

# **Entwicklung von Orthoflavivirus-Replikonpartikeln für den Nachweis neutralisierender Antikörper**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Arlen-Celina Lücke**

aus Hannover

2026

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: PD Dr. Beate Mareike Kümmerer
2. Gutachterin: Prof. Dr. Stephanie Jung

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2026

Aus dem Institut für Virologie

*Für meine Großeltern.*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	7
<b>1. Einleitung</b>	10
1.1 Orthoflaviviren	10
1.1.1 Aufbau und Genomorganisation von Orthoflaviviren	10
1.1.2 Replikationszyklus	13
1.1.3 Medizinische Relevanz von Orthoflaviviren	15
1.2 Virus-Replikonpartikel	21
1.3 Ziel der Dissertation	23
<b>2. Material und Methoden</b>	24
2.1 Material	24
2.1.1 Bakterien	24
2.1.2 Viren	24
2.1.3 Zelllinien	24
2.1.4 Antikörper und Seren	24
2.1.5 Chemikalien	26
2.1.6 Medien und Zusätze	27
2.1.7 Enzyme und Marker	27
2.1.8 Kits	28
2.1.9 Puffer und Lösungen	29
2.1.10 Plasmide	30
2.1.11 Primer	32
2.1.12 Geräte und Software	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 Mikrobiologische Methoden	37
2.2.2 Zellkultur und virologische Methoden	38
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	43
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	47
2.2.5 Sequenzierung und Statistik	49

<b>3. Ergebnisse</b>	50
3.1 Generation von Orthoflavivirus-Replikonpartikeln	50
3.1.1 Herstellung des YFV-GLuc Replikons	50
3.1.2 Optimierung des YFV-GLuc Replikons	52
3.1.3 Generierung eines YFV Verpackungskonstruktes	54
3.1.4 Herstellung, Optimierung und Titerbestimmung von YFV-VRPs	55
3.1.5 Generierung und Evaluierung weiterer Orthoflavivirus-VRPs	60
3.2 Etablierung und Validierung des YFV-VRP Neutralisationstests	64
3.3 Etablierung und Validierung chimärischer DENV-VRPs in NTs	66
<b>4. Diskussion</b>	70
4.1 Etablierung und Optimierung orthoflaviviraler VRP-Systeme	70
4.2 Durchführung und Interpretation von VRP-basierten Orthoflavivirus NTs	74
4.3 Limitationen der etablierten Orthoflavivirus-VRP-basierten NTs	76
4.4 Schlussfolgerung	77
4.5 Ausblick	78
<b>5. Zusammenfassung</b>	79
<b>6. Abbildungsverzeichnis</b>	80
<b>7. Tabellenverzeichnis</b>	81
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	82
<b>9. Erklärung zum Eigenanteil</b>	93
<b>10. Veröffentlichungen</b>	94
<b>11. Danksagung</b>	95
<b>12. Lebenslauf</b>	96

## Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	Babyhamster Nierenzellen ( <i>baby hamster kidney</i> )
BSL	Biologische Sicherheitsstufe ( <i>Biosafety Level</i> )
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CHIKV	Chikungunyavirus
CIP	Alkalische Phosphatase ( <i>calf intestinal phosphatase</i> )
CMV	Cytomegalievirus
CPE	Zytopathischer Effekt ( <i>cytopathic effect</i> )
C-Protein	Capsid-Protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DENV	Dengue-Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediamine tetra acidic acid</i> )
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EP	Elektroporation
E-Protein	Envelope-Protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FFU	Fokus-bildende Einheit ( <i>focus forming unit</i> )
FMDV 2A	Maul-und-Klauenseuche-Virus Protease 2A ( <i>foot-and-mouth disease virus protease 2A</i> )
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GLuc	<i>Gaussia</i> Luciferase

gt	Ziege ( <i>goat</i> )
h	Stunde, Stunden ( <i>hour, hours</i> )
HPO	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
ICTV	Internationales Komitee für Virustaxonomie ( <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> )
IF	Immunfluoreszenz
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle ( <i>internal ribosomal entry site</i> )
JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
lat.	Lateinisch
log	Dekadischer Logarithmus (Zehnerpotenz)
m	Maus ( <i>mouse</i> )
mC	Reifes Capsid ( <i>mature capsid</i> )
MEM	Minimum Essential Medium
mL	Milliliter
MOI	Infektiöse Einheiten pro Zelle ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MTT	Thiazolylblau / 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren ( <i>non-essential amino acids</i> )
NS	Nichtstruktur
NT	Neutralisationstest
NT <sub>x</sub>	Neutralisationstiter (x% Neutralisation)
N-Terminus	Aminoterminus
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
pac	Puromycin Resistenzgen ( <i>puromycin N-acetyl-transferase</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFU	Plaque-bildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
Poly(A)	Polyadenin
prME	Vorläufer Membran- und Envelope-Protein

prM/M Protein	Vorläufer Membranprotein/Membranprotein ( <i>precursor membrane/membrane protein</i> )
PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisierungstest
Puro	Puromycin
rb	Kaninchen ( <i>rabbit</i> )
RKI	Robert Koch Institut
RLU	Relative Lichteinheit ( <i>Relative Light Unit</i> )
RLuc	<i>Renilla</i> Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )- Polyacrylamidgelelektrophorese
SEAP	Sekretierte Embryonale Alkaline Phosphatase ( <i>secreted embryonic alkaline phosphatase</i> )
SINV	Sindbis-Virus
Spp.	Spezies
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus ( <i>tick-borne encephalitis virus</i> )
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
VRP	Virus-Replikonpartikel ( <i>virus replicon particles</i> )
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation ( <i>World Health Organisation</i> )
wiss.	wissenschaftlich
WNV	West-Nil-Virus
wt	Wildtyp
YFV	Gelbfieberevirus ( <i>yellow fever virus</i> )
ZIKV	Zika-Virus

