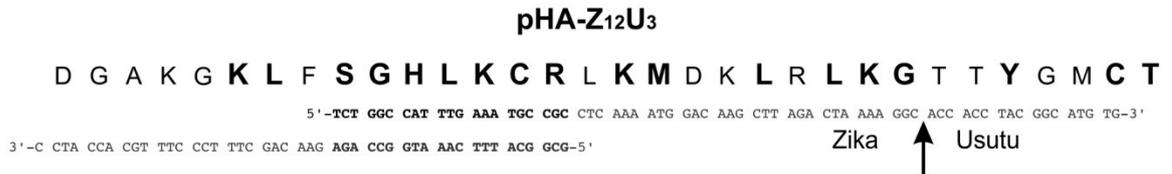
Das E-Protein der Flaviviren besteht aus drei Domänen. Um die E-Domäne des Zikavirus Dakar41519 im Einzelnen zu untersuchen, wurden chimäre Genfragmente mit Domänen des Usutuvirus hergestellt. Während dieser Arbeit wurden Chimäre mit der E1- und E2-Domäne eines Virus und der E3-Domäne eines anderen Virus untersucht.

Für das Primerdesign musste zunächst eine homologe Sequenz zwischen beiden Virensequenzen ermittelt werden. Ein solcher Bereich ermöglichte eine Hybridisierung durch Überlappung der beiden einzeln amplifizierten Genfragmente. Wie in Abbildung 22a zu erkennen ist, handelt es sich bei der Aminosäuresequenz ...SGHLKCR... um eine fortlaufend homologe Sequenz zwischen den beiden Viren. Ausgehend von diesem Sequenzmotiv wurden die benötigten Oligonukleotide für die Amplifikationen entworfen. Bei Differenzen in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Viren wurde stets die dem Virus entsprechende Sequenz für die Primersequenz gewählt.

Um den ED3-Bereich von ZIKV zu amplifizieren, wurde ein *forward*-Primer ausgehend von der Homologiesequenz entwickelt (Abb. 22b). Zusätzliche homologe Aminosäuren in 5'-3'-Richtung verbessern die spätere Selbsthybridisierung der Genfragmente. Der ED1-ED2-Bereich des Usutuvirus wurde mit einem *reverse*-Primer, der ebenfalls von der homologen Sequenz ausging, amplifiziert. Auch hier war mit den Aminosäuren Lysin und Leucin noch eine weitere Homologie zu erkennen.

Für die Konstruktion der Chimäre mit ED1-ED2 des Zikavirus und ED3 des Usutuvirus wurde beim Primerdesign analog zum umgekehrten Fall verfahren (Abb. 22c). Der *forward*-Primer diente hier für die Amplifikation von Zika-Genfragmenten und der *reverse*-Primer für die des Usutuvirus Abschnitts.

Eine anschließende Hybridisierung der komplementären Genfragmente und PCR mit den flankierenden Oligonukleotiden führten zu einer Amplifikation des gesamten prM/E-kodierenden Genfragments.

a**b****c****Abb. 22: Klonierungsstrategie der Zika--Usutu-Chimären**

- a) Zika- und Usutuvirus-Sequenzen im Bereich des Übergangs zwischen der ED1-ED2- und ED3-Domäne. Beide Teilbereiche, ED1ED2 und ED3, wurden einzeln mittels der PCR-Technik amplifiziert. Als endständige Primer wurden die entsprechenden Zika- und Usutu-PCR-Primer eingesetzt (3.1.1 bzw. 3.1.5.1).
- b) PCR-Klonierungsstrategie für die Usutu-ED1ED2--Zika-ED3-Chimäre. Angegeben sind die verwendeten PCR-Primer im Bereich des Übergangs von Zika- und Usutuvirus (Oligos 15 und 16; Abb. 23).
- c) PCR-Klonierungsstrategie für die Zika-ED1ED2--UsutuED3-Chimäre (Oligos 17 und 18; Abb.25).

3.2.2 Klonierung der Zika-Usutu-Chimäre Z₁₂U₃

Analog zu der Vorgehensweise bei der Konstruktion von U₁₂Z₃-Chimären (3.2.1) wurde bei der Herstellung von Chimären, die aus den ED1 und ED2 des Zikavirus und ED3 des Usutuvirus bestanden, verfahren (Abb. 25a). Für die Amplifikation des DNA-Fragments mit ED1 und ED2 des Zikavirus wurden folgende PCR-Primer verwendet:

Oligo 11 ZIKA-KpnI-*for*: 5'-CTTGGTACCGCCGCGCCATGGGCGCAG
ACACCAGCATCGG

Oligo 17 ZIKA-E1E2-*rev*: 5'-GCGGCATTTCAAATGGCCAGAGAACAGC
TTCCCTTTGCACCATCC

In einer parallel laufenden PCR wurde mit den Primern Oligo 18 und Oligo 2 das ED3-Fragment des Usutuvirus amplifiziert.

Oligo 18 USU-E3-*for*: 5'-TCTGGCCATTTGAAATGCCGCCTCAAAA
TGGACAAGCTTAGACTAAAAGGCACCAC
CTACGGCATGTG

Oligo 2 USU-NotI-*rev*: 5'-CTGCGGCCGCAATTATGCATGGACGTTT
GTGGCGAGAAAGAGGAGC

Mit einer Gelanalyse wurden sowohl die einzelnen, als auch die mit den endständigen Primern (Oligo 11 und 2) amplifizierten DNA-Fragmente auf die richtige Größe hin überprüft (Abb. 25b). Dabei konnte die Korrektheit der Amplifikation aufgrund der erwarteten Größe des Z₁₂-Fragments von 1.455 bp und die des U₃-Fragments von 671 bp bestätigt werden. Das Z₁₂U₃-Fragment war 2.108 bp groß. Die isolierten und gereinigten prM/E-Fragmente der Chimäre wurden anschließend wie bei dem Usutuvirus für die Klonierung in Expressionsvektor pHA eingesetzt (3.1.1). Die Sequenzanalyse der erhaltenen Sequenzen (Abb. 26) ergab im Vergleich zu den Sequenzen des KpnI-NotI-prM/E DNA-Fragments von pHA-Z41519 (Abb. 15, S. 40) und pHA-USU-BH65 (Abb. 7, S. 31) keine Differenzen.

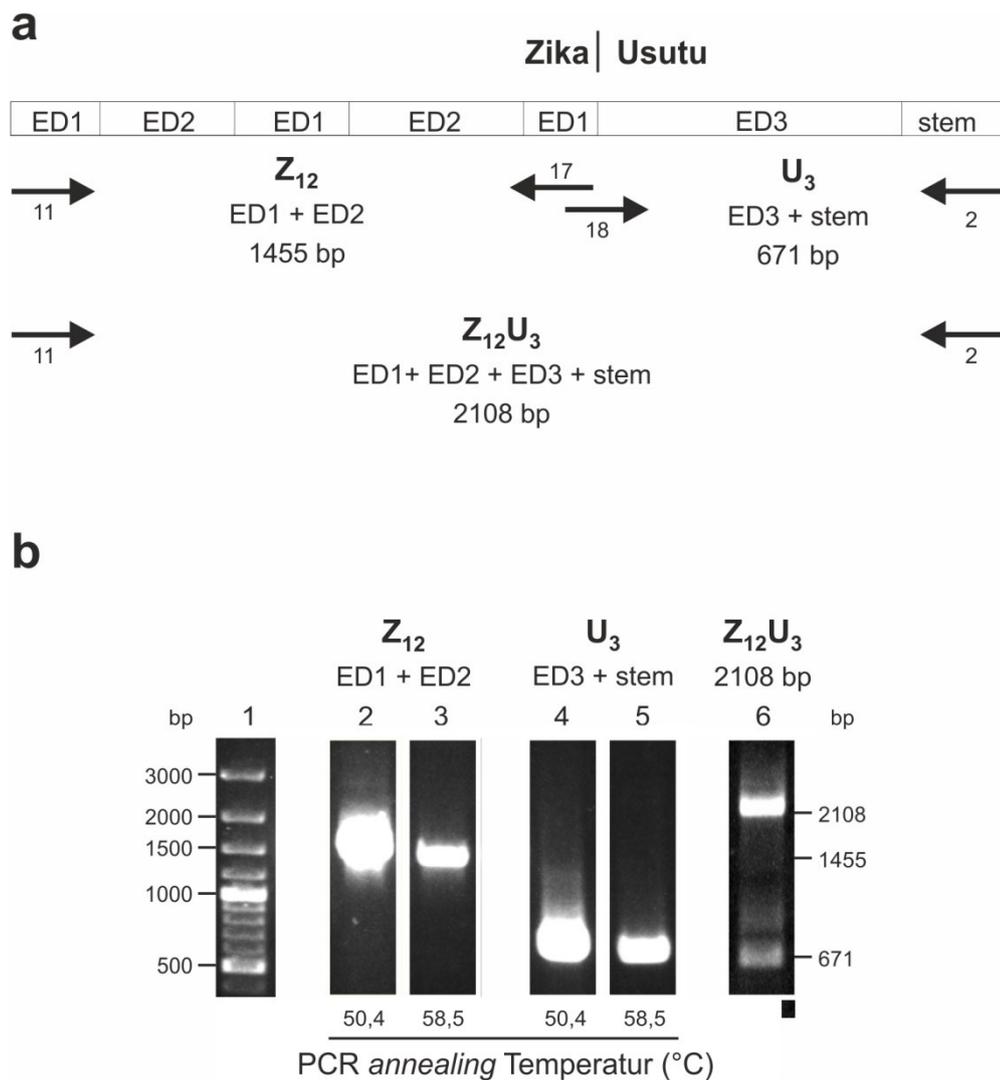


Abb. 25: *Assembly der Zika-Usutu Chimäre $Z_{12}U_3$*

- a)** PCR-Strategie für die Amplifikation chimärer E1E2-E3-DNA-Fragmente. Das 1.455 bp große Z_{12} -Fragment wurde mit den Primern ZIKA-KpnI-*for* (11) und ZIKA-E1E2-*rev* (17) amplifiziert. Für das U_3 -Fragment (671 bp) wurden USU-E3-*for* (18) und USU-NotI-*rev* (2) verwendet. Das chimäre Genfragment $Z_{12}U_3$ wurde mit den endständigen Primern ZIKA-KpnI-*for* (11) und USU-NotI-*rev* (2) amplifiziert.
- b)** Gelanalyse der Gradienten-PCR der einzelnen E-Domänen von ZIKAV und USUV. Das mit den PCR-Primern ZIKA-KpnI-*for* (11) und USU-NotI-*rev* (2) amplifizierte DNA-Fragment besaß die erwartete Größe von 2.108 bp.

Spur 1: DNA-Marker, GeneRuler™ 100 bp Plus (Thermo Fisher Scientific)
 Spur 2-3: amplifiziertes Z_{12} -DNA-Fragment, *annealing*-Temperatur 50-59 °C
 Spur 4-5: amplifiziertes Z_3 -DNA-Fragment, *annealing*-Temperatur 50-59 °C
 Spur 6: amplifiziertes $U_{12}Z_3$ -Fragment, *annealing*-Temperatur 50 °C