# 1. Einleitung

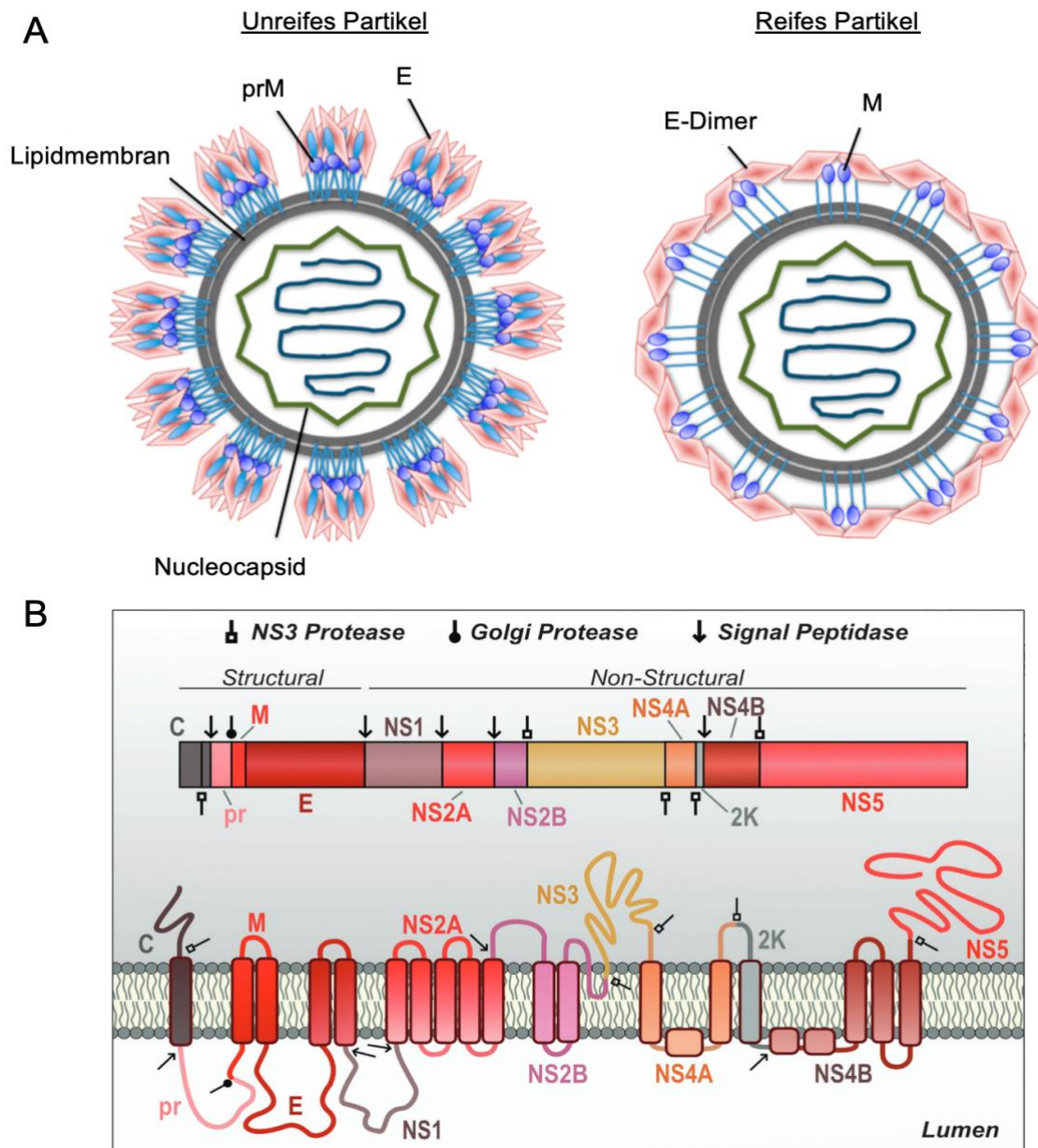
## 1.1 Orthoflaviviren

Orthoflaviviren sind eine heterogene Gruppe von RNA-Viren, die der Gattung Orthoflavivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae* angehören. Diese Virusfamilie umfasst laut dem Internationalen Komitee für Virustaxonomie (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) neben der Gattung *Orthoflavivirus* noch die drei weiteren Gattungen *Hepacivirus*, *Pegivirus* und *Pestivirus* (ICTV, 2023). Bis Anfang des Jahres 2023 waren die verschiedenen Orthoflaviviren unter der Gattung *Flavivirus* zusammengefasst. Aufgrund der Redundanz des auf das Gelbfiebervirus zurückgehenden Wortstamms „Flavi-“ (*flavus* lat. für gelb), wurde die Gattung im April 2023 offiziell durch das ICTV zugunsten des Familiennamens in *Orthoflavivirus* umbenannt (Postler et al., 2023). Viele Viren der Gattung *Orthoflavivirus* können in Menschen und anderen Tieren Krankheiten auslösen. Als wichtige humanpathogene Vertreter seien neben dem Gelbfiebervirus (*yellow fever virus*, YFV, wiss. *Orthoflavivirus flavi*) auch das Dengue-Virus (DENV, wiss. *Orthoflavivirus denguei*), das Zika-Virus (ZIKV, wiss. *Orthoflavivirus zikaense*), das Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV, wiss. *Orthoflavivirus japonicum*), das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (*tick-borne encephalitis virus*, TBEV, wiss. *Orthoflavivirus encephalitidis*) und das West-Nil-Virus (WNV, wiss. *Orthoflavivirus nilense*) genannt (Gould und Solomon, 2008). Die meisten Orthoflaviviren werden über Vektoren wie Moskitos oder Zecken auf Wirbeltiere übertragen und können entsprechend des Übertragungsweges in nicht-taxonomische Gruppen eingeteilt werden (Van Leur et al., 2021; Weissenböck et al., 2010).

### 1.1.1 Aufbau und Genomorganisation von Orthoflaviviren

Orthoflaviviren sind behüllte Viren mit einem positivsträngigen RNA-Genom. Die sphärischen Partikel haben einen Durchmesser von ca. 50 nm und sind von einer Lipidschicht umgeben, die aus der Wirtszelle stammt. In die Lipidschicht eingebettet finden sich die viralen Hüllproteine. Die Partikel treten in zwei Formen auf (Abb. 1A). Das unreife, intrazelluläre Virion trägt auf seiner Oberfläche 60 Trimerspitzen bestehend aus Heterodimeren des Vorläufer-Membranproteins (*precursor membrane*, prM) und des

Envelope-Proteins (E). Nach Spaltung von prM bildet sich das reife, extrazelluläre Partikel, dessen Oberfläche mit jeweils 90 E- und M-Homodimeren besetzt ist (Chambers et al., 1990; Zhang et al., 2020). Das von dem Nucleocapsid umgebene Plusstrang-RNA-Genom enthält einen einzigen offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF), der ein großes Polyprotein kodiert. Das Genom hat eine Größe von ca. 11 kb und ist an seinen 5'- und 3'-Enden von untranslatierten Regionen flankiert, deren Sekundärstrukturen stabilisierend wirken und die Translation sowie Replikation unterstützen (Alvarez et al., 2005; Chambers et al., 1990; Villordo und Gamarnik, 2009). Ein Poly-A-Schwanz am 3'-Ende findet sich nicht (Wengler und Wengler, 1981). In der RNA sind N-terminal die Strukturproteine C, prM und E kodiert; C-terminal folgen die Gene der Nichtstrukturproteine (NS-Proteine) NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B und NS5. Das virale Polyprotein wird während und nach der Translation durch virale und zelluläre Proteasen gespalten (Abb. 1B). Der Großteil der Spaltung im Strukturproteinbereich wird durch die Signal-Protease (Signalase) der Wirtszelle vollzogen. Die Spaltung von prM im Rahmen des Reifungsprozesses wird von der Golgi-Protease Furin vermittelt (Fishburn et al., 2022; Stadler et al., 1997). Die NS-Bereiche des Polyproteins werden vorrangig durch die NS3-Protease gespalten, während ein geringer Anteil der Spaltung auch hier durch die Signalase vollzogen wird (Fishburn et al., 2022). Einige der Spaltungsmechanismen sind jedoch bisher nicht vollständig bekannt. Die NS-Proteine können in infizierten Wirtszellen nachgewiesen werden, sind aber nicht im infektiösen Virion detektierbar (Welsch et al., 2009).

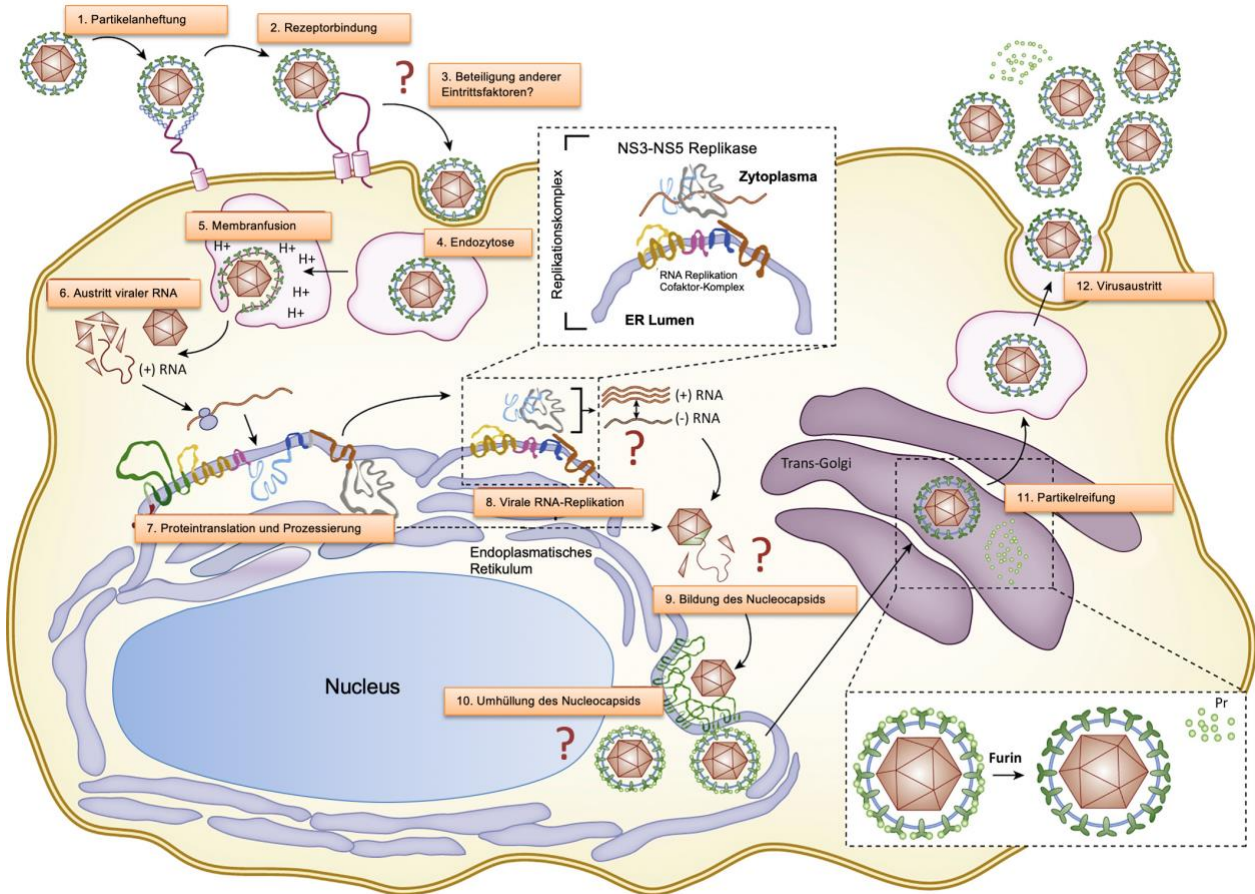


**Abb. 1:** Orthoflavivirus Partikelstruktur und Polyprotein. (A) Schematische Darstellung eines unreifen (links) und eines reifen (rechts) Orthoflavivirus Partikels. Die Oberfläche der unreifen Partikel ist besetzt mit in die Lipidmembran eingebettete Trimerspitzen, die jeweils aus prM-E-Heterodimeren bestehen. Das reife Partikel bildet sich nach Spaltung von prM und trägt auf seiner Oberfläche E- und M-Homodimere. Abbildung adaptiert aus (Zhang et al., 2020). (B) Schematische Darstellung des Orthoflavivirus Polyproteins. Das in dem ORF kodierte Polyprotein wird während und nach der Translation an der Membran von viralen und zellulären Proteasen an den angezeigten Stellen durch verschiedene Proteasen gespalten, woraus die drei Strukturproteine (C, prM, E) und sieben Nichtstrukturproteine (NS1-NS5) resultieren. Die zytosolische Seite der Membran ist in grau dargestellt, das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums in weiß. Abbildung entnommen aus (Fishburn et al., 2022).

### 1.1.2 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus von Orthoflaviviren beginnt mit dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle (s. Abb. 2). Bei Orthoflaviviren wird dieser durch die Bindung des E-Proteins an verschiedene Oberflächenfaktoren vermittelt. Dabei binden alle Orthoflaviviren an mehrere Proteine, zu denen bspw. bestimmte Rezeptortyrosinkinasen, Heat-Shock-Proteine oder Integrine zählen, weshalb sie verschiedene Zelltypen infizieren können (Chu und Ng, 2004; Das et al., 2009; Fishburn et al., 2022; Meertens et al., 2012; Reyes-Del Valle et al., 2005; Schmidt et al., 2013). Es nutzen jedoch nicht alle Virusspezies dieselben Bindungsproteine, was auf Abweichungen in ihren Proteinsequenzen des E-Proteins zurückzuführen ist und die unterschiedliche Gewebespezifität der Viren begründen könnte (Fishburn et al., 2022). Die Aufnahme des Viruspartikels in die Zelle vollzieht sich über eine Clathrin-abhängige Endozytose (Acosta et al., 2008; Van der Schaar et al., 2008) mit anschließendem endosomalen Transport. Durch die Ansäuerung des Lumens des Endosoms durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe verändert sich die Konformation der viralen E-Proteine, was zu einer Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran und Entlassung des Nucleocapsids in das Zytoplasma führt (Allison et al., 1995; Chao et al., 2014). Anschließend wird die virale RNA durch Ubiquitinierung der C-Proteine von dem Capsid befreit und durch Ribosomen des Wirts direkt als mRNA translatiert (Byk et al., 2016). Das entstehende Polyprotein wird sowohl während als auch nach der Translation durch virale und zelluläre Proteasen gespalten. Transmembranproteine werden in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) integriert. Durch die Interaktion viraler Proteine mit den Membranen und dem daraus resultierenden ER-Remodelling wird die Virusreplikation erleichtert (Fishburn et al., 2022). Die gebildeten NS-Proteine können entsprechend ihrer Größe und Struktur in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die großen Proteine NS1, NS3 und NS5 sind hochkonserviert, die kleineren Proteine NS2A, NS2B, NS4A und NS4B sind hydrophob (Chambers et al., 1990). NS3 und sein Co-Faktor NS2B sind an der Polyproteinprozessierung beteiligt, während NS5 eine RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität inne hat (Welsch et al., 2009). Sie sind Teil des sogenannten Replikationskomplexes zur viralen RNA-Replikation. Die umfassende Funktion der einzelnen NS-Proteine ist noch nicht abschließend geklärt. NS2A wird unter anderem mit der Virusassemblierung in Zusammenhang gebracht (Kümmerer und Rice, 2002), während NS4A und NS4B in virale

Prozesse wie Immun- und Membranmodulation sowie Replikation involviert sein sollen (Chambers et al., 1989; Klaitong und Smith, 2021; Muñoz-Jordán et al., 2003).



**Abb. 2.** Schematische Darstellung des Orthoflavivirus-Replikationszyklus. Das Virus heftet sich über das E-Protein an Oberflächenrezeptoren der Zelle an und wird über die Clathrin-abhängige Endozytose aufgenommen. Durch einen pH-Abfall im Endosom fusioniert die Virushülle mit der endosomalen Membran und die Virus-RNA wird ins Zytoplasma entlassen. Es folgt die Proteintranslation durch Ribosomen des Wirts im Zytoplasma und die Integration der Transmembranproteine an der Membran des ER. Co- und posttranslational wird das gebildete Polyprotein von viralen und zellulären Proteasen gespalten. Aus den viralen NS-Proteinen bildet sich der Replikationskomplex, der die virale RNA repliziert. Die Strukturproteine lagern sich zusammen, werden am ER mit der genomischen RNA beladen und die unreifen Viruspartikel in das Trans-Golgi-Netzwerk eingeschleust. Dort erfolgt die Spaltung von prM zu M durch die Protease Furin. Die reifen Partikel werden abschließend per Exozytose aus der Zelle entlassen. Prozesse, die noch nicht abschließend geklärt sind, sind mit einem Fragezeichen markiert. Abbildung adaptiert aus (Douam und Ploss, 2018).

Die über ein Minusstrang-Intermediat replizierte RNA wird im Zytoplasma von dem aus C-Proteinen assemblierten Nucleocapsid eingeschlossen und dieses anschließend über nur teilweise bekannte Mechanismen von den Mantelproteinen umhüllt (Leary und Blair, 1980). Die unreifen Virionen werden in das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert und durch Spaltung von prM zu M zu reifen Viruspartikeln prozessiert. Durch die Spaltung von prM können die E-Proteine der Virusoberfläche dimerisieren, wodurch diese geglättet wird. Die reifen Viren werden per Exozytose aus den Zellen entlassen (Van den Elsen et al., 2021; Fishburn et al., 2022).