<u>CTT</u>	<u>GGT</u>	<u>ACC</u>	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>GCC</u>	<u>ATG</u>	<u>ATG</u>	<u>GGC</u>	<u>GCA</u>	<u>GAC</u>	<u>ACC</u>	<u>AGC</u>	<u>ATC</u>	<u>GGA</u>	ATC	ATT	GGC	CTC	CTG	CTG	ACT	ACA	GCC	ATG	GCA	GCA	GAG	ATC	ACT	
					M	M	G	A	D	T	S	I	G	I	I	G	L	L	L	L	T	T	T	A	M	A	A	E	I	T
					10	20		30				40			50			60					70			80				
AGA	CGC	GGG	AGT	GCA	TAC	TAC	ATG	TAC	TTG	GAT	AGG	AGC	GAT	GCC	GGG	AAG	GCC	ATT	TCG	TTT	GCT	ACC	ACA	TTG	GGA	GTG	AAC	AAG	TGC	
R	R	G	S	A	Y	Y	M	Y	L	D	R	S	D	A	G	K	A	I	S	F	A	T	T	L	G	V	N	K	C	
			100		110		120					130			140			150					160			170				
CAC	GTA	CAG	ATC	ATG	GAC	CTC	GGG	CAC	ATG	TGT	GAC	GCC	ACC	ATG	AGT	TAT	GAG	TGC	CCT	ATG	CTG	GAT	GAG	GGA	GTG	GAA	CCA	GAT	GAT	
H	V	Q	I	M	D	L	G	H	M	C	D	A	T	M	S	Y	E	C	P	M	L	D	E	G	V	E	P	D	D	
			190		200		210					220			230			240					250			260				
GTC	GAT	TGC	TGG	TGC	AAC	ACG	ACA	TCA	ACT	TGG	GTT	GTG	TAC	GGA	ACC	TGT	CAT	CAC	AAA	AAA	GGT	GAG	GCA	CGG	CGA	TCT	AGA	AGA	GCC	
V	D	C	W	C	N	T	T	S	T	W	V	V	Y	G	T	C	H	H	K	K	G	E	A	R	R	S	R	R	A	
			280		290		300					310			320			330					340			350				
GTG	ACG	CTC	CCT	TCT	CAC	TCT	ACA	AGG	AAG	TTG	CAA	ACG	CGG	TCG	CAG	ACC	TGG	TTA	GAA	TCA	AGA	GAA	TAC	ACG	AAG	CAC	TTG	ATC	AAG	
V	T	L	P	S	H	S	T	R	K	L	Q	T	R	S	Q	T	W	L	E	S	R	E	Y	T	K	H	L	I	K	
			370		380		390					400			410			420					430			440				
GTT	GAA	AAC	TGG	ATA	TTC	AGG	AAC	CCC	GGG	TTT	GCG	CTA	GTG	GCC	GTT	GCC	ATT	GCC	TGG	CTT	TTG	GGA	AGC	TCG	ACG	AGC	CAA	AAA	GTC	
V	E	N	W	I	F	R	N	P	G	F	A	L	V	A	V	A	I	A	W	L	L	G	S	S	T	S	Q	K	V	
			460		470		480					490			500			510					520			530				
ATA	TAC	TTG	GTC	ATG	ATA	CTG	CTG	ATT	GCC	CCG	GCA	TAC	AGT	ATC	AGG	TGC	ATT	GGA	GTC	AGC	AAT	AGA	GAC	TTC	GTG	GAG	GGC	ATG	TCA	
I	Y	L	V	M	I	L	L	I	A	P	A	Y	S	I	R	C	I	G	V	S	N	R	D	F	V	E	G	M	S	
			550		560		570					580			590			600					610			620				
GGT	GGG	ACC	TGG	GTT	GAT	GTT	GTC	TTG	GAA	CAT	GGA	GGC	TGC	GTT	ACC	GTG	ATG	GCA	CAG	GAC	AAG	CCA	ACA	GTT	GAC	ATA	GAG	TTG	GTC	
G	G	T	W	V	D	V	V	L	E	H	G	G	C	V	T	V	M	A	Q	D	K	P	T	V	D	I	E	L	V	
			640		650		660					670			680			690					700			710				
ACG	ACG	ACG	GTT	AGT	AAC	ATG	GCC	GAG	GTA	AGA	TCC	TAT	TGC	TAC	GAG	GCA	TCG	ATA	TCG	GAC	ATG	GCT	TCG	GAC	AGT	CGT	TGC	CCA	ACA	
T	T	T	V	S	N	M	A	E	V	R	S	Y	C	Y	E	A	S	I	S	D	M	A	S	D	S	R	C	P	T	
			730		740		750					760			770			780					790			800				
CAA	GGT	GAA	GCC	TAC	CTT	GAC	AAG	CAA	TCA	GAC	ACT	CAA	TAT	GTC	TGC	AAA	AGA	ACA	TTA	GTG	GAC	AGA	GGT	TGG	GGA	AAT	GGT	TGT	GGA	
Q	G	E	A	Y	L	D	K	Q	S	D	T	Q	Y	V	C	K	R	T	L	V	D	R	G	W	G	N	G	C	G	
			820		830		840					850			860			870					880			890				
CTT	TTT	GGC	AAA	GGG	AGC	TTG	GTG	ACA	TGT	GCC	AAG	TTC	ACG	TGT	TCT	AAG	AAG	ATG	ACC	GGG	AAG	AGC	ATT	CAA	CCG	GAA	AAT	CTG	GAG	
L	F	G	K	G	S	L	V	T	C	A	K	F	T	C	S	K	K	M	T	G	K	S	I	Q	P	E	N	L	E	
			910		920		930					940			950			960					970			980				
TAT	CGG	ATA	ATG	CTA	TCA	GTG	CAT	GGC	TCC	CAG	CAT	AGC	GGG	ATG	ATT	GTC	AAT	GAT	ACA	GGA	CAT	GAA	ACT	GAC	GAA	AAC	AGA	GCG	AAA	
Y	R	I	M	L	S	V	H	G	S	Q	H	S	G	M	I	V	N	D	T	G	H	E	T	D	E	N	R	A	K	
			1000		1010		1020					1030			1040			1050					1060			1070				
GTC	GAG	GTT	ACG	CCT	AAT	TCA	CCA	AGA	GCG	GAA	GCA	ACC	TTG	GGA	GGC	TTT	GGA	AGC	TTA	GGA	CTT	GAC	TGT	GAA	CCA	AGG	ACA	GGC	CTT	
V	E	V	T	P	N	S	P	R	A	E	A	T	L	G	G	F	G	S	L	G	L	D	C	E	P	R	T	G	L	
			1090		1100		1110					1120			1130			1140					1150			1160				
GAC	TTT	TCA	GAT	CTG	TAT	TAC	CTG	ACC	ATG	AAC	AAT	AAG	CAT	TGG	TTG	GTG	CAC	AAA	GAG	TGG	TTT	CAT	GAC	ATC	CCA	TTG	CCT	TGG	CAT	
D	F	S	D	L	Y	Y	L	T	M	N	N	K	H	W	L	V	H	K	E	W	F	H	D	I	P	L	P	W	H	
			1180		1190		1200					1210			1220			1230					1240			1250				
GCT	GGG	GCA	GAC	ACC	GGA	ACT	CCA	CAC	TGG	AAC	AAC	AAA	GAG	GCA	TTG	GTA	GAA	TTC	AAG	GAT	GCC	CAC	GCC	AAG	AGG	CAA	ACC	GTC	GTC	
A	G	A	D	T	G	T	P	H	W	N	N	K	E	A	L	V	E	F	K	D	A	H	A	K	R	Q	T	V	V	
			1270		1280		1290					1300			1310			1320					1330			1340				
GTT	CTG	GGG	AGC	CAG	GAA	GGA	GCC	GTT	CAC	ACG	GCT	CTC	GCT	GGA	GCT	CTA	GAG	GCT	GAG	ATG	GAT	GGT	GCA	AAG	GGA	AAG	CTG	TTC	<u>TCT</u>	
V	L	G	S	Q	E	G	A	V	H	T	A	L	A	G	A	L	E	A	E	M	D	G	A	K	G	K	L	F	<u>S</u>	
			1360		1370		1380					1390			1400			1410					1420			1430				
<u>GGC</u>	<u>CAT</u>	<u>TTG</u>	<u>AAA</u>	<u>TGC</u>	<u>CGC</u>	<u>CTC</u>	<u>AAA</u>	<u>ATG</u>	<u>GAC</u>	<u>AAG</u>	<u>CTT</u>	<u>AGA</u>	<u>CTA</u>	<u>AAA</u>	<u>GGC</u>	<u>ACC</u>	<u>ACC</u>	<u>TAC</u>	<u>GGC</u>	<u>ATG</u>	<u>TGC</u>	<u>ACG</u>	<u>GAA</u>	<u>AAG</u>	<u>TTT</u>	<u>TCT</u>	<u>TTT</u>	<u>GCA</u>	<u>AAA</u>	
G	H	L	K	C	R	L	K	M	D	K	L	R	L	K	G	T	T	Y	G	M	C	T	E	K	F	S	F	A	K	
			1450		1460		1470					1480			1480			1480					1500			1510			1520	
AAT	CCG	GCT	GAC	ACG	GGT	CAC	GGC	ACT	GTG	GTC	CTT	GAA	CTG	CAG	TAC	ACG	GGA	TCT	GAC	GGA	CCT	TGC	AAA	ATC	CCA	ATT	TCC	ATT	GTG	
N	P	A	D	T	G	H	G	T	V	V	L	E	L	Q	Y	T	G	S	D	G	P	C	K	I	P	I	S	I	V	
			1540		1550		1560					1570			1580			1590					1600			1610				
GCA	TCA	CTT	TCC	GAT	CTC	ACC	CCC	ATT	GGT	AGA	ATG	GTT	ACA	GCA	AAC	CCT	TAT	GTG	GCT	TCA	TCC	GAA	GCC	AAC	GCG	AAA	GTG	TTG	GTT	
A	S	L	S	D	L	T	P	I	G	R	M	V	T	A	N	P	Y	V	A	S	S	E	A	N	A	K	V	L	V	
			1630		1640		1650					1660			1670			1680					1690			1700				
GAG	ATG	GAA	CCA	CCA	TTT	GGA	GAT	TCA	TAT	ATT	GTG	GTT	GGA	AGA	GGG	GAT	AAG	CAG	ATA	AAC	CAT	CAC	TGG	CAC	AAA	GCA	GGA	AGT	TCC	
E	M	E	P	P	F	G	D	S	Y	I	V	V	G	R	G	D	K	Q	I	N	H	H	W	H	K	A	G	S	S	
			1720		1730		1740					1750			1760			1770					1780			1790				
ATT	GGA	AAA	GCG	TTC	ATC	ACC	ACT	ATC	AAA	GGG	GCA	CAG	CGT	CTA	GCT	GCC	CTA	GGC	GAC	ACA	GCG	TGG	GAC	TTT	GGG	TCG	GTC	GGA	GGG	
I	G	K	A	F	I	T	T	I	K	G	A	Q	R	L	A	A	L	G	D	T	A	W	D	F	G	S	V	G	G	
			1810		1820		1830					1840			1850			1860					1870			1880				
ATT	TTC	AAT	TCT	GTA	GGA	AAG	GCG	GTA	CAT	CAG	GTC	TTT	GGA	GGA	GCC	TTC	AGA	ACT	CTC	TTC	GGT	GGC	ATG	TCC	TGG	ATC	ACC	CAG	GGT	
I	F	N	S	V	G	K	A	V	H	Q	V	F	G	G	A	F	R	T	L	F	G	G	M	S	W	I	T	Q	G	
			1900		1910		1920					1930			1940			1950					1960			1970				
CTA	ATG	GGA	GCT	CTG	CTT	CTA	TGG	ATG	GGG	GTG	AAT	GCG	AGA	GAT	CGA	TCC	ATC	GCA	CTG	GTG	ATG	TTA	GCC	ACG	GGA	GGG	GTG	<u>CTC</u>	<u>CTC</u>	
L	M	G	A	L	L	L	W	M	G	V	N	A	R	D	R	S	I	A	L	V	M	L	A	T	G	G	V	L	L	
			1990		2000		2010					2020			2030			2040					2050			2060				
<u>TTT</u>	<u>CTC</u>	<u>GCC</u>	<u>ACA</u>	<u>AAC</u>	<u>GTC</u>	<u>CAT</u>	<u>GCA</u>	<u>TAA</u>	<u>TTT</u>																					

3.3 Transfektion von 293T-Zellen zur Herstellung pseudotypisierter Partikel

Transfektion ist das Einbringen genetischen Materials, wie z. B. Plasmid-DNA, in eukaryotischen Zellen. Durch eine Kotransfektion lassen sich mehrere DNA-Konstrukte parallel in eine Zelle einbringen, wodurch die Herstellung pseudotypisierter Partikel realisiert wird. Die in dieser Arbeit verwendete Strategie zur transienten DNA-Transfektion orientierte sich an Arbeiten der Laborgruppe, die bereits erfolgreich eine Produktion von DENV-prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln durchführen konnte.^{4,5} Ziel war eine Erweiterung des Systems auf weitere Flaviviren, insbesondere auf das Zikavirus.

Die allgemeine Vorgehensweise zur Herstellung pseudotypisierter Partikel ist in Abbildung 27 dargestellt. Mittels isolierter RNA wurde zunächst cDNA synthetisiert. Die jeweiligen prM/E-kodierenden Genfragmente wurden mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide von den entsprechenden cDNA-*templates* amplifiziert, um schließlich in den Expressionsvektor pHA kloniert zu werden. Die so erhaltenen Hüllproteinplasmide wurden anschließend zusammen mit dem replikations-inkompetenten HIV-1-Vektor pNL Luc AM in HEK293T-Zellen transfiziert. pNL Luc AM besitzt in dem *env*-Genomabschnitt ein Luciferase-Gen unter der Kontrolle des SV40-Promoters. Eine gleichzeitige Transfektion des HIV-basierenden Vektors und eines prM/E-Expressionsvektors resultiert in einer Bildung von HIV-1-Partikeln, dessen Hüllproteine durch die des Expressionsvektors ausgetauscht wurden. Aufgrund der Mutationen im HIV-1-Genom wird kein vollständiger Viruszyklus durchlaufen und eine Vermehrung dieser pseudotypisierter Partikel ist prinzipiell nicht möglich (*single round infection*). Durch die Expression des Enzyms Luciferase kann aber der Viruseintritt in die Wirtszelle gemessen werden. Dieses System lässt so eine Analyse von verschiedenen Hüllproteinen, sei es von natürlichen Viren, Chimären oder Mutanten, zu.