### 1.1.3 Medizinische Relevanz von Orthoflaviviren

Viele Viren der Gattung *Orthoflavivirus* sind humanpathogen und stellen damit ein relevantes Gesundheitsrisiko für den Menschen dar. Zu den bekanntesten Vertretern zählen das Gelbfiebervirus, das Dengue-Virus, das Zika-Virus, das Japanische-Enzephalitis-Virus, das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus und das West-Nil-Virus. Unerwartete Orthoflavivirus-Ausbrüche sind in der Vergangenheit immer wieder in verschiedenen Regionen der Erde aufgetreten, darunter wiederholte Epidemien von Dengue und West-Nil-Fieber, Gelbfieber sowie die gehäuften Fälle von Zika-Virus-Infektionen in Amerika in den letzten Jahren. Es wird geschätzt, dass sich jährlich ca. 400 Millionen Menschen mit Orthoflaviviren infizieren (Pierson und Diamond, 2020). Der Großteil der Orthoflaviviren wird über Arthropoden, vorrangig Moskitos und Zecken, übertragen und daher zu den Arboviren gezählt. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten humanpathogenen Orthoflaviviren und ihre jeweiligen Reservoirs sowie Vektoren.

**Tab. 1:** Relevante humanpathogene Orthoflaviviren

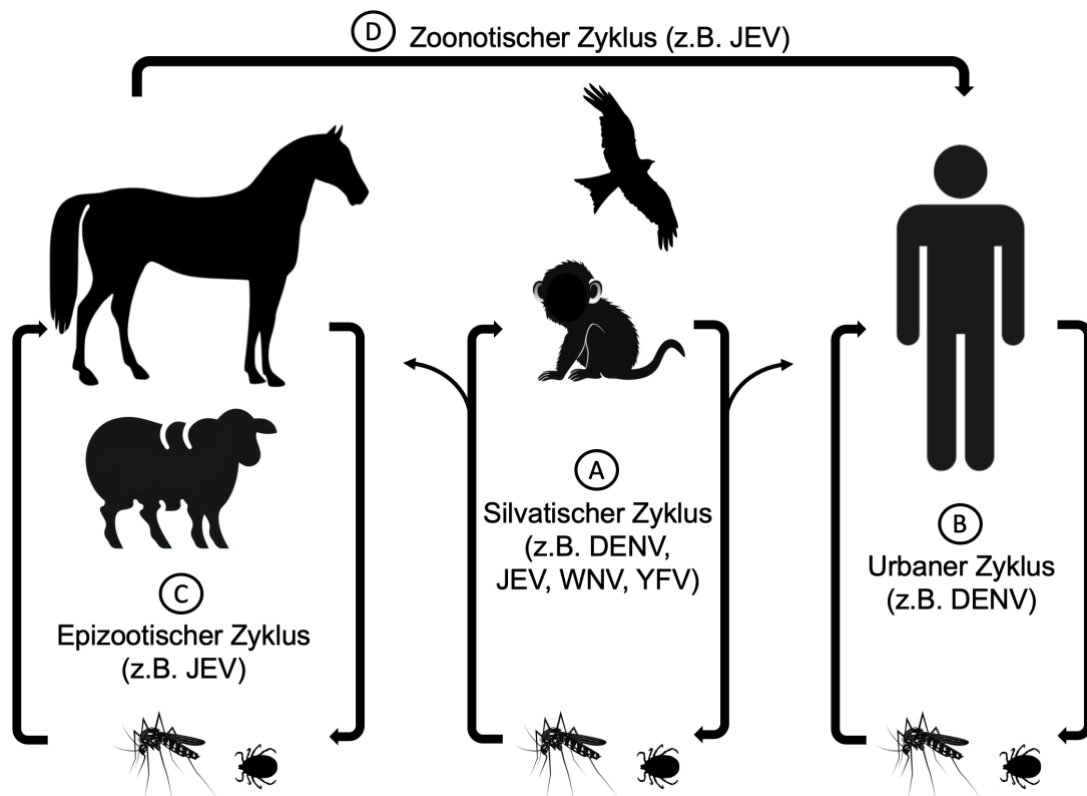
<b>Virus</b>	<b>Reservoir</b>	<b>Vektor</b>
DENV	Primaten, Moskitos	Moskitos ( <i>Aedes</i> spp.)
JEV	Schweine, Wildvögel, Moskitos seltener: Reptilien, Fledermäuse, Menschen	Moskitos ( <i>Culex</i> spp., seltener auch <i>Aedes</i> spp.)
TBEV	Nagetiere, Zecken, Menschen	Zecken ( <i>Ixodes</i> spp.)
WNV	Vögel, Moskitos seltener: Säugetiere	Moskitos ( <i>Culex</i> spp., <i>Aedes</i> spp., <i>Ochlerotatus</i> spp.)
YFV	Primaten, Moskitos	Moskitos ( <i>Aedes</i> spp.)
ZIKV	Primaten, Moskitos	Moskitos ( <i>Aedes</i> spp.)

DENV, YFV und ZIKV werden vornehmlich durch Moskitos der Gattung *Aedes* spp. übertragen und kommen daher bisher beschränkt auf tropische und subtropische Regionen vor. Das WNV wird durch viele verschiedene Moskitos, besonders die weltweit verbreitete Gattung *Culex* spp., übertragen und ist daher auch in gemäßigten Temperaturzonen aufzufinden (Pierson und Diamond, 2020). Seit 1999 sind wiederholt größere Ausbrüche in den Vereinten Staaten von Amerika sowie Europa zu verzeichnen gewesen (Bakonyi und Haussig, 2020; Nash et al., 2001; O'Leary et al., 2004). Auch für das TBEV steigen die Infektionszahlen in Europa. Als Erreger der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) wird dieses Virus über Zecken der Gattung *Ixodes* spp. übertragen und ist auch in weiten Teilen Asiens verbreitet (Riccardi et al., 2019; Yoshii et al., 2017).

Orthoflaviviren können in vier verschiedene Zyklen übertragen werden (s. Abb. 3):

1. Silvatischer Zyklus
2. Urbaner Zyklus
3. Epizootischer Zyklus
4. Zoonotischer Zyklus

Der silvatische Zyklus beschreibt die Übertragung und Konservierung der Viren in ihren natürlichen Wirten, wie nicht-menschlichen Primaten, Nagetieren, Vögeln und Moskitos in unbewohnten Gebieten wie Urwäldern. Menschen stellen eigentlich keinen Endwirt der Orthoflaviviren dar und sind somit Fehlwirte, wenn sie das Habitat der Vektoren betreten (Wanzeller et al., 2023). Kommt es dennoch zu einer Infektion von Menschen mit einer ausreichend hohen Virusamplifikation, kann es dadurch zu einem urbanen epidemischen Zyklus kommen, in dem Vektoren wie Moskitos durch die Blutmahlzeit an infizierten Menschen das Virus direkt auf einen uninfizierten Menschen übertragen. Die Zirkulation von Arboviren zwischen Moskitos und domestizierten Tieren wie Schweinen und Pferden wird als epizootischer Zyklus bezeichnet. Selten kann hieraus ein zoonotischer Zyklus entstehen, wenn sich Menschen durch den direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder Vektoren mit Arboviren anstecken (Ong et al., 2014; Sacchetto et al., 2020; Weaver und Barrett, 2004). In manchen Fällen wurde auch von Orthoflavivirus-Übertragungen durch Organspenden, Sperma, Blutprodukte, unpasteurisierte Milch oder Aerosole berichtet.