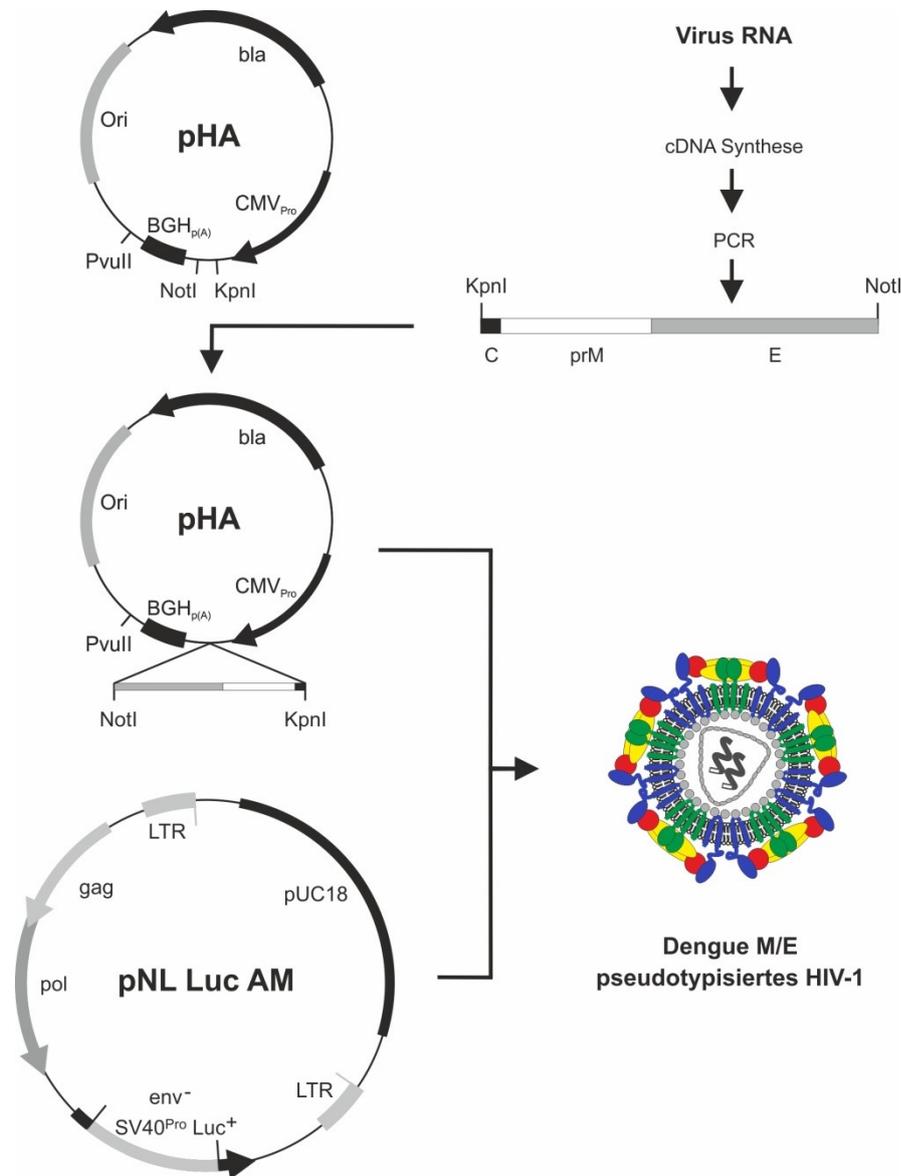


Abb. 27: Klonierungsstrategie für HIV-1-Pseudotypen

Um die prM/E-kodierenden Genfragmente zu erhalten, wurde virale RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer PCR mit spezifischen Primern als *template* eingesetzt.

Über die Schnittstellen KpnI und NotI wurden diese prM/E-Genfragmente in den Expressionsvektor pHA kloniert.

Eine Kotransfektion mit dem Luciferase-Reporter-Vektor pNL Luc AM führte zu der Bildung von prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln. Diese Partikel tragen das HIV-1-Genom mit dem Luciferase-Gen im Inneren und die Hüllproteine des Zikavirus an dessen Oberfläche.

3.3.1 Etablierung eines Transfektionssystems für prM/E pseudotypisiertes HIV-1

In dieser Arbeit wurde ein neues System zur Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung von prM/E-pseudotypisierter HIV-1-Partikeln eingeführt. Die bestehende Methode mit dem Transfektionsreagenz ScreenFect[®] A (ScreenFect GmbH) wurde durch eine mit Polyethylenimin (PEI) ersetzt. Die Verwendung dieses synthetischen Polymers sollte als eine günstige Alternative zu dem kommerziellen Transfektionsreagenz dienen. Die positiven Aminogruppen des PEI reagieren mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Durch elektrostatische Kräfte werden sogenannte Polyplexe gebildet, das heißt Komplexe aus Polymer und DNA. Die kationischen Polyplexe binden an die anionische Zellmembran und werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Eine Protonierung im Inneren der Zelle führt zu einem Zustrom von Ionen und somit zu einer Verringerung des osmotischen Potentials. Durch eine osmotische Schwellung platzt das Endosom und der Polymer-DNA-Komplex wird freigegeben.^{50,51}

Der Ablauf aller in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionsexperimente war im Prinzip derselbe. Das Protokoll wurde angelehnt an das bereits etablierte Vorgehen der Laborgruppe Schreiber mit dem Transfektionsreagenz ScreenFect[®] A und das Protokoll für die Produktion von Lentiviren von Addgene. Am Tag vor der Transfektion wurden HEK293T-Zellen in eine Kavität einer 24-well-Platte ausgesät und inkubiert (37 °C, 5 % CO₂), so dass nach 20 Stunden eine Dichte von 80 % resultierte. Anschließend wurde das Medium durch 420 µl DMEM suppl., welches mit 25 µM Chloroquindiphosphat versetzt war, ersetzt und die Zellen für weitere 5 h inkubiert (37 °C, 5 % CO₂). In einem Reaktionsgefäß wurden 2,6 µg des gewünschten Hüllprotein-exprimierenden Vektors und 12,4 µg pNL Luc AM mit OptiPro SFM (Thermo Fisher Scientific) auf ein Gesamtvolumen von 40 µl gebracht. Ebenso wurde dies für das PEI-Transfektionsreagenz in einem weiteren Reaktionsgefäß durchgeführt, bevor dieses langsam zu der verdünnten DNA getropft wurde. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT wurde die Transfektionslösung vorsichtig auf die HEK293T-Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation der Zellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂, wonach die Transfektionslösung vorsichtig abgenommen und durch 1 ml DMEM suppl. ersetzt wurde. Die Auswertung mit Hilfe eines Mikroplattenluminometers erfolgte nach 48 Stunden.

3.3.1.1 Ermittlung der benötigten Menge an PEI-Transfektionsreagenz

Bevor mit den Transfektionsexperimenten begonnen wurde, musste die optimale Menge an PEI-Transfektionsreagenz ermittelt werden. Für die Transfektion wurde kein Hüllprotein-Vektor, sondern lediglich 2,6 µg der Vektor-DNA von pNL Luc AM eingesetzt. Das auf dem Vektor lokalisierte Reporter-gen für Luciferase lässt die Detektion der Transfektionseffizienz in einem Luminometer zu. Dafür wurden HEK293T-Zellen mit unterschiedlichen DNA-PEI-Verhältnissen von 1:1 bis 1:6 transfiziert. Der Versuch wurde dabei in Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Ablauf entsprach der zuvor beschriebenen Vorgehensweise (3.3.1).

Nach einer 48-stündigen Inkubation folgte die Auswertung mit Hilfe des Luminometers. Dabei wurde die Hälfte des Zelllysats (50 µl von 100 µl) in einer weißen unbeschichteten 96-well-Platte mit 50 µl Bright-Glo™ (Promega Corporation) versetzt und nach einer 5-minütigen Inkubation im Luminometer vermessen (2.5.4).

Unabhängig von der Menge der verwendeten PEI-Menge wurden bei allen Ansätzen Werte um die $3,20 \cdot 10^7$ RLU / 50 µl Zelllysats gemessen (Tab. 10). Das bedeutet, dass eine größere Menge an PEI nicht gleichzeitig auch zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz führt. Für die zukünftigen Transfektionsexperimente wurde aus diesem Grund ein DNA-PEI-Verhältnis von 1:1 gewählt.

Tab. 10: Luciferase-Aktivitäten der pNL Luc AM-transfizierten HEK293T-Zellen zur Ermittlung des DNA-PEI-Verhältnisses

pNL Luc AM	2,6 µg					
	2,6 µg	5,2 µg	7,8 µg	10,4 µg	13,0 µg	15,6 µg
Luciferase-Aktivität RLU / 50 µl Zelllysats	$3,31 \cdot 10^7$	$3,17 \cdot 10^7$	$3,24 \cdot 10^7$	$3,31 \cdot 10^7$	$3,25 \cdot 10^7$	$3,25 \cdot 10^7$
	$3,30 \cdot 10^7$	$3,20 \cdot 10^7$	$3,24 \cdot 10^7$	$3,27 \cdot 10^7$	$3,26 \cdot 10^7$	$3,30 \cdot 10^7$
	$3,30 \cdot 10^7$	$3,18 \cdot 10^7$	$3,24 \cdot 10^7$	$3,27 \cdot 10^7$	$3,23 \cdot 10^7$	$3,24 \cdot 10^7$
∅	$3,30 \cdot 10^7$	$3,18 \cdot 10^7$	$3,24 \cdot 10^7$	$3,28 \cdot 10^7$	$3,25 \cdot 10^7$	$3,26 \cdot 10^7$

3.3.1.2 Vergleich der Transfektionseffizienz der Reagenzien PEI und ScreenFect® A

Für die Etablierung der neuen Transfektionsmethode mit Polyethylimin (PEI) wurde zusätzlich ein Vergleich mit dem bisher verwendeten kommerziellen Transfektionsreagenz ScreenFect® A (ScreenFect GmbH) durchgeführt. Hierfür wurden zwei verschiedene Mengen des Luciferase -Reporter-Gen-Vektors pNL Luc AM eingesetzt (2,6 µg und 5,2 µg) und jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Während die Transfektion mit dem PEI-Reagenz wie zuvor beschrieben (3.3.1) durchgeführt wurde, wurde die mit ScreenFect® A nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurde das Protokoll der Ein-Schritt-Methode gewählt. HEK293T-Zellen wurden in einer Kulturflasche so ausgesät, dass diese zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 80 % aufwiesen. Nach der Verdünnung der entsprechenden DNA-Menge mit dem beigefügten Puffer in einem Reaktionsgefäß wurde das ScreenFect®-Reagenz in einem weiteren Gefäß verdünnt. Die Menge der Reagenzien war mit einem Verhältnis von 1:1 zur eingesetzten DNA-Menge bei beiden Transfektionsmethoden identisch. Das verdünnte Reagenz wurde anschließend langsam zu der verdünnten DNA getropft und die Transfektionslösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In die Kavität einer 24-well-Platte wurden 420 µl einer Zellsuspension vorgelegt und der Transfektionskomplex dazugegeben. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C und 5 %CO₂ wurde der Komplex von den Zellen abgenommen und durch 1 ml RPMI ersetzt.

Sowohl die Auswertung der Transfektion mit PEI als auch mit ScreenFect® A wurde nach zwei Tagen mit Hilfe eines Mikroplattenluminometers realisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der Transfektion mit 2,6 µg pNL Luc AM, so stellt man fest, dass die Transfektionseffizienz des PEI-Reagenz mit Werten von $3,16 \cdot 10^7$ RLU / 50 µl Zelllysate im Gegensatz zu den Werten für das ScreenFect® A von etwa $2,20 \cdot 10^7$ RLU pro 50 µl Zelllysate leicht höher ausfällt. Bei der Transfektion mit 5,2 µg des Luciferase-Reporter-Gen-Vektors liegen die Werte der beiden Transfektionsreagenzien im Bereich von etwa $3,20 \cdot 10^7$ RLU / 50 µl Zelllysate.

Ergebnis war, dass die Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem kostengünstigen selbsthergestellten PEI-Reagenz eine gleichwertige Effizienz wie die mit dem kommerziellen Transfektionsreagenz ScreenFect® A aufwies.

Tab. 11: Luciferase-Aktivitäten der pNL Luc AM-transfizierten HEK293T-Zellen zum Transfektionsvergleich PEI/ScreenFect® A

pNL Luc AM	2,6 µg		5,2 µg	
Reagenz	PEI	ScreenFect® A	PEI	ScreenFect® A
Luciferase-Aktivität RLU / 50 µl Zelllysate	$3,16 \cdot 10^7$	$2,15 \cdot 10^7$	$3,17 \cdot 10^7$	$3,32 \cdot 10^7$
	$3,16 \cdot 10^7$	$2,21 \cdot 10^7$	$3,17 \cdot 10^7$	$3,22 \cdot 10^7$
	$3,16 \cdot 10^7$	$2,23 \cdot 10^7$	$3,18 \cdot 10^7$	$3,25 \cdot 10^7$
∅	$3,16 \cdot 10^7$	$2,19 \cdot 10^7$	$3,17 \cdot 10^7$	$3,26 \cdot 10^7$

3.3.2 Herstellung von USUV-, WNV-, JEV- und YFV-prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln

Zunächst wurden pseudotypisierte HIV-1-Partikel mit den Hüllproteinen von Usutu-, West-Nil-, Japanische-Enzephalitis- und Gelbfiebervirus mittels Kotransfektion hergestellt. Für die Transfektion der 293T-Zellen wurden 12,4 µg des entsprechenden Expressionsvektors (pHA-USU-BH65, pHA-WN-NY, pHA-JE-NAK bzw. pHA-YF-17D) und 2,6 µg des Reporter-Vektors pNL Luc AM eingesetzt. Der Versuch wurde jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Verfahren wurde wie zuvor beschrieben mit der PEI-Transfektionsmethode (3.3.1). Nach 48 h wurden die Zellen mit Hilfe des überstehenden Mediums von der 24-*well*-Platte abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt (10.000 rpm, 1 min) wurden die Zellen in je 100 µl Lysispuffer gelöst und bei -20 °C gelagert. Für die Auswertung der Transfektionseffizienz wurden 50 µl der lysierten Zellen in einer weißen unbeschichteten 96-*well*-Platte mit 50 µl Bright-Glo™ (Promega Corporation) versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung in dem Mikroplattenluminometer erfolgte für 1 Sekunde pro *well* mit einem vorherigen Schütteln der Platte für 2 Sekunden. In Tabelle 12 sind die ermittelten Messwerte in RLU / 50 µl Zelllysate zusammengefasst. Die Messwerte unterlagen Schwankungen von bis zu einer Zehnerpotenz, wie bei der Transfektion mit pHA-JE-NAK zu sehen. Dennoch war eine Tendenz zu erkennen, nach der die Transfektionseffizienz mit dem Expressionsvektor für YF-prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln am höchsten war ($4,43 \cdot 10^6$ RLU / 50 µl Zelllysate). Absteigend folgten danach die Transfektionen mit pHA-WN-NY ($3,26 \cdot 10^6$ RLU / 50 µl Zelllysate), pHA-USU-BH65 ($1,87 \cdot 10^6$ RLU / 50 µl Zelllysate) und schließlich pHA-JE-NAK ($1,26 \cdot 10^6$ RLU / 50 µl Zelllysate). Bei allen Flaviviren konnten erfolgreich hohe Transfektionsraten gemessen werden.