**Abb. 3:** Übertragungszyklen von Orthoflaviviren. Arboviren können durch ihre entsprechenden Vektoren über vier verschiedene Übertragungswege zwischen verschiedenen Organismen übertragen werden. (A) Silvatrischer Zyklus. Das Virus überträgt sich und verbleibt in seinen natürlichen Wirten wie nicht-menschlichen Primaten oder Vögeln. (B) Urbaner Zyklus. Infektion von immunologisch naiven Menschen in Form eines Spillovers. Aus dem Blut infizierter Menschen können die Viren über Moskitos an andere uninfizierte Menschen übertragen werden. (C) Epizootischer Zyklus. Pathogene Arboviren infizieren domestizierte Tiere und erzeugen so eine Epidemie. (D) Zoonotischer Zyklus. Menschen, die mit Orthoflaviviren infizierte Tiere versorgen, können sich durch den direkten Kontakt oder durch Vektoren, die Blutmahlzeiten von infizierten Tieren aufgenommen haben, mit den Viren infizieren. Daraus kann ein urbaner epidemischer Zyklus folgen. Abbildung erstellt nach (Ong et al., 2014).

Orthoflavivirusinfektionen verlaufen häufig mild bis asymptomatisch (Nash et al., 2001), können jedoch auch schwere und lebensbedrohliche Komplikationen wie hämorrhagisches Fieber, Sepsis, Schock, Hepatitis, Enzephalitis, kongenitale Defekte oder Organversagen mit sich bringen (Pierson und Diamond, 2020). Je nach infizierter Person und Virus können verschiedene febrile Syndrome ausgelöst werden. Eine Infektion mit neurotropischen Orthoflaviviren wie JEV, TBEV, WNV oder ZIKV können sich auf das gesamte zentrale Nervensystem ausbreiten und zu ernsthaften neurologischen Komplikationen wie Hirnhautentzündungen und Lähmungen führen (Maximova und

Pletnev, 2018). Infektionen mit Orthoflaviviren wie DENV, YFV oder ZIKV können viszerale Komplikationen wie Gelbsucht, Hämorrhagie oder Leberversagen zur Folge haben. Da die klinische Manifestation von symptomatischen Orthoflavivirusinfektionen oft ähnlich ist, sind zur definitiven Diagnose mit Identifikation des Erregers Laboruntersuchungen, wie bspw. eine Virusisolation oder Nukleinsäureamplifikation notwendig (Fernanda Estofolete et al., 2016; Yamanaka et al., 2017). Dies gestaltet sich jedoch aufgrund geringer Virustiter und nur kurzzeitiger Nachweisbarkeit viraler RNA im Wirt häufig schwierig. Eine Möglichkeit, dennoch zu einer Diagnose zu kommen, stellen daher Serumuntersuchungen wie auf neutralisierenden Antikörpern basierende Neutralisationstests (NTs) dar. Deren Sensitivität ermöglicht es ferner, anhand der Antikörpertiter zwischen einer akuten und einer in Rekonvaleszenz befindlichen Infektion zu unterscheiden (WHO, 2024a; Yamanaka et al., 2017). Klassischerweise werden diese NTs, allen voran der Plaque-Reduktions-Neutralisationstests (PRNT), der in der Arbovirusdiagnostik als Goldstandard zählt, mit infektiösen Viren durchgeführt. Diese sind allerdings gerade bei durch Reisende importierten Infektionen in den nicht-endemischen Ländern nicht immer verfügbar, was PRNTs ggf. nicht zugänglich und kostenintensiv machen kann (WHO, 2024a). Auch erfordern sie geschultes Personal in Durchführung und Interpretation und die Serumdiagnostik kann aufgrund von kreuzreaktiven Antikörpern bei Menschen mit vorhergegangener Orthoflavivirusinfektion erschwert sein (Lindsey et al., 2018).

#### 1.1.3.1 Gelbfieber

Das Gelbfiebervirus *Orthoflavivirus flavi* ist der Namensgeber der Familie der *Flaviviridae* und stellt den primär beschriebenen Erreger eines viralen hämorrhagischen Fiebers dar. Es wird vornehmlich durch Moskitos der Gattung *Aedes* spp. übertragen. Besonders hervorzuheben sei hier die Art *Aedes aegypti* (auch: *Stegomyia aegypti*), die auch als Gelbfiebermücke oder ägyptische Tigermücke bezeichnet wird (Wilkerson et al., 2015). Durch ihr bevorzugtes Vorkommen in tropischen und subtropischen Gebieten ist das Gelbfiebervirus in Südamerika und Afrika endemisch (WHO, 2024b). Die Moskitos sind tag- und dämmerungsaktiv. Obwohl sie auch in Asien vorkommen, gibt es dort keine bekannten Fälle von Gelbfieber. Der Grund dafür ist unklar. Nur bei wenigen Menschen entwickelt sich eine schwere Erkrankung aus einer YFV-Infektion. Die Inkubationszeit

beträgt 3–6 Tage. Im Folgenden können unspezifische Symptome wie hohes Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Auszehrung auftreten. Bei viszeraler Beteiligung sind im Verlauf Abdominalbeschwerden, kardiologische Symptome, Ikterus, Leber- und Nierenversagen, gastrointestinale Blutungen mit Hämatemesis und Meläna, sowie Blutaustritt aus Augen, Nase und Harnblase möglich, die zur Schocksymptomatik und letztendlich auch zum Tod führen können (Gould und Solomon, 2008). Wohlgleich seit Jahrzehnten eine effektive Impfung gegen das Gelbfiebervirus existiert, gibt es immer wieder Ausbrüche mit Beteiligung silvatischer oder urbaner Infektionszyklen (Abdullahi et al., 2021; Frierson, 2010; Moreira-Soto et al., 2018; De Oliveira Figueiredo et al., 2020; Silva et al., 2020; Uchenna Emeribe et al., 2021). Eine kausale Therapie des Gelbfiebers gibt es nicht. Den effektivsten Schutz stellen daher Präventionsmaßnahmen wie die Impfung, der Schutz vor Moskitostichen sowie die Eindämmung der Moskitopopulation dar.

#### 1.1.3.2 Denguefieber

Das Denguefieber (auch: Knochenbrecherfieber) ist eine Infektionskrankheit, die durch das Dengue-Virus *Orthoflavivirus denguei* übertragen wird. Sein einziges bekanntes Reservoir sind Primaten und Stechmücken, vornehmlich ebenfalls der Gattung *Aedes* spp. (Vasilakis und Weaver, 2008), primär *Aedes aegypti* und in geringerem Ausmaß *Aedes albopictus* (Schaefer et al., 2024; Wilkerson et al., 2015). Die ägyptische Tigermücke wird neben ihrer Bezeichnung als Gelbfiebermücke auch Dengue-Mücke genannt. Im Gegensatz zu YFV findet sich DENV neben Afrika und Amerika auch in der Pazifikregion und in Asien sowie der östlichen Mittelmeerregion, weshalb es eine große medizinische Relevanz hat und mit über 100 Millionen Infektionen sowie 20.000–25.000 Toten jährlich einen Großteil der globalen Krankheitslast ausmacht (Guo et al., 2017; Schaefer et al., 2024; Vasilakis und Weaver, 2008; WHO, 2024c). Durch den Klimawandel breiten sich die übertragenden Vektoren in immer mehr Gebiete des Planeten aus, weshalb inzwischen ca.  $\frac{2}{5}$  der Weltpopulation dem Risiko einer Infektion ausgesetzt sind (Lancet, 2013; Srean et al., 2015). Das Dengue-Virus kommt in vier verschiedenen Serotypen vor (DENV-1, DENV-2, DENV-3 und DENV-4), die wahrscheinlich unabhängig voneinander aus einem Spillover aus dem silvatischen Zyklus auf den Menschen übergingen (Vasilakis und Weaver, 2008). Wie auch das Gelbfieber verlaufen DENV-