Tab. 12: Luciferase-Aktivitäten der USUV, WNV, JEV und YFV transfizierten HEK293T-Zellen

Expressionsvektor	pHA-USU-BH65	pHA-WN-NY	pHA-JE-NAK	pHA-YF-17D
Luciferase-Aktivität RLU / 50 µl Zelllysate	$9,83 \cdot 10^5$	$8,27 \cdot 10^5$	$2,53 \cdot 10^5$	$1,12 \cdot 10^6$
	$9,70 \cdot 10^5$	$1,82 \cdot 10^6$	$1,07 \cdot 10^6$	$1,58 \cdot 10^6$
	$3,65 \cdot 10^6$	$7,14 \cdot 10^6$	$2,46 \cdot 10^6$	$7,45 \cdot 10^6$
∅	$1,87 \cdot 10^6$	$3,26 \cdot 10^6$	$1,26 \cdot 10^6$	$4,43 \cdot 10^6$

3.3.3 Herstellung von ZIKV-prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln

Durch Kotransfektion wurden ZIKV-prM/E-pseudotypisierte HIV-1-Partikel der verschiedenen Zikastämme hergestellt. HEK293T-Zellen wurden dafür mit 2,4 µg pNL Luc AM und dem entsprechenden Expressionsvektor (pHA-Z41519, pHA-ZIKA-ArD, pHA-Z41524 bzw. pHA-ZIKA-H/PF) transfiziert. Das Vorgehen erfolgte nach dem etablierten Protokoll für PEI (3.3.1) in Dreifachbestimmung.

Die Hälfte der lysierten Zellen (50 µl) wurde für die Messung der Transfektionseffizienz im Luminometer verwendet. Die in einer weißen 96-well-Platte erfolgte Messung lieferte die Ergebnisse in Tabelle 13. Die zugehörigen Mittelwerte wurden ebenso ermittelt und in die Tabelle eingetragen. Trotz Schwankungen in den Messwerten ließ sich eindeutig erkennen, dass die Transfektion mit pHA-ZIKA-H/PF die höchsten Werte mit einem Mittelwert von $3,08 \cdot 10^7$ RLU / 50 µl Zelllysate aufwies. Dahinter folgten die Transfektion mit pHA-ZIKA-ArD ($4,70 \cdot 10^6$ RLU / 50 µl Zelllysate), pHA-Z41524 ($2,24 \cdot 10^6$ RLU / 50 µl Zelllysate) und pHA-Z41519 ($1,50 \cdot 10^6$ RLU / 50 µl Zelllysate).

Ergebnis war, dass bei allen Zika-Expressionsvektoren Luciferase-Aktivitäten gemessen werden konnten. Die Kotransfektion mit den Hüllproteinen des Zikastamms H/PF/2013, welches die funktionelle Erkennungssequenz NDT für die N-Glykosylierung des E-Proteins trug, wies dabei die größte Transfektionseffizienz auf.

Tab. 13: Luciferase-Aktivitäten der ZIKV-transfizierten HEK293T-Zellen

Expressionsvektor	pHA-Z41519	pHA-ZIKA-ArD	pHA-Z41524	pHA-ZIKA-H/PF
Luciferase-Aktivität RLU / 50 µl Zelllysate	$3,99 \cdot 10^5$	$6,00 \cdot 10^6$	$2,97 \cdot 10^6$	$2,95 \cdot 10^7$
	$1,70 \cdot 10^6$	$5,15 \cdot 10^6$	$1,30 \cdot 10^6$	$3,08 \cdot 10^7$
	$2,39 \cdot 10^6$	$2,96 \cdot 10^6$	$2,45 \cdot 10^6$	$3,23 \cdot 10^7$
∅	$1,50 \cdot 10^6$	$4,70 \cdot 10^6$	$2,24 \cdot 10^6$	$3,08 \cdot 10^7$

3.3.4 Herstellung von pseudotypisierten HIV-1-Partikeln mit prM/E der USUV-ZIKV-Chimären

Während dieser Versuche wurden pseudotypisierte HIV-1 Partikel mit den Hüllproteinen der Chimäre pHA-U₁₂Z₃ und pHA-Z₁₂U₃ hergestellt. Dies bedeutet, dass die Partikel, die bei einer Transfektion mit pHA-U₁₂Z₃ und pNL Luc AM gebildet wurden auf ihrer Oberfläche E-Proteine mit der Domäne 1 und 2 vom Usutuvirus und Domäne 3 vom Zikavirus trugen. Analog galt für pHA-Z₁₂U₃ die umgekehrte Version. Die Kotransfektion erfolgte wie bereits in Kapitel 3.3.1 beschrieben mit dem PEI-Reagenz. Die Luciferase-Aktivität der transfizierten HEK293T-Zellen wurde nach der Lyse derselben bestimmt (Tab. 14).

Verglich man die beiden Mittelwerte der Chimär-Konstrukte miteinander, so stellte man keinen großen Unterschied in den Luciferase-Aktivitäten fest, beide wiesen eine erfolgreiche Transfektion auf.

Tab. 14: Luciferase-Aktivitäten der mit pHA-U₁₂Z₃ und pHA-Z₁₂U₃ transfizierten HEK293T-Zellen

Expressionsvektor	pHA-U ₁₂ Z ₃	pHA-Z ₁₂ U ₃
Luciferaseaktivität RLU / 50 µl Zelllysate	2,03·10 ⁵	2,15·10 ⁵
	1,74·10 ⁵	1,67·10 ⁵
	2,32·10 ⁵	1,29·10 ⁵
∅	2,03·10 ⁵	1,71·10 ⁵

3.4 Infektion von VeroB4-Zellen mit pseudotypisierten Partikeln

Für die Infektion von VeroB4-Zellen wurden die Überstände der Kotransfektionen verwendet. Während der lipophilen Transfektion wurden die pseudotypisierten Partikel aus den HEK293T-Zellen geschleust, so dass sich eukaryotische Zellen mit den Zellkulturüberständen infizieren ließen. Durch die Kotransfektion mit pNL Luc AM trugen die pseudotypisierten Partikel ebenfalls das Luciferase-Reportergen, welches nach dem Eintritt in die Wirtszelle abgelesen wurde. Aus diesem Grund ließ sich eine erfolgreiche Infektion über die Luciferase-Aktivität in den Zellen nachweisen.

Die Infektionsexperimente wurden in weißen 96-*well*-Zellkulturplatten (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die VeroB4-Zellen wurden zuvor so ausgesät, dass die Kavitäten zum Zeitpunkt der Infektion zu 80 % adhärent bedeckt waren. Die partikelhaltigen Überstände wurden für die Infektion verdünnt. Dazu wurden zunächst Ansätze mit 100 µl angesetzt und auf die VeroB4-Zellen gegeben. Nach einer Adsorption für eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden pro *well* weitere 100 µl DMEM suppl. hinzugegeben. Die Auswertung der Infektionen erfolgte nach drei Tagen Inkubation (37 °C, 5 % CO₂). Dazu wurde die Luciferase-Aktivität der infizierten Zellen mit Hilfe eines Luminometers gemessen. Für die Messung wurde der Zellkulturüberstand verworfen, die Platte ausgeklopft und 100 µl Bright-Glo™ (Promega Corporation) zu den Zellen gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei RT wurde die Platte im Luminometer für 2 Sekunden geschüttelt, wonach die Luciferase-Aktivität für 1 Sekunde pro *well* gemessen wurde.

3.4.1 Infektion von VeroB4-Zellen mit USUV-, WNV-, JEV- und YFV-prM/E-pseudotypisierten HIV-1-Partikeln

Die ersten Infektionsexperimente wurden mit den Zellkulturüberständen durchgeführt, welche durch Kotransfektion von Usutu-, West-Nil-, Japanische-Enzephalitis- und Gelbfiebervirus mit dem Luciferase-Reporter-Gen-Vektor pNL Luc AM entstanden (3.3.3, S. 63). Dabei wurden die VeroB4-Zellen mit den jeweiligen Überständen in den Endverdünnungen von 1:2, 1:5 und 1:10 der Dreifachbestimmung aus der Transfektion infiziert. Aus diesem Grund wurden die jeweiligen Zellkulturüberstände zunächst 1:1, 1:2,5 und 1:5 auf ein Volumen von 100 μ l bezogen auf die Zellen gegeben. Die Verdünnungen wurden mit DMEM suppl. seriell in der 96-well-Kulturplatte durchgeführt. Nach einer einstündigen Adsorption wurden weitere 100 μ l Medium dazugegeben, so dass die jeweiligen Endverdünnungen resultierten. Die Messung der Effizienz fand drei Tage nach der Infektion statt. Die Luciferase-Aktivitäten der mit den Flavivirus-Hüllprotein-pseudotypisierten Partikeln infizierten VeroB4-Zellen sind in Tabelle 15 zusammengefasst. Wie dort zu erkennen, wiesen die Messungen der Luciferase-Aktivität [RLU] Schwankungen auf, so dass sich keine eindeutige Aussage über die Infektionseffizienz treffen ließ. Auch die Leerwerte des Luciferase-Assays wiesen leichte Schwankungen auf, befanden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von < 60 RLU. Trotz der schwankenden Werte konnten bei der Infektion der VeroB4-Zellen mit den partikelhaltigen Überständen des Usutuvirus die höchsten Luciferase-Aktivitäten gemessen werden. Der Mittelwert für die 1:2-verdünnte Infektion betrug $7,71 \cdot 10^4$ RLU. Bei den Infektionen der Zellen mit den West-Nil-Virus pseudotypisierten Partikeln befanden sich die Werte aller Verdünnungen zwischen 60 und $4,08 \cdot 10^3$ RLU. Für das Japanische-Enzephalitis-Virus wurden Werte zwischen 60 und $1,29 \cdot 10^3$ RLU gemessen. Die Infektion der Zellen mit dem Gelbfiebervirus resultierte in Luciferase-Aktivitäten zwischen 60 und $2,98 \cdot 10^4$ RLU. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Mittelwerte der einzelnen Verdünnungen bei JEV alle in einem Bereich von $6,00 \cdot 10^2$ bis $6,63 \cdot 10^2$ RLU lagen. Die mit pHA-YF-17D kotransfizierten HEK293T-Zellen wiesen mit einer höheren Verdünnung der Überstände auch höhere Mittelwerte der jeweiligen Luciferase-Aktivität auf. Bezugnehmend auf die einzelnen Verdünnungen ließ sich bei den Transfektionen mit USUV und WNV keine Tendenz erkennen.

Das Ergebnis war, dass bei allen verwendeten Flavivirus-Hüllproteinen Infektionen gemessen werden konnten. Insgesamt war die Infektion hier beim Usutuvirus am besten, gefolgt vom West-Nil-, Gelbfieber- und Japanische-Enzephalitis-Virus (Abb. 28).

Tab. 15: Luciferase-Aktivitäten der mit USUV, WNV, JEV und YFV infizierten VeroB4-Zellen

Verdünnung	pHA-USU-BH65	pHA-WN-NY	pHA-JE-NAK	pHA-YF-17D
1:2	$1,27 \cdot 10^5$	$3,80 \cdot 10^2$	$3,40 \cdot 10^2$	$4,40 \cdot 10^2$
	$1,60 \cdot 10^4$	$7,10 \cdot 10^2$	$9,60 \cdot 10^2$	$8,30 \cdot 10^2$
	$8,80 \cdot 10^4$	$2,35 \cdot 10^3$	$6,90 \cdot 10^2$	$4,80 \cdot 10^2$
∅	$7,71 \cdot 10^4$	$1,15 \cdot 10^3$	$1,23 \cdot 10^2$	$6,63 \cdot 10^2$
1:5	$1,12 \cdot 10^4$	$1,92 \cdot 10^3$	$8,20 \cdot 10^2$	$1,99 \cdot 10^4$
	$1,24 \cdot 10^3$	$1,10 \cdot 10^2$	$2,20 \cdot 10^2$	$3,50 \cdot 10^2$
	$3,08 \cdot 10^4$	$4,08 \cdot 10^3$	$7,60 \cdot 10^2$	$4,59 \cdot 10^3$
∅	$1,44 \cdot 10^4$	$2,04 \cdot 10^3$	$2,23 \cdot 10^2$	$6,00 \cdot 10^2$
1:10	$3,17 \cdot 10^4$	$6,00 \cdot 10^2$	$5,20 \cdot 10^2$	$6,00 \cdot 10^1$
	$8,20 \cdot 10^2$	$1,52 \cdot 10^3$	$6,00 \cdot 10^1$	$2,98 \cdot 10^4$
	$2,82 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^3$	$1,29 \cdot 10^3$	$6,00 \cdot 10^1$
∅	$2,02 \cdot 10^4$	$9,43 \cdot 10^2$	$1,23 \cdot 10^2$	$6,23 \cdot 10^2$