Infektionen häufig mild oder asymptomatisch. Im Fall einer symptomatischen Erkrankung entwickeln Betroffene häufig hohes Fieber, Kopfschmerzen, Ausschläge, Übelkeit und Gliederschmerzen. Die Krankheit verläuft in der Regel selbstlimitierend und bessert sich nach 1–2 Wochen. Schwere Fälle müssen meist im Krankenhaus behandelt werden, können wie bei einer YFV-Infektion hämorrhagisch verlaufen und tödlich enden (WHO, 2024c). Auch hier existiert keine kausale Therapie; Schmerzen werden analgetisch behandelt – aufgrund des Risikos innerer Blutungen bevorzugt mit Paracetamol statt Ibuprofen oder Aspirin. Eine DENV-Infektion führt zur Bildung von Serotyp-spezifischen Antikörpern, die auch kreuzreaktive Eigenschaften haben und an die jeweils anderen Serotypen binden können (Bos et al., 2024). Diese Antikörper können im Folgenden abhängig von ihrem Titer protektiv wirken oder aber das Risiko eines schweren Verlaufes bei einer erneuten DENV-Infektion erhöhen (Katzelnick et al., 2017; Sabchareon et al., 2012). Auch spezieübergreifend sind Fälle von schweren Denguefieber-Verläufen nach einer Primärinfektion mit dem Zika-Virus berichtet worden (Katzelnick et al., 2020). Bisher existiert gegen DENV kein weltweit verfügbarer und zugelassener Impfstoff. Aktuell haben nur zwei Präparate – Dengvaxia (Sanofi) und Qdenga (TAKEDA) – in einigen Ländern eine Zulassung erhalten, die zur Impfung in Hochrisikogebieten empfohlen werden (RKI, 2025; WHO, 2024c). Auf dem deutschen Markt ist nur Qdenga seit März 2023 verfügbar. Das Robert Koch Institut (RKI) empfiehlt eine Impfung explizit nur bei Menschen ab 4 Jahren, die bereits eine diagnostisch gesicherte DENV-Infektion durchgemacht haben und einem hohen Risiko einer erneuten Ansteckung, bspw. durch Reisen in Hochendemiegebiete oder Arbeit mit infektiösen Substanzen, ausgesetzt sind (RKI, 2023, 2025).

#### 1.1.3.3 Zika

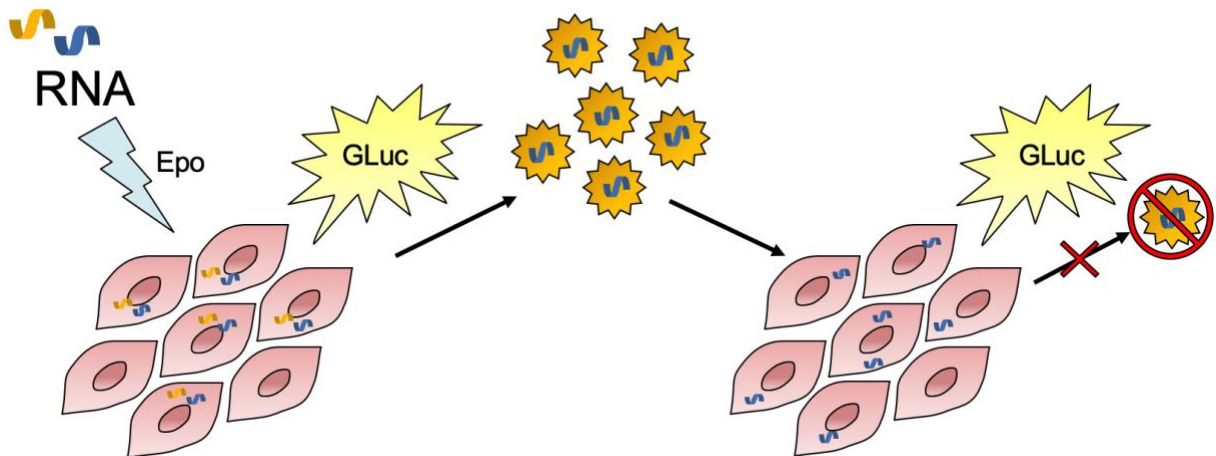
Das Zika-Virus (ZIKV) *Orthoflavivirus zikaense* wurde 1947 erstmalig entdeckt (Dick et al., 1952). Es wird wie DENV und YFV durch Stechmücken der Gattung *Aedes spp.* übertragen und führt normalerweise zu einer selbstlimitierenden Erkrankung ohne schwerere Komplikationen. Bei symptomatischer Infektion kann es zu Kopf- und Gliederschmerzen, Hautausschlägen, Fieber oder Konjunktivitis kommen, wodurch sie ähnlich zu milden Formen von Dengue oder einer Chikungunya-Infektion verläuft (Musso und Gubler, 2016; WHO, 2024d). ZIKV ist ein neurotropisches Virus und rückte in den

Jahren 2015 und 2016 aufgrund eines epidemischen Geschehens in Lateinamerika in den Fokus des öffentlichen Interesses (Carod-Artal, 2016; Gubler et al., 2017). Dort zeigte sich, dass eine ZIKV- Infektion in der Schwangerschaft zu neurologischen Fehlbildungen wie bspw. Mikrozephalie des Fötus führen kann. Während eines Ausbruches in Französisch-Polynesien kam es darüber hinaus zu einem signifikanten Anstieg an Menschen mit Guillain-Barré Syndrom (Carod-Artal, 2016; Gubler et al., 2017; Musso und Gubler, 2016). Als bisher einzig bekanntes der Orthoflaviviren ist ZIKV in der Lage, die Gewebe der menschlichen Reproduktionsorgane zu infizieren und kann daher auch über sexuellen Kontakt übertragen werden. Auch für Zika-Infektionen existieren weder Kausaltherapie noch Impfungen, weshalb die Prävention von Moskitostichen den effektivsten Schutz darstellt (WHO, 2024d).

## 1.2 Virus-Replikonpartikel

Da viele Orthoflaviviren humanpathogen sind und zum Teil schwere Erkrankungen hervorrufen können, für die es keine kausale Therapie gibt, unterliegt die Arbeit mit ihnen im Labor besonderen Sicherheitsbedingungen. In Deutschland sind bspw. DENV, WNV und YFV in der Biosicherheitsstufe 3 (*Biosafety Level 3*, BSL-3) eingestuft. Für die Serumdiagnostik im klassischen NT, der die Arbeit mit infektiösen Viren bedingt, müssen entsprechend geeignete Sicherheitslabore zur Verfügung stehen. Für die Durchführung von Orthoflavivirus-NTs in Laboren niedrigerer biologischer Schutzstufe sind daher alternative Testsysteme mit geringerem Sicherheitsrisiko sinnvoll. Dafür bietet sich die Arbeit mit Virus-Replikonpartikeln (VRPs) an. Ein Replikon ist ein auf die virale Replikationsmaschinerie reduziertes Nukleinsäurekonstrukt, dem die Anteile des viralen Genoms fehlen, die für die Strukturproteine des Virus kodieren. Dem Replikon kann ein Reportergen beigefügt werden, um die Replikation nachweisen oder verfolgen zu können, nachdem das Konstrukt z.B. per Elektroporation oder Transfektion in eine eukaryotische Zelle eingebracht wurde. Um infektiöse VRPs zu erhalten, müssen die fehlenden Strukturproteine in der gleichen Zelle wie das Replikon exprimiert werden. Die Verpackungsinformation muss daher *in trans* in der gleichen Zellen vorliegen. Das Replikon kann dann in den VRPs verpackt werden und die Partikel analog zu der viralen Exozytose (Abb. 2) aus der Zelle ausgeschleust werden. An der Oberfläche präsentieren die Partikel wie die wildtypischen Viren die Strukturproteinantigene, an die