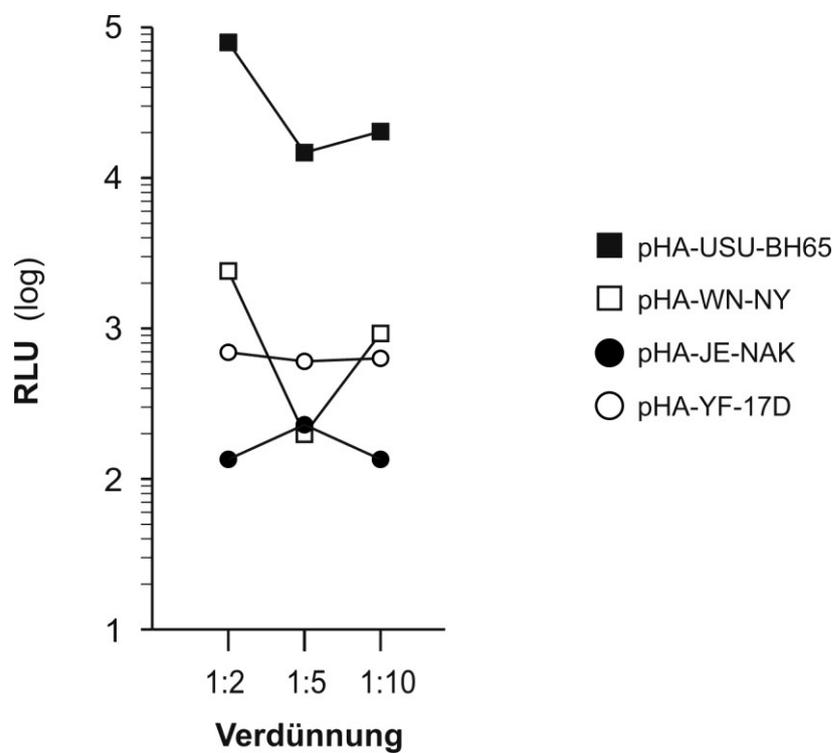


Abb. 28: Infektion mit USU-, WN-, JE- und YF-Pseudotypen

Vero-B4-Zellen wurden mit Verdünnungen von Zellkulturüberständen infiziert die mit den folgenden Vektoren kotransfiziert waren:

- pHA-USU-BH65 + pNL Luc AM
- pHA-WN-NY + pNL Luc AM
- pHA-JE-NAK + pNL Luc AM
- pHA-YF-17D + pNL Luc AM

Dargestellt ist die Luciferase-Aktivität von Zelllysaten infizierter VeroB4-Zellen an Tag 3 nach Infektion.

3.4.2 Infektion von VeroB4-Zellen mit ZIKV-HIV-1-pseudotypisierten Partikeln

Im weiteren Verlauf wurden die Infektionseffizienzen der pseudotypisierten Partikel der verschiedenen Zikastämme untersucht. Dabei wurden die mittels Kotransfektion hergestellten partikelhaltigen Zellkulturüberstände (3.3.3) verwendet. VeroB4-Zellen wurden mit den verdünnten Überständen infiziert. Für die pseudotypisierten Partikel der Zikastämme Dakar41519, ArD158084 und Dakar41524 waren dies Verdünnungen von 1:2, 1:5 und 1:10. Die mit dem Expressionsvektor pHA-ZIKA-H/PF hergestellten partikelhaltigen Überstände wurden 1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt. Diese Verdünnungen bezogen sich dabei auf das Endvolumen von 200 µl nach der einstündigen Adsorption und Zugabe von Medium.

Für die Messung wurde das Luminometer, wie zuvor, so eingestellt, dass vor der Messung ein Schütteln der Platte für zwei Sekunden stattfand. Die Messung selbst wurde für eine Sekunde pro *well* durchgeführt. Die Ergebnisse des Luciferase-Assays sind in Tabelle 16 dargestellt. Die Leerwerte des Assays wiesen leichte Schwankungen auf, befanden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von < 60 RLU. Auch die Messwerte unterlagen Schwankungen, wodurch sich keine eindeutige Aussage über die Infektionseffizienz treffen ließ. Für die Infektion der Zellen mit den pseudotypisierten Partikeln mit Hüllproteinen des Zikastammes Dakar41519 wurden bei einer 1:2-Verdünnung im Mittel die höchsten Werte gemessen ($6,05 \cdot 10^4$ RLU). Danach folgten die Werte der Zikastämme ArD158084 mit $4,59 \cdot 10^4$ RLU und Dakar41524 mit $3,49 \cdot 10^4$ RLU. Bei einer 1:5-Verdünnung der Überstände wurden die höchsten Werte bei ArD158084 ($4,90 \cdot 10^4$ RLU), gefolgt von Dakar41519 mit $4,30 \cdot 10^4$ RLU. Die Partikel aus der Kotransfektion mit pHA-ZIKA-H/PF wiesen unter diesen Bedingungen einen Mittelwert von $1,83 \cdot 10^4$ RLU auf. Die geringste Luciferase-Aktivität wurde bei den Partikeln des Zikastammes Dakar41524 gemessen.

Die Luciferase-Aktivitäten zeigten die höchste Infektion der VeroB4-Zellen bei den pseudotypisierten Partikeln mit den Hüllproteinen des Zikastammes Dakar41519, welcher die Erkennungssequenz NDT für die N-Glykosylierung trug.

Tab. 16: Luciferase-Aktivitäten der mit ZIKV infizierten VeroB4-Zellen

Verdünnung	pHA-Z41519	pHA-ZIKA-ArD	pHA-Z41524	pHA-ZIKA-H/PF
1:2	$1,45 \cdot 10^5$	$7,74 \cdot 10^4$	$5,10 \cdot 10^2$	-
	$2,50 \cdot 10^4$	$5,10 \cdot 10^2$	$2,75 \cdot 10^4$	-
	$1,13 \cdot 10^4$	$5,98 \cdot 10^4$	$7,65 \cdot 10^4$	-
\emptyset	$6,05 \cdot 10^4$	$4,59 \cdot 10^4$	$3,49 \cdot 10^4$	-
1:5	$6,30 \cdot 10^4$	$5,64 \cdot 10^4$	$1,05 \cdot 10^4$	$3,67 \cdot 10^4$
	$6,44 \cdot 10^4$	$8,56 \cdot 10^4$	$1,90 \cdot 10^4$	$1,28 \cdot 10^4$
	$1,70 \cdot 10^3$	$5,02 \cdot 10^3$	$2,62 \cdot 10^3$	$5,41 \cdot 10^3$
\emptyset	$4,30 \cdot 10^4$	$4,90 \cdot 10^4$	$1,07 \cdot 10^4$	$1,83 \cdot 10^4$
1:10	$7,47 \cdot 10^3$	$2,54 \cdot 10^4$	$9,00 \cdot 10^1$	$4,60 \cdot 10^2$
	$6,09 \cdot 10^4$	$2,66 \cdot 10^4$	$6,00 \cdot 10^1$	$4,20 \cdot 10^2$
	$9,00 \cdot 10^1$	$1,10 \cdot 10^2$	$8,62 \cdot 10^3$	$3,20 \cdot 10^2$
\emptyset	$2,28 \cdot 10^4$	$1,74 \cdot 10^4$	$2,92 \cdot 10^3$	$4,00 \cdot 10^2$
1:20	-	-	-	$4,30 \cdot 10^2$
	-	-	-	$1,70 \cdot 10^2$
	-	-	-	$1,50 \cdot 10^2$
\emptyset	-	-	-	$2,50 \cdot 10^2$

3.4.3 Infektion von VeroB4-Zellen mit USUV-ZIKV-Chimären-pseudotypisierter HIV-1-Partikel

Zuletzt wurden VeroB4-Zellen mit den Zellkulturüberständen der Kotransfektion mit den Expressionsvektoren für die Hüllproteine der USUV-ZIKV-Chimäre infiziert. Für die Infektion wurden die Überstände der Dreifachbestimmung aus der Transfektion verdünnt auf die Zellen gegeben. Dabei wurde aus der 1:5-Endverdünnung eine serielle Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 1:640 direkt in den weißen 96-*well*-Platten hergestellt.

Nach drei Tagen Inkubation wurde das Medium verworfen, die Platte ausgeklopft und es wurden pro *well* 100 µl Bright-Glo™ (Promega Corporation) zu den adhären Zellen gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Platte vermessen. Hierzu wurde das Programm des Luminometers so eingestellt, dass ein Schütteln für 2 Sekunden vor der Messung durchgeführt wurde. Die relativen Lichteinheiten (RLU), die nach 1 Sekunde in dem jeweiligen *well* gemessen wurden, sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Die Leerwerte des Assays wiesen leichte Schwankungen auf, befanden sich aber bei den angegebenen Messbedingungen im Bereich von < 60 RLU. Auch die Messwerte unterlagen Schwankungen, wodurch sich keine eindeutige Aussage über die Infektionseffizienz treffen ließ. Betrachtete man die Mittelwerte der Infektionen mit 1:5-verdünnten Überständen, so wiesen diese mit $1,14 \cdot 10^4$ RLU (pHA-U₁₂Z₃) und $1,50 \cdot 10^4$ RLU (pHA-Z₁₂U₃) angesichts der Schwankungen keine großen Differenzen auf. Dies galt auch für die Infektion der Zellen mit einer 1:5-Verdünnung der partikelhaltigen Überstände. Mit einer zunehmenden Verdünnungsstufe der Überstände konnte bei den Zellen, die mit pHA-Z₁₂U₃ kotransfiziert wurden, ein absteigender Verlauf der Luciferase-Aktivität erkannt werden. Bei der Kotransfektion mit pHA-U₁₂Z₃ war diese Tendenz nicht eindeutig zu erkennen.

Bei beiden Chimär-Konstrukten konnten Infektionen von VeroB4-Zellen gemessen werden. Die Luciferase-Aktivitäten wiesen hierbei auf eine gleichwertige Infektionseffizienz hin (Abb. 29).

Tab. 17: Luciferase-Aktivitäten der mit USUV-ZIKV-Chimären infizierten VeroB4-Zellen

Verdünnung	pHA-U ₁₂ Z ₃		pHA-Z ₁₂ U ₃	
1:5	2,37·10 ⁴	1,14·10 ⁴	2,55·10 ⁴	1,50·10 ⁴
	6,63·10 ³		1,96·10 ⁴	
	3,89·10 ³		8,00·10 ¹	
1:10	3,75·10 ⁴	1,54·10 ⁴	1,36·10 ³	1,60·10 ⁴
	7,44·10 ³		1,02·10 ⁴	
	1,21·10 ³		3,63·10 ⁴	
1:20	3,68·10 ³	1,62·10 ³	8,39·10 ³	4,33·10 ³
	1,60·10 ²		2,49·10 ³	
	1,02·10 ³		2,11·10 ³	
1:40	1,22·10 ³	7,10·10 ²	1,22·10 ³	3,16·10 ³
	3,20·10 ²		8,22·10 ³	
	5,90·10 ²		4,00·10 ¹	
1:80	6,70·10 ²	1,61·10 ³	1,18·10 ³	4,43·10 ²
	4,10·10 ³		1,10·10 ²	
	5,00·10 ¹		4,00·10 ¹	
1:160	4,40·10 ²	1,01·10 ³	4,00·10 ¹	1,37·10 ²
	1,00·10 ²		3,30·10 ²	
	2,49·10 ³		4,00·10 ¹	
1:320	2,80·10 ²	4,53·10 ²	3,00·10 ¹	3,33·10 ¹
	1,05·10 ³		4,00·10 ¹	
	3,00·10 ¹		3,00·10 ¹	
1:640	4,00·10 ¹	7,33·10 ¹	4,00·10 ¹	4,00·10 ¹
	1,30·10 ²		4,00·10 ¹	
	5,00·10 ¹		4,00·10 ¹	

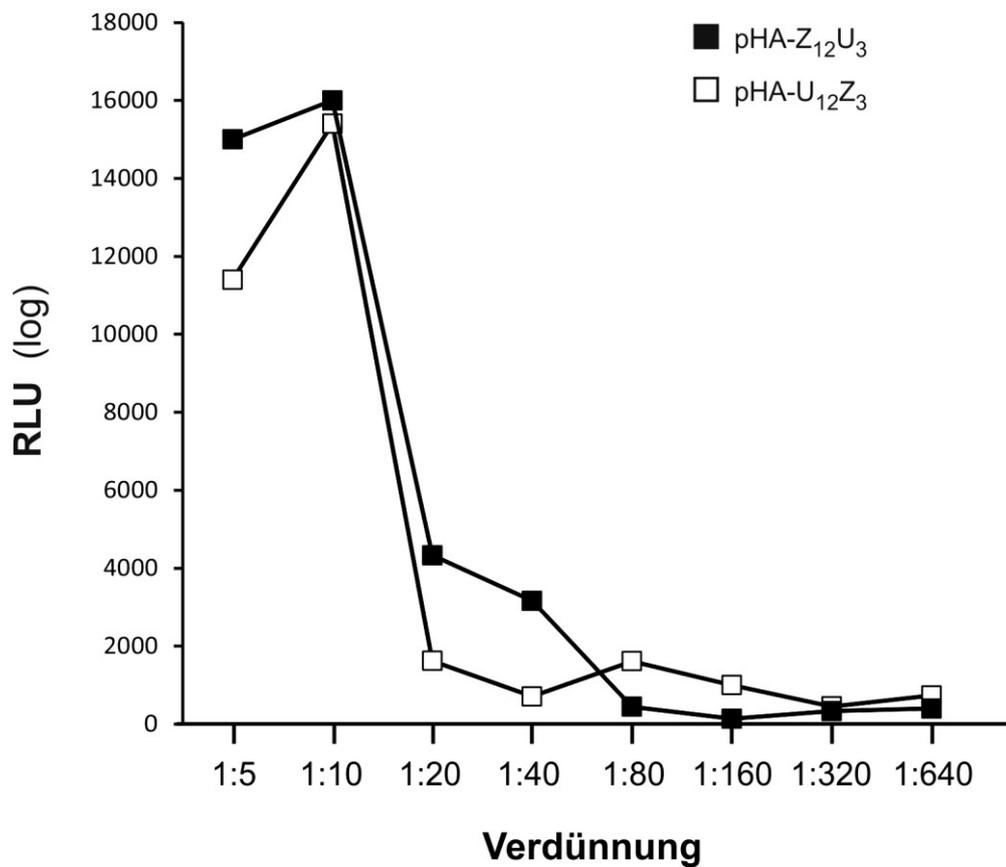


Abb. 29: Infektion mit Zika--Usutu-Pseudotypen

Vero-B4-Zellen wurden mit Verdünnungen von Zellkulturüberständen infiziert die mit den folgenden Vektoren transfiziert waren:

- pHA-Z₁₂U₃ / pNL Luc AM
- pHA-U₁₃Z₃ / pNL Luc AM

Dargestellt ist die Luciferase-Aktivität von Zelllysaten infizierter VeroB4-Zellen an Tag 3 nach Infektion.

4 Diskussion

4.1 Etablierung eines kostensenkenden Transfektionsmodells

Kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien stellen einen nicht zu vernachlässigbaren Kostenfaktor für zellbiologische Arbeiten dar. In dieser Arbeit wurde eine effektive und kostengünstige Alternative zu dem bisher verwendeten Reagenz ScreenFect® A (ScreenFect GmbH) etabliert. Polyethylenimin (PEI) ist ein Polymer, das durch die Polymerisation des Monomers Ethylenimin entsteht.⁵¹ Je nach Reaktionsbedingungen können lineare Kettenmoleküle oder aber auch stark verzweigte Polymere entstehen. Somit sind die Polymerisationsprodukte eine Mischung verschiedener Längen und Strukturen. Die allgemeine Formel ist $\text{CH}_3(\text{NHC}_2\text{H}_4)_n\text{OH}$. In wässriger Lösung ist es ein stark basisches Polykation und kann daher gut mit DNA-Molekülen komplexieren.⁵⁰ In dieser Arbeit wurde lineares PEI mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 20,000 verwendet. Die Ermittlung der optimalen Menge an PEI-Reagenz wurde durch eine Transfektion mit dem Luciferase-positiven Vektor pNL Luc AM durchgeführt. Aufgrund der exprimierten Luciferase konnte so eine Quantifizierung der Transfektionseffizienz erfolgen. Hierfür wurden HEK293T-Zellen mit DNA-PEI-Verhältnissen von 1:1 bis 1:6 versetzt und mittels Luciferase-Assay analysiert. Die Werte der Luciferase-Aktivitäten lagen für alle eingesetzten Mengen in einem Bereich von $3,20 \cdot 10^7$ RLU / 50 μl Zelllysat. Daraus konnte also geschlossen werden, dass die Menge an eingesetztem PEI-Polymer für diese Produktionscharge und die VeroB4-Zelllinie ausreichend war und nicht automatisch zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz führte. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Versuche das kleinste getestete DNA:PEI-Verhältnis von 1:1 gewählt. Allerdings sollte dieses Verhältnis für jeden Ansatz neu bestimmt werden. In weiteren Versuchen könnte man so untersuchen, ob der Einsatz von einer noch geringeren Menge PEI zu einer Abnahme der Luciferase-Aktivität in den Zellen führt. Da die bisherige kommerzielle Methode für die Transfektion durch die Methode dieser Arbeit ersetzt werden sollte, wurde ein Vergleichsexperiment der beiden Reagenzien durchgeführt. Die Versuchsdurchführung hierbei wurde zwar nach dem jeweiligen Herstellerprotokoll durchgeführt, aber um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, wurden die Transfektionen parallel durchgeführt und entsprechend ausgewertet. Bei je zwei unterschiedlich eingesetzten DNA-Mengen an pNL Luc AM (2,6 und 5,2 μg) wurden die Luciferase-Aktivitäten der lysierten HEK293T-Zellen gemessen. Da sich diese Werte alle in einem Messbereich befanden, konnte geschlussfolgert werden, dass das PEI-Reagenz eine gleichwertig gute und effiziente Transfektion wie das kommerzielle ScreenFect® A

(ScreenFect GmbH) Reagenz ermöglicht. Mit der entwickelten PEI-Methode für die Kotransfektion von HEK293T-Zellen lassen sich mit 1 mg/ml PEI-Polymer etwa 65 Transfektionsexperimente durchführen. Für 1.000 mg PEI-Polymer entstehen zurzeit Kosten von ca. 100 Euro. Wenn man die Kosten für eine Transfektion berechnet, so sind dies gerade einmal 0,0015 € pro Experiment im Gegensatz zu 3,85 € für das kommerzielle Reagenz. Wenn man bedenkt, dass zur Herstellung von Pseudotypen entsprechend viele Experimente nötig sind und Transfektionen normalerweise nicht im 6-*well*- oder 96-*well*-Format, sondern in Zellkulturflaschen auf Flächen von $> 75 \text{ cm}^2$ durchgeführt werden, gewinnt diese PEI-Polymer-Methode stark an Bedeutung.

4.2 Flavivirus pseudotypisierte HIV-1-Partikel

Die Untersuchung von neuen und/oder hochpathogenen Viren ist aufgrund des Fehlens von entsprechenden Impfstoffen und Medikamenten oft nur in Hochsicherheitslaboren der Sicherheitsstufe 3 und 4 möglich. Diese Arbeiten sind meist mit einem großen Aufwand und hohen Kosten verbunden. Vor diesem Hintergrund bieten pseudotypisierte Viruspartikel eine Alternative, da sie in Laboren der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt werden können.^{6,52}

Von außen betrachtet, sehen Pseudotypen aus wie ihre entsprechenden Virus-Wildtypen, so dass sie sich besonders für Untersuchungen des Zelleintritts eignen. Ein Vorteil solcher Pseudotypen im Gegensatz zu Virus-ähnlichen-Partikeln (VLP) ist, dass sie ein Genom tragen, in dem sich ein Reporterogen, z. B. für Luciferase, befindet. Es können aber auch andere Reporterogene, wie z. B. für β -gal oder GFP, benutzt werden. Bindet ein solches Partikel mit seinen Hüllproteinen an die Rezeptoren der Wirtszelle und fusioniert dann mit der Membran, gelangt das Genom aus den Partikeln in die Zelle. Nach dem Viruseintritt wird das Reporterogen aktiv und der Viruseintritt kann anhand der Enzymmenge, im Fall von Luciferase oder β -gal, quantitativ analysiert werden. Solche pseudotypisierten Partikel wurden schon mit diversen Hüllproteinen und Verpackungssystemen erfolgreich verwendet (siehe Literatur in Tab. 1). Außer einem System für die Herstellung von DENV-prM/E pseudotypisierten HIV-1-Partikeln wurde über andere Flaviviren noch nicht berichtet. Eine Arbeit schildert die Herstellung und Infektionsexperimente zu JEV.³ Hierbei wurde allerdings VSV als Verpackungssystem benutzt. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass gerade die JE-HIV-1-Pseudotypen keine guten Infektionstiter zeigten. Eventuell ist dies einer der Gründe, warum es keine Berichte zu JE-HIV-Pseudotypen gibt. Das gleiche könnte für YFV gelten. Sowohl

YFV als auch JEV sind beliebte Viren der Grundlagenforschung und beide zeigen schlechte Titer mit dem HIV-1 Verpackungssystem. Eine Arbeit von Hu *et al.* (2007)⁵³ beschreibt Dengue-prM/E pseudotypisierte HIV-1 Partikel. Diese Arbeit ist aber sehr kritisch zu betrachten. Übernommen wurde aus dieser Arbeit die Klonierungsstrategie für prM/E und die entsprechend veränderte Variante des Plasmids pcDNA3.1. Damit wurden erfolgreich Dengue-Hüllproteine exprimiert, wie die Arbeit von Auerswald (2016) gezeigt hat.⁵ Die Kotransfektionen mit dem Vektor pNL4-3.Luc.R-E- führten aber zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen oder zu Infektionen die klar höhere RLU-Infektionswerte als die Nullkontrollen zeigten. Mit der Beschreibung der Funktion von *nef* durch Usami *et al.* (2015)⁵⁴ änderte sich die Situation da nun der Verdacht bestand, dass der *nef*-negative Phänotyp des pNL4-3.Luc.R-E- Vektors für die schlechte Partikelproduktion verantwortlich sein könnte. Durch die Kotransfektion eines *nef*-Expressionsvektors wurde dieser Verdacht bestätigt und es wurden zum ersten Mal Infektionsraten mit den Dengue-Pseudotypen erreicht, womit ein weiteres reproduzierbares Arbeiten möglich wurde.⁵ Die mangelhaften Ausbeuten des Systems von Hu *et al.* (2007)⁵³ wurden auch in dem Übersichtsartikel von Li *et al.* (2017)¹⁷ sehr kritisch besprochen und daher in dieser Publikation nicht in die Reihe existierender Dengue-Pseudotypsysteme aufgenommen.¹⁷ Auch in der vorliegenden Arbeit hat sich die *nef*-Abhängigkeit bestätigt, da mit dem *nef*-positiven Vektor pNL Luc AM gute bis sehr gute Ergebnisse für Zika- und Usutu-Pseudotypen erzielt wurden.

Wie in dieser Arbeit beschrieben sieht es bei den Viren, die erst kürzlich in die Schlagzeilen gelangten, im Unterschied zu YFV und JEV, ganz anders aus. Usutuviren sind verantwortlich für das Sterben der Singvögel⁵⁰ und Zikaviren verursachen schwere Erkrankungen beim Menschen.^{55,56} Hier zeigten sich bei den entsprechenden Pseudotypen hohe Infektionstiter, so dass diese Pseudotypen für weitere Experimente bestens geeignet sind.

Die Darstellung von Usutu- und Zika-Pseudotypen ist ein wichtiger Ansatz für die Erforschung dieser Viren. Dafür wurde zunächst die Herstellung von Vektoren, welche die entsprechenden Hüllproteine exprimieren, durchgeführt. Insgesamt konnten zehn Klone mit den prM/E-Genfragmenten unterschiedlicher Flaviviren in dieser Arbeit hergestellt werden. Dabei entstammen vier dieser Fragmente einer selbst durchgeführten cDNA-Synthese, vier wurden zur Verfügung gestellt und weitere zwei ergaben sich als Chimäre. Dabei wurde festgestellt, dass die selbst hergestellte cDNAs der Viren USUV BH65/11-02-03, WNV NY-99, JEV Nakayama und YFV 17D in einem Sequenzvergleich mit Sequenzen der DNA-Sequenzdatenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gar

keine bis wenige Aminosäureaustausche aufwiesen. Bei den PCR-Amplifikaten der zur Verfügung gestellten cDNAs der Zikaviren konnten in einem solchen Vergleich mehrere Mutationen festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass die standardisierte cDNA-Synthese mittels randomisierten Hexamer-Oligonukleotiden nicht die beste Methode ist um Genfragmente dieser Viren zu klonieren. Besser wäre es wenn die reverse Transkription mit spezifischen Primern durchgeführt werden könnte. Dies scheitert aber meist an der nur zum Teil verfügbaren Sequenzinformation in den Genbanken.

Die Herstellung der pseudotypisierten HIV-1-Partikel erfolgte durch eine Kotransfektion der klonierten Expressionsvektoren mit einem *env*⁻-Vektor. Im Zuge einer Dissertation wurden verschiedene Reporter-Vektoren für dieses System mit Dengueviren erforscht, wobei der pNL Luc AM-Vektor sich als am geeignetsten erwies. Im Gegensatz zu dem häufig genutzten Vektor pNL4-3.Luc.R-E- exprimiert pNL Luc AM die HIV-1-akzessorischen Faktoren *nef* und R (*nef*⁺, *vpr*⁺). Außer der *env*-Deletion weist pNL Luc AM somit keine Veränderungen auf, die für die Bildung und den Lebenszyklus der HIV-1-Partikel wichtig sind. Der Eintritt, bzw. die Membranfusion, des HIV-1 wird durch zelluläre Faktoren wie Serin-C3 und Serin-C5 inhibiert. Das Kapsid mit der viralen RNA kann nicht in die Zelle gelangen. Dieser antivirale Mechanismus wird durch HIV-1 *nef* inhibiert.⁵⁴ Bei der Infektion von VeroB4-Zellen mit den HIV-1-basierenden Pseudotypen wurde ebenfalls ein *nef*-Effekt beobachtet.⁵ Daher ist es für das Flavivirus-Pseudotypsystem von Vorteil wenn *nef* exprimiert wird. Aus diesem Grund wurde der *nef*-positive und Luciferase-positive Vektor pNL Luv AM auch in dieser Arbeit verwendet.

Für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse in dieser Arbeit wurden die Transfektionsexperimente für alle Flaviviren mit denselben DNA-Mengen (2,6 µg pNL Luc AM + 12,4 µg prM/E-Expressionsvektor) durchgeführt. Aus diesen Versuchen ergaben sich für alle Flaviviren und auch die daraus resultierenden Chimäre positive Werte für die Luciferase-Aktivitäten der lysierten HEK293T-Zellen. Daraus ließ sich schließen, dass die Transfektionsexperimente erfolgreich waren und die Zellkulturüberstände für die Infektion von VeroB4-Zellen eingesetzt werden konnten.