virusspezifische Antikörper binden können. Diese Trennung der genetischen Information von Replikationsapparat und Strukturproteinen ermöglicht das Verwenden der resultierenden VRPs unter einer geringeren biologischen Schutzstufe, als es bei den entsprechenden Viren der Fall wäre. Da die genetische Information der Strukturproteine nicht von der verpackten Replikon-RNA kodiert wird, ist nur eine einmalige Infektion mit den VRPs möglich ist. Nachfolgend können aus den infizierten Zellen keine infektiösen Partikel mehr entstehen (*single round infection*, Abb. 4). Es existieren bereits verschiedene Orthoflavivirus-VRP-Systeme, wobei die Bezeichnungen je nach Arbeitsgruppe variieren, bspw. Replikon-Reporter-Partikel (RRP), single-round infektiöse Partikel (SIRPs) oder Reporter Virus Partikel (RVPs) (Li et al., 2017; Maeda und Maeda, 2013; Yamanaka et al., 2017).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung einer *single round infection* mit Virus-Replikonpartikeln (VRPs) mit Gaussia-Luciferase (GLuc) als Reporter. *In vitro* transkribierte RNA des GLuc-tragenden Replikons (blau) sowie die viralen Strukturproteine kodierende RNA (gelb), werden in einer Co-Elektroporation (Epo) in Zellen eingebracht. Bei Translation der sich replizierenden Replikon-RNA wird GLuc sekretiert und es werden VRPs gebildet, die das GLuc-Replikon enthalten. Diese VRPs können aus dem Zellüberstand der elektroporierten Zellen geerntet und zur Reinfektion frischer Zellen verwendet werden. Über die Reinfektion gelangt das Replikon, nicht aber die Verpackungsinformation in die neuen Zellen. Es kann folglich aus dem Überstand der reinfizierten Zellen eine GLuc-Aktivität gemessen werden, jedoch keine weitere VRP-Ernte erfolgen.

### 1.3 Ziel der Dissertation

Orthoflavivirusinfektionen stellen eine große Belastung für die Weltgesundheit dar, da die sie übertragenden Vektoren in vielen Regionen vertreten sind und sich durch den Klimawandel zunehmend auch in gemäßigte Zonen ausbreiten. Die Infektionen verlaufen selten schwer, können dann jedoch zu ernsthaften Erkrankungen mit lebensbedrohlichen Komplikationen führen, die nur symptomatisch behandelt werden können. Darüber hinaus existieren nur gegen wenige Vertreter dieser Virusgattung effektive und sichere Impfungen. Für die Diagnostik ist der PRNT noch immer der Goldstandard, der jedoch nicht überall gleichermaßen verfügbar und durchführbar ist. Die Arbeit mit infektiösen Viren oder Reporterviren benötigt außerdem speziell geschultes Personal und Labore, in denen das Verwenden von Pathogenen hoher biologischer Schutzstufe (BSL-3) möglich ist. Um dies zu erleichtern und die biologische Schutzstufe zu senken, stellen VRPs eine sinnvolle Alternative zur Verwendung infektiöser Viren dar. Bei ihrer Produktion werden die viralen Strukturproteingene getrennt von der Replikationsmaschinerie des Virus bereitgestellt und so die Bildung infektiöser Partikel über einen Infektionszyklus hinaus verhindert (s. Abb. 4). In der Vergangenheit wurden bereits VRPs für Orthoflaviviren beschrieben, von denen einige auch in NTs eingesetzt wurden (Khromykh et al., 1998; Li et al., 2017; Yamanaka et al., 2017). Ziel dieser Arbeit war es, ein zuverlässiges VRP-System zur Durchführung von NTs für die Analyse verschiedener, neutralisierender Orthoflavivirus-Antisera zu etablieren. Dabei sollten VRPs basierend auf YFV, allen Serotypen des DENV und ZIKV generiert und für einen möglichst einfachen Readout verschiedene Replikationsreporter getestet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterien

E. coli MC1061 Klonierungs- und Plasmidamplifikationsstamm, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Charles M. Rice (New York, USA)

#### 2.1.2 Viren

**Tab. 2:** Verwendete Virenstämme mit Herkunftsbeschreibung

Virus	Serotyp	Genotyp	Strang	Land	Quelle
DENV	1	II	16007	Thailand	Jonas Schmidt-Chanasit, (Hamburg)
	2	Asian I	16681	Thailand	
	3	V	H87	Philippinen	
	4	I	H241	Philippinen	
YFV			17-D		Charles M. Rice (New York, USA)

#### 2.1.3 Zelllinien

BHK-J Babyhamster Nierenzellen, *Mesocricetus auratus*, Fibroblasten, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Charles M. Rice (New York, USA).

C6/36 Insektenzellen, *Aedes albopictus*  
Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn.

#### 2.1.4 Antikörper und Seren

Die Antikörper wurden entsprechend ihrer Anwendung verdünnt. Durch die Abkürzungen gt, m oder rb wird jeweils das für die Immunisierung verwendete Tier (Ziege, Maus,

Kaninchen) angegeben. Die Fluorophore Alexa Fluor geben entsprechend ihres Namens die zur Anregung nötige Wellenlänge in nm an.

**Tab. 3:** Verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Nummer/Klon</b>	<b>Anwendung, Verdünnung</b>	<b>Hersteller/Quelle und Ort</b>
<b><u>Primärantikörper</u></b>			
<b>m-<math>\alpha</math>-PAN-Flavi</b>	D1-4G2-4-15	IF, 1:5.000	Merck (Darmstadt)
<b>m-<math>\alpha</math>-MAYV-E2</b>	M991	WB, 1:1.000	Biozol (Eching)
<b>rb-<math>\alpha</math>-YFE2</b>	7/28/87	WB, 1:10.000	Charles M. Rice (New York, USA)
<b>rb-<math>\alpha</math>-YFNS4B</b>		IF, 1:750	Charles M. Rice (New York, USA)
<b><u>Sekundärantikörper</u></b>			
<b>gt-<math>\alpha</math>-m HPO</b>	115-035-166	WB, 1:10.000	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
<b>gt-<math>\alpha</math>-rb HPO</b>	31460	WB, 1:10.000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<b>gt-<math>\alpha</math>-rb Alexa Fluor 488</b> <b>gt-<math>\alpha</math>-m Alexa Fluor 555</b> <b>gt-<math>\alpha</math>-rb Alexa Fluor 555</b>		IF, 1:400	Life Technologies corporation (Carlsbad, USA)

Für die YFV-NTs wurden menschliche Seren von gegen YFV geimpften Personen, sowie freundlicherweise von Danilo Espósito (Sao Paulo, Brasilien) zur Verfügung gestellte Mausseren verwendet. Der Ethikantrag für die Mausseren wurde bei der Ethikkommission (*Comitê de Ética no Uso de Animais*, CEUA) der Universität Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brasilien, gestellt (156/2012). Die Untersuchungen der humanen Seren wurden von den jeweiligen Ethikkommissionen der Ludwig-Maximilians-Universität München (86-16) und der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (049/21) bewilligt. Menschliche anti-YFV und anti-DENV Seren wurden von INSTAND e.V. (Düsseldorf) erhalten.