Für die Infektionsexperimente wurden je zwei Zikastämme mit und ohne die funktionelle Erkennungssequenz für die N-Glykosylierung des E-Proteins gewählt. Dieser Glykosylierungsstelle wird ein großer Einfluss auf die Infektiosität nachgesagt.^{33-35,49,57} Die Luciferase-Aktivitäten der infizierten VeroB4-Zellen wiesen in dieser Arbeit jedoch nicht

darauf hin, dass bei den Zika-Pseudotypen ein Unterschied in der Infektionseffizienz vorlag. Zwar wies der Pseudotyp Dakar41519 die höchste Effizienz aller vier Zika-Pseudotypen auf, der zweite Stamm mit der N-Glykosylierung zeigte jedoch die geringste Effizienz. Diese Ergebnisse zeigen, dass Pseudotypen infizieren, aber dass sich die Ergebnisse, so wie sich das System zurzeit darstellt, nicht unbedingt mit Daten von Infektionen mit den echten Viren vergleichen lässt. Tatsache ist allerdings, dass die Pseudotypen sehr gut geeignet sind um virale Vektoren in Zellen einzuschleusen. Für den Gentransfer existieren jetzt also neben den bekannten Kombinationen mit VSV als Verpackungssystem⁵⁸⁻⁶¹ auch Kombinationen mit den verschiedensten Flaviviren und HIV-1.

4.3 Infektion von VeroB4-Zellen mit Usutu-Zika-Chimären

Eine Frage die sich bei den Flaviviren immer wieder stellt, ist die Bedeutung der ED3-Domäne für den Viruseintritt, die Rezeptorbindung und die Aktivierung der humoralen Immunantwort nach Infektionen. Pseudotypen können in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen. Zum einen wird die gentechnische Produktion der +RNA Viren auf die Technik der DNA-Klonierung zurückgeführt. Zum anderen wird die Messung der Infektion ab dem Eintritt des HIV-1-Kapsids abhängig von antiviralen zellulären Faktoren, wie z. B. APOBEC3G^{62,63} oder cGAS^{64,65}, da die RNA des HIV-1 Genoms durch die virale reverse Transkriptase umgeschrieben und in das Zellgenom integriert werden muss. Die Klonierung von Flavivirus-Hüllproteinen mittels cDNA gefolgt von einer PCR stellt aber einen entscheidenden Vorteil dar. Nicht nur können die Hüllproteine von Viursisolaten direkt gewonnen werden, es ist auch möglich die Gene für prM/E synthetisch herzustellen. Die Methode der *assembly*-PCR ermöglicht die Herstellung großer DNA-Fragmente von 2-4 kb in einer einzigen Reaktion. Ein ähnliches Verfahren, allerdings nur mit zwei Fragmenten wurde in dieser Arbeit für die Herstellung von prM/E-Chimären durchgeführt. An dem Beispiel wurde gezeigt, dass sich das Pseudotyp-System mit Flavivirus-prM/E auch für grundlegende Fragestellungen als praktikabel erweist. Beide Zika- und Usutu-Chimären waren infektiös und führten zu reproduzierbaren Infektionsereignissen. Das System eignet sich daher auch für weitere Untersuchungen an den E-Protein-Domänen. So hat diese Arbeit gezeigt, dass die YFV- und JEV-Pseudotypen eine schlechtere Infektionseffizienz besitzen. Man könnte nun in weiteren Experimenten die Domänen der „schlechteren“ Flaviviren gegen die „besseren“ austauschen. Auch ist es nun möglich gezielte oder randomisierte Mutationen in den Domänenbereichen durchzuführen und so Viren mit besonderen Infektionseigenschaften zu selektieren. Ob sich damit in Zukunft Flavivirus-Pseudotypen erzeugen lassen die noch höhere

Effizienzen oder einen spezielleren Tropismus besitzen, kann heute noch nicht beantwortet werden. Das System ist aber in der Lage diese Fragestellungen anzugehen.

In dieser Arbeit wurde für die Konstruktion der Chimäre das Zikavirus gewählt, das in den Infektionsexperimenten die größte Effizienz zeigte. Gleichzeitig sollte ein Stamm gewählt werden der die Erkennungssequenz für die N-Glykosylierung trug. Beide diese Eigenschaften trafen auf das prM/E-Fragment des ZIKV Dakar41519 zu, so dass dieses verwendet wurde. Für den Austausch der E-Protein-Domänen wurde das Usutuvirus BH65/11-02-03 gewählt. Dieses wies die höchsten Infektionswerte unter den getesteten vier Flavivirus Pseudotypen auf.

Nach der Infektion der VeroB4-Zellen mit den beiden Usutu--Zika-Chimären befanden sich die Werte für die Luciferase-Aktivität in einem ähnlichen Bereich, auch wenn die Infektionen im Ganzen geringer ausfielen, als die vom Zikavirus und Usutuvirus selbst. Die Infektionen mit den Chimären waren dennoch klar über den Negativkontrollen. Um jedoch in Zukunft eine Aussage über die Bedeutung der einzelnen E-Domänen treffen zu können, sollten in zukünftigen Versuchen Chimäre z. B. aus dem Zikastamm Dakar41519 und dem Japanischen-Enzephalitis-Virus Nakayama untersucht werden. Während der Infektionsexperimente in dieser Arbeit konnten beim JEV nur sehr geringe bis keine Luciferase-Werte in den infizierten Zellen gemessen werden. Würde man also Chimären der beiden Viren herstellen und Unterschiede in den Infektionseffizienzen sehen, so könnte man Rückschlüsse auf die einzelnen Domänen des E-Proteins ziehen.

Eine Frage, die sich bei den Pseudotypen stellt, ist die inwieweit Experimente mit den Pseudotypen vergleichbar sind mit Experimenten der „echten“ Viren. Für West-Nil, Japanische-Enzephalitis und Gelbfieber konnten nur sehr geringe bis keine Luciferase-Werte bei Infektionsversuchen mit den entsprechenden Pseudotypen gemessen werden. In den gleichen permissiven Zellen, Vero-B4, können die „echten“ Viren aber sehr gut replizieren. Das Pseudotypensystem für Flaviviren scheint demnach noch nicht vollständig ausgereift zu sein, als dass die Infektionen mit denen eines Wildtyp-Virus verglichen werden könnten und es müssen wahrscheinlich weiterhin Verbesserungen vorgenommen werden. Für Dengueviren wurde z. B. eine 1.000fach höhere Infektiosität bei Zugabe von Furin berichtet.⁶⁶ Wie schon in der Einleitung beschrieben werden HIV-1-Partikel an der Zellmembran gebildet, Flaviviruspartikel dagegen an der Membran des ER. Wenn nun Pseudotypen gebildet werden ist es vorstellbar, dass die Reifung des prM/E-Komplexes nicht vollständig abläuft. Die

zitierten Experimente zur Aktivierung mit der Protease Furin zeigen, dass dies eine Möglichkeit wäre auch die Infektion der Pseudotypartikel durch eine Furinbehandlung zu steigern. Es wäre aber auch vorstellbar, dass in zukünftigen Arbeiten die Furinschnittstelle so modifiziert wird, dass zellmembranständige Proteasen anstelle von Furin genutzt werden können. In zukünftigen Versuchen sollte untersucht werden, inwiefern die Zugabe der Protease eine Auswirkung auf die Infektiosität der Flavivirus pseudotypisierten HIV-1-Partikel hat. Auch eine Klonierung des Furin-Gens direkt in den Vektor wäre eine weitere denkbare Möglichkeit, sollten sich Erfolge bei der proteolytischen Behandlung von Pseudotyppartikeln zeigen.

Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die verwendeten Zelllinien einen Einfluss auf die Produktion und die Infektion haben. Auerswald (2016)⁵ berichtet von höheren Infektionsraten bei pseudotypisierten Partikeln, die in COS1-Zellen, statt in HEK293T-Zellen hergestellt wurden. In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage über die Stabilität der produzierten Pseudotypen. Es wäre denkbar, dass die hergestellten Pseudotypen nicht stabil sind und sich deswegen Schwankungen in den Infektionswerten einstellen. Trotz Verbesserungsmöglichkeiten zur Nutzung des Systems als Infektionsmodell, kann dieses aber schon heute für den Gentransfer eingesetzt werden. Besonders mit dem Expressionsvektor pHA-Z41519 war das Einbringen des Luciferase-Gens erfolgreich, was durch die hohe Luciferase-Aktivität nachgewiesen wurde. Diese Funktion kann man sich zu Nutzen machen und das Gen durch andere beliebige Gene austauschen und anschließend in die Zelle bringen. Auch kann der Vektor pNL Luc AM durch andere Vektoren ersetzt werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Infektion von VeroB4-Zellen einen *nef*-abhängigen Effekt zeigt.

5 Zusammenfassung

Für Flavivirus pseudotypisierte HIV-1-Partikel gab es bisher nur Arbeiten zu den vier Dengueviren-1-4. In dieser Arbeit wurden vier weitere Flavivirus-Pseudotypen hergestellt, welche die Hüllproteine der Flaviviren Usutu, West-Nil, Japanische-Enzephalitis und Gelbfieber tragen. Um dies zu erreichen wurde aus Überständen infizierter Zellen virale RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde der Genabschnitt für die beiden Gene prM und E amplifiziert. Nach Klonierung in einen Zwischenvektor (pCR™ 2.1) wurde die Sequenz kontrolliert und die entsprechenden Genfragmente wurden in den Expressionsvektor pHA überführt. So wurden vier Plasmide pHA-USU-BH65, pHA-WN-NY, pHA-YF-17D und pHA-JE-NAK hergestellt.

Ein neu auftretendes Virus ist das Zikavirus. Es zirkuliert in vielen Varianten. Prinzipiell existieren zwei Arten, die asiatische und die afrikanische. Von beiden Arten wurden Pseudotypen hergestellt. Dafür wurde cDNA, von einem europäischen Programm (EVAg) und vom Institut Pasteur zur Verfügung gestellt. Davon ausgehend, wurden die vier Plasmide pHA-Z41519, pHA-ArD, pHA-Z41524 und pHA-ZIKA-H/PF hergestellt. Diese Pseudotypen entsprechen den Zikaviren Dakar41519, ArD158084, Dakar41524 und H/PF/2013.

Als Vektor für die HIV-1-Partikel wurde der virale Vektor pNL Luc AM verwendet, da er sich in früheren Arbeiten als der am besten geeignetste Vektor für die Herstellung der Dengue-Pseudotypen erwiesen hatte. Nach Transfektion von HEK293T-Zellen mit Kombinationen von prM/E-Expressionsvektor und pNL Luc AM wurden die Überstände der transfizierten Zellen an Tag 3 gesammelt und für Infektionsversuche verwendet. Aus den Infektionsversuchen ergab sich folgendes Bild. Bei den vier Pseudotypen Usutu, West-Nil, Gelbfieber und Japanische-Enzephalitis wurden die höchsten Infektionstiter für Usutu beobachtet. Bei den vier Zika-Pseudotypen war der Dakar41519-Pseudotyp am effizientesten. Anhand dieser Daten wurden von beiden Viren, Dakar41519 und Usutu-BH65, chimäre Pseudotypen durch den gegenseitigen Austausch der Domäne 3 des E-Proteins hergestellt. Damit entstanden zwei weitere Plasmide pHA-U₁₂Z₃ und pHA-Z₁₂U₃. Auch hier wurden Pseudotyp-Partikel isoliert und in Infektionsexperimenten eine reproduzierbare, hohe Effizienz für die Infektion von VeroB4-Zellen gezeigt.

Insgesamt wurden zehn Flavivirus-Pseudotypen hergestellt und getestet. In der Reihenfolge West-Nil, Gelbfieber und Japanische-Enzephalitis nahmen die Infektionstiter stark ab. Die höchsten Infektionstiter wurden für die Usutu- und Zika-Pseudotypen erhalten, gefolgt von den Usutu und Zika Chimären-Pseudotypvarianten U₁₂Z₃ und Z₁₂U₃.

6 Literaturverzeichnis

1. Gross, L., Lhomme, E., Pasin, C., Richert, L. & Thiebaut, R. Ebola vaccine development: Systematic review of pre-clinical and clinical studies, and meta-analysis of determinants of antibody response variability after vaccination. *Int. J. Infect. Dis.* **74**, 83–96 (2018).
2. Ma, M. *et al.* Murine leukemia virus pseudotypes of La Crosse and Hantaan Bunyaviruses: a system for analysis of cell tropism. *Virus Res.* **64**, 23–32 (1999).
3. Tani, H. *et al.* Involvement of Ceramide in the Propagation of Japanese Encephalitis Virus. *J. Virol.* **84**, 2798–2807 (2010).
4. Kretschmer, M. Optimierung eines Infektionsmodells für Dengue-M/E pseudotypisierte HIV-1-Partikel. (2017).
5. Auerswald, H. Analyse der humoralen, neutralisierenden Immunantwort nach natürlichen Infektionen mit Dengueviren. (2016).
6. Wool-Lewis, R. J. & Bates, P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines. *J. Virol.* **72**, 3155–60 (1998).
7. Kobinger, G. P., Weiner, D. J., Yu, Q.-C. & Wilson, J. M. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat. Biotechnol.* **19**, 225–230 (2001).
8. Zhao, Y. *et al.* Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein. *Nature* **535**, 169–172 (2016).
9. Asin-Milan, O. *et al.* Performance of a clonal-based HIV-1 tropism phenotypic assay. *J. Virol. Methods* **204**, 53–61 (2014).
10. Kishishita, N., Takeda, N., Anuegoonpipat, A. & Anantapreecha, S. Development of a Pseudotyped-Lentiviral-Vector-Based Neutralization Assay for Chikungunya Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1389–1395 (2013).

11. Chan, S. Y., Speck, R. F., Ma, M. C. & Goldsmith, M. A. Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses. *J. Virol.* **74**, 4933–7 (2000).
12. Barrientos, L. G., Lasala, F., Otero, J. R., Sanchez, A. & Delgado, R. In Vitro Evaluation of Cyanovirin-N Antiviral Activity, by Use of Lentiviral Vectors Pseudotyped with Filovirus Envelope Glycoproteins. *J. Infect. Dis.* **189**, 1440–1443 (2004).
13. Klewitz, C., Klenk, H.-D. & ter Meulen, J. Amino acids from both N-terminal hydrophobic regions of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are critical for pH-dependent membrane fusion and infectivity. *J. Gen. Virol.* **88**, 2320–8 (2007).
14. Grehan, K., Ferrara, F. & Temperton, N. An optimised method for the production of MERS-CoV spike expressing viral pseudotypes. *MethodsX* **2**, 379–384 (2015).
15. Simmons, G. *et al.* Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4240–4245 (2004).
16. Ao, Z. *et al.* Characterization of a trypsin-dependent avian influenza H5N1-pseudotyped HIV vector system for high throughput screening of inhibitory molecules. *Antiviral Res.* **79**, 12–18 (2008).
17. Li, Q., Liu, Q., Huang, W., Li, X. & Wang, Y. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Rev. Med. Virol.* **28**, e1963 (2018).
18. Dick, G. W. ., Kitchen, S. . & Haddow, A. . Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **46**, 509–520 (1952).
19. Duffy, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2536–2543 (2009).
20. Lanciotti, R. S. *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1232–1239 (2008).
21. Haddow, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1477 (2012).

22. Faye, O. *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**, e2636 (2014).
23. Zanoluca, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **110**, 569–572 (2015).
24. Ye, Q. *et al.* Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infect. Genet. Evol.* **43**, 43–49 (2016).
25. Ioos, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine Mal. Infect.* **44**, 302–307 (2014).
26. Watrin, L. *et al.* Guillain–Barré Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore)*. **95**, e3257 (2016).
27. Cao-Lormeau, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* **387**, 1531–1539 (2016).
28. Mlakar, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N. Engl. J. Med.* **374**, 951–958 (2016).
29. Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *N. Engl. J. Med.* **374**, 1981–1987 (2016).
30. Martines, R. B. *et al.* Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses — Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **65**, 159–160 (2016).
31. Mansuy, J. M. *et al.* Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *Lancet Infect. Dis.* **16**, 405 (2016).
32. Frank, C. *et al.* Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Eurosurveillance* **21**, 30252 (2016).
33. Annamalai, A. S. *et al.* Zika Virus Encoding Non-Glycosylated Envelope Protein is Attenuated and Defective in Neuroinvasion. (2018). doi:10.1128/JVI.01348-17

34. Fontes-Garfias, C. R. *et al.* Functional Analysis of Glycosylation of Zika Virus Envelope Protein. *Cell Rep.* **21**, 1180–1190 (2017).
35. Mossenta, M., Marchese, S., Poggianella, M., Slon Campos, J. L. & Burrone, O. R. Role of N-glycosylation on Zika virus E protein secretion, viral assembly and infectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **492**, 579–586 (2017).
36. Baltimore, D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* **35**, 235–41 (1971).
37. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. Molecular biology of flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **59**, 23–61 (2003).
38. Zhang, Y. *et al.* Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J.* **22**, 2604–13 (2003).
39. Yu, I.-M. *et al.* Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. *Science (80-.).* **319**, 1834–1837 (2008).
40. Wang, S., He, R. & Anderson, R. PrM- and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J. Virol.* **73**, 2547–2551 (1999).
41. Watterson, D., Kobe, B. & Young, P. R. Residues in domain III of the dengue virus envelope glycoprotein involved in cell-surface glycosaminoglycan binding. *J. Gen. Virol.* **93**, 72–82 (2012).
42. Ji, G.-H. *et al.* Characterization of a Novel Dengue Serotype 4 Virus-Specific Neutralizing Epitope on the Envelope Protein Domain III. *PLoS One* **10**, e0139741 (2015).
43. Yang, M., Dent, M., Lai, H., Sun, H. & Chen, Q. Immunization of Zika virus envelope protein domain III induces specific and neutralizing immune responses against Zika virus. *Vaccine* **35**, 4287–4294 (2017).
44. Wahala, W. M. P. B., Huang, C., Butrapet, S., White, L. J. & de Silva, A. M. Recombinant dengue type 2 viruses with altered e protein domain III epitopes are efficiently neutralized by human immune sera. *J. Virol.* **86**, 4019–4023 (2012).
45. Pugach, P. *et al.* HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology* **361**, 212–228 (2007).

46. Pronobis, M. I., Deutch, N. & Peifer, M. The Miraprep: A Protocol that Uses a Miniprep Kit and Provides Maxiprep Yields. *PLoS One* **11**, e0160509 (2016).
47. Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* (2016).
doi:10.1093/molbev/msw054
48. Larkin, M. A. *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
49. Goo, L. *et al.* The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. *Virology* **515**, 191–202 (2018).
50. Boussif, O. *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7297–301 (1995).
51. Akinc, A., Thomas, M., Klibanov, A. M. & Langer, R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J. Gene Med.* **7**, 657–663 (2005).
52. Shimojima, M., Ströher, U., Ebihara, H., Feldmann, H. & Kawaoka, Y. Identification of cell surface molecules involved in dystroglycan-independent Lassa virus cell entry. *J. Virol.* **86**, 2067–78 (2012).
53. 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).
54. Usami, Y., Wu, Y. & Göttlinger, H. G. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature* **526**, 218–23 (2015).
55. Koppolu, V. & Shantha Raju, T. Zika virus outbreak: a review of neurological complications, diagnosis, and treatment options. *J. Neurovirol.* **24**, 255–272 (2018).
56. Pierson, T. C. & Diamond, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* **560**, 573–581 (2018).

-
57. Wen, D. *et al.* N-glycosylation of Viral E Protein Is the Determinant for Vector Midgut Invasion by Flaviviruses. *MBio* **9**, (2018).
 58. Bácsi, A. *et al.* Pseudotypes of vesicular stomatitis virus-bearing envelope antigens of certain HIV-1 strains permissively infect human syncytiotrophoblasts cultured in vitro: implications for in vivo infection of syncytiotrophoblasts by cell-free HIV-1. *J. Med. Virol.* **64**, 387–97 (2001).
 59. Sakata, M. *et al.* Analysis of VSV pseudotype virus infection mediated by rubella virus envelope proteins. *Sci. Rep.* **7**, 11607 (2017).
 60. Moeschler, S., Locher, S., Conzelmann, K.-K., Krämer, B. & Zimmer, G. Quantification of Lyssavirus-Neutralizing Antibodies Using Vesicular Stomatitis Virus Pseudotype Particles. *Viruses* **8**, (2016).
 61. Carnell, G. W., Ferrara, F., Grehan, K., Thompson, C. P. & Temperton, N. J. Pseudotype-based neutralization assays for influenza: a systematic analysis. *Front. Immunol.* **6**, 161 (2015).
 62. Wang, J., Shaban, N. M., Land, A. M., Brown, W. L. & Harris, R. S. Simian Immunodeficiency Virus Vif and Human APOBEC3B Interactions Resemble Those between HIV-1 Vif and Human APOBEC3G. *J. Virol.* **92**, (2018).
 63. Ikeda, T. *et al.* HIV-1 adaptation studies reveal a novel Env-mediated homeostasis mechanism for evading lethal hypermutation by APOBEC3G. *PLOS Pathog.* **14**, e1007010 (2018).
 64. Ducroux, A. & Goffinet, C. cGAS, une arme antivirale. *médecine/sciences* **33**, 732–734 (2017).
 65. Xu, S. *et al.* cGAS-Mediated Innate Immunity Spreads Intercellularly through HIV-1 Env-Induced Membrane Fusion Sites. *Cell Host Microbe* **20**, 443–457 (2016).
 66. Zybert, I. A., van der Ende-Metselaar, H., Wilschut, J. & Smit, J. M. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *J. Gen. Virol.* **89**, 3047–3051 (2008).

7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Master Thesis ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

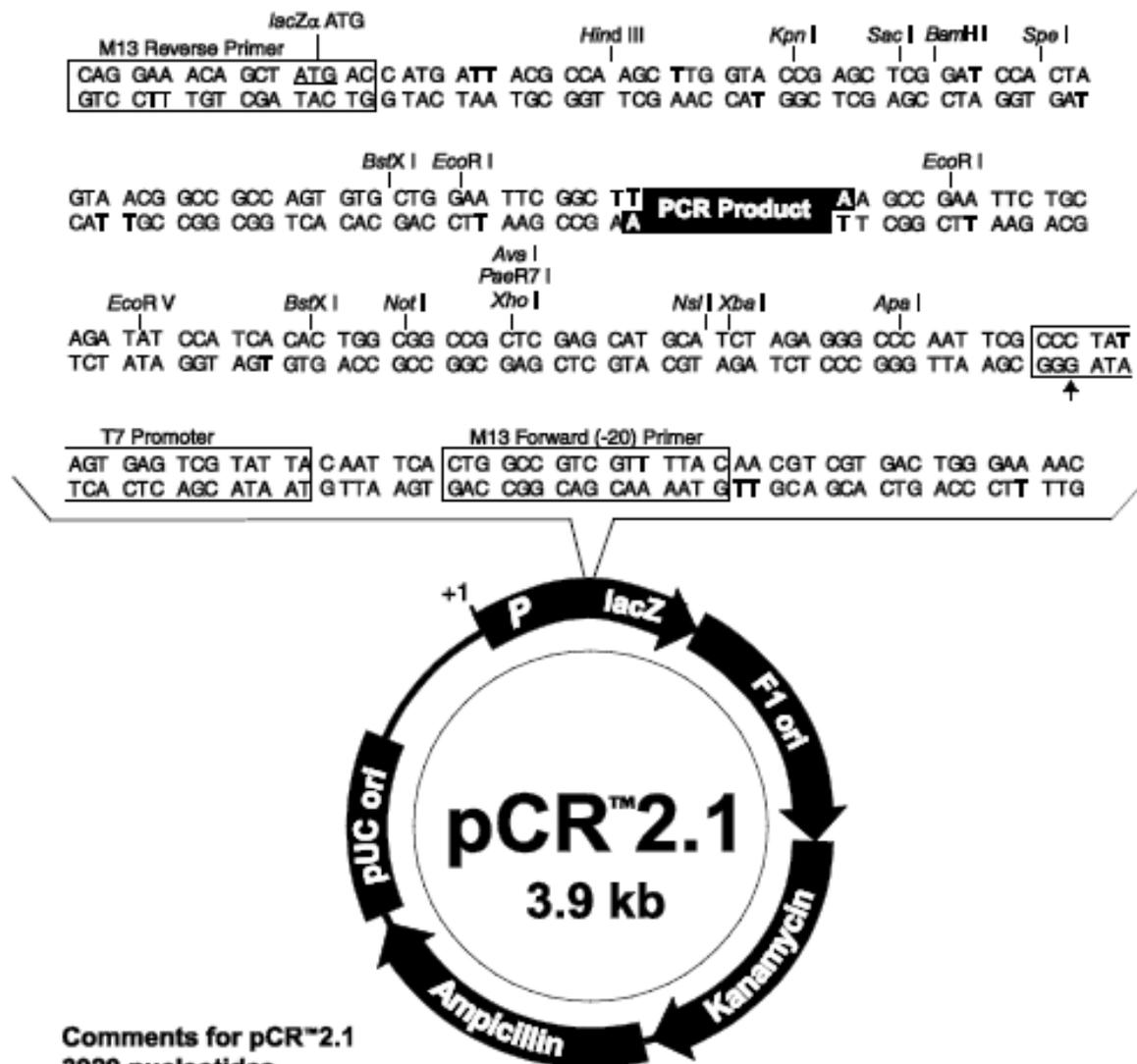
Hamburg, den 03.09.2018

Patrycja Kadlubowska

8 Anhang

8.1 Plasmidkarten

8.1.1 pCR™ 2.1



Comments for pCR™ 2.1
3929 nucleotides

- LacZα* gene: bases 1-545
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- T7 promoter: bases 362-381
- M13 (-20) Forward priming site: bases 389-404
- f1 origin: bases 546-983
- Kanamycin resistance ORF: bases 1317-2111
- Ampicillin resistance ORF: bases 2129-2989
- pUC origin: bases 3134-3807

8.1.2 pHA

Die Konstruktion des Plasmids ist beschrieben bei Auerswald (2016)⁵

```

644      GCGTGGATAG CCGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTTG ACGTCAATGG
      enhancer region (3' end)
704      GAGTTTGTPTT TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAACA ACTCCGCCCC
      CAAT                                     TATA                                     3' end of hCMV
764      ATTGACGCAA ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCTCTG
      putative transcriptional start
824      GCTAACTAGA GAACCCACTG CTTACTGGCT TATCGAAATT AATACGACTC ACTATAGGGA
      Hind III Kpn I BamH I Bst XI Eco R I
884      GACCCAAGCT TGGTACCGAG CTCGGATCCA CTAGTAACGG CCGCCAGTGT GCTGGAATTC
      Eco R V Bst XI Not I Xho I Xba I Apa I
944      TGCAGATATC CATCACACTG GCGGCCGCTC GAGCATGCAT CTAGAGGGCC CTATTCTATA
      Sp6 promoter
1004     GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC

1064     ATCTGTTGTT TGCCCTCC CCGTGCCCTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT
      BGH polyA
1124     CCTTTCCTAA TAAAATGAGG AAATTGCAT
  
```