## 2.1.5 Chemikalien

**Tab. 4:** Auflistung verwendeter Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller und Ort</b>
Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1))	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Agarose	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
BSA	PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Carbenicillin	Sigma-Aldrich (München)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (München)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Set	Life Technologies (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck Millipore (Darmstadt)
Ethanol absolut	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Fast Green FCF	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kristallviolett	Merck Millipore (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Methanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
NAD, Biotin labeled	Biomol GmbH (Hamburg)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare (Freiburg)
Roti®-Block	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl) rauchend 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Thiazolylblau (MTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
TRIS PUFFERAN® ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Triton X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Trypanblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Turbo™ DNase	Ambion / Life Technologies (Darmstadt)
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

### 2.1.6 Medien und Zusätze

**Tab. 5:** Auflistung verwendeter Medien und Zusätze

Bezeichnung	Hersteller
FCS (Fetales Kälberserum)	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DPBS 1x (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	
LB-Medium	Nährmedienküche, Uniklinikum Bonn
Leibovitz's L-15 Medium	Gibco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
L-Glutamin	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	
MEM (Minimum Essential Medium)	
NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren)	
OptiPRO™ SFM	

### 2.1.7 Enzyme und Marker

**Tab. 6:** Enzyme und Marker

Bezeichnung	Hersteller und Ort
Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Restriktionsenzyme (+ 10x Puffer, BSA)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)
RNase A	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)
1 Kb Plus DNA Ladder	Life Technologies (Darmstadt)

## 2.1.8 Kits

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Kits entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

**Tab. 7:** Verwendete Kits mit Hersteller und Ort

<b>Name</b>	<b>Hersteller und Ort</b>
mMESSAGE mMACHINE® SP6 Transcription Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit	Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
MolTaq DNA Polymerase Kit	Molzym (Bremen)
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Renilla Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)
SuperSignal™ West Femto Chemiluminescence Substrate Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescence Substrate Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

## 2.1.9 Puffer und Lösungen

**Tab. 8:** Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fast Green-Lösung	2,5 % Fast Green FCF 10 % Essigsäure
Lämmli Ladepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 6.8 15 % Glycerin 2 % SDS 0,05 % Bromophenolblau 5 mM DTT
4x Lämmli Laufpuffer	24 g Tris 115,2 g Glycin 4 g SDS ad 1 L H <sub>2</sub> O
2x MEM	9,87 g MEM-Pulver 2,2 g NaHCO <sub>3</sub> ad 470 mL H <sub>2</sub> O 20 mL FCS 10 mL Pen/Strep
PBS-Tween (PBST)	1x PBS 0,05 % Tween® 20
50x TAE Puffer	242 g Tris 100 mL Na <sub>2</sub> EDTA (0,5 M, pH 8) 57,1 mL Essigsäure ad 1 L H <sub>2</sub> O
Transferpuffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 mL Methanol ad 1 L H <sub>2</sub> O
Trypanblau Arbeitslösung	0,5 % Trypanblau in DPBS

## 2.1.10 Plasmide

**Tab. 9:** Für diese Arbeit verwendete und klonierte Plasmide mit Beschreibung

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>pSINrep-ZIKprM/C_opt (ACL5)</b>	Codon-optimiertes ZIKV Verpackungsplasmid basierend auf BK718, SP6 Promotor, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-ZIKprM/C_wt (ACL6)</b>	ZIKV-wt Verpackungsplasmid basierend auf ACL5, SP6 Promotor, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-ZIKprM/YFC (ACL7)</b>	ZIKV-YFV Verpackungsplasmid basierend auf ACL6, SP6 Promotor, ZIKV-wt prME, YFV C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-ZIKprM/DEN2C (ACL9)</b>	ZIKV/DENV-2 Verpackungsplasmid basierend auf ACL7, SP6 Promotor, ZIKV-wt prME, DENV-2 C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>DENV-2R-SEAP (ACL11)</b>	DENV-2-SEAP Replikon basierend auf AV4, T7 Promotor, SEAP, FMDV 2A, Linearisierung über XbaI, AmpR
<b>SINrep-DEN3prM/DEN2C (ACL12)</b>	DENV-3/DENV-2 Verpackungsplasmid, SP6 Promotor, Korrektur von CF8, DENV-3 prME, DENV-2 C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-SEAP_IRES (ACL13)</b>	YFV-SEAP Replikon basierend auf BK744, Promotor, IRES, Kozak, SEAP in eigenem ORF, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-SEAP_C21 (ACL15)</b>	YFV-SEAP Replikon basierend auf BK759, SP6 Promotor, YFV C 21-Codon-Minimalsequenz, SEAP, P2A Protease, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-GLuc-C21-FMDV2A (ACL16)</b>	YFV-GLuc Replikon basierend auf BK699, SP6 Promotor, YFV C 21-Codon-Minimalsequenz, GLuc, FMDV 2A, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-GLuc-Ubi-P2A (ACL17)</b>	YFV-GLuc Replikon basierend auf BK699, SP6 Promotor, YFV C >21 AS, Ubiquitin, GLuc, P2A, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-GLuc (ACL18)</b>	YFV-GLuc Replikon basierend auf ACL16, SP6 Promotor, YFV C 21-Codon-Minimalsequenz, GLuc, P2A, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-GLuc-C21-Ubi-P2A (ACL19)</b>	YFV-GLuc Replikon basierend auf ACL18, Promotor, YFV C 21-Codon-Minimalsequenz, Ubiquitin, GLuc, P2A, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-GLuc-mC-FMDV2A (ACL20)</b>	YFV-GLuc Replikon basierend auf BK699, Promotor, YFV mC, GLuc, FMDV 2A, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>YFVR-GLuc-C21-Ubi-FMDV2A (ACL21)</b>	YFV-GLuc Replikon basierend auf ACL19, Promotor, YFV C 21-Codon-Minimalsequenz, Ubiquitin, GLuc, FMDV 2A, Linearisierung über XhoI, AmpR

<b>YFVR-GLuc-mC-P2A</b> (ACL22)	YFV-GLuc Replikon basierend auf ACL20, SP6 Promotor, YFV mC, GLuc, P2A, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-DEN1prM/YFC</b> (ACL23)	DENV-1/YFV Verpackungskonstrukt basierend auf CF7, SP6 Promotor, DENV-1 prME, YFV C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-DEN3prM/YFC</b> (ACL24)	DENV-3/YFV Verpackungskonstrukt basierend auf ACL12, SP6 Promotor, DENV-3 prME, YFV C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-DEN4prM/YFC</b> (ACL25)	DENV-4/YFV Verpackungskonstrukt basierend auf CF9, SP6 Promotor, DENV-4 prME, YFV C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>DENVR-RLuc</b> (AV4)	DENV-RLuc Replikon, T7 Promotor, RLuc, FMDV 2A, Linearisierung über XbaI, AmpR
<b>DENVR-GLuc</b> (AV8)	DENV-GLuc Replikon, T7 Promotor, GLuc, FMDV 2A, Linearisierung über XbaI, AmpR
<b>YFVR-GLuc-Ubi-FMDV2A</b> (BK699)	YFV-GLuc Replikon, SP6 Promotor, YFV-C >21 AS, Ubiquitin, GLuc, FMDV 2A, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>ZIKVR-GLuc</b> (BK713)	ZIKV-GLuc Replikon, SP6 Promotor, GLuc, FMDV 2A, Linearisierung über EagI, AmpR
<b>SINrep-YfprME/C</b> (BK718)	YFV Verpackungskonstrukt, basierend auf dem nicht pathogenen SINV Replikon, SP6 Promotor, pac, T2A, YFV prME und C aus pACNR/FLYF, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-DEN2prME/C</b> (BK745)	DENV-2 Verpackungskonstrukt, SP6 Promotor, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-DEN2prME/YFC</b> (CF4)	DENV-2/YFV Verpackungskonstrukt basierend auf BK745, SP6 Promotor, DENV-2 prME, YFV C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-DEN1prME/DEN2C</b> (CF7)	DENV-1/DENV-2 Verpackungskonstrukt, SP6 Promotor, DENV-1 prME, DENV-2 C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SINrep-DEN3prME/DEN2C</b> (CF8)	DENV-3/DENV-2 Verpackungskonstrukt, SP6 Promotor, DENV-3 prME, DENV-2 C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>SIN-DEN4prME/DEN2C</b> (CF9)	DENV-4/DENV-2 Verpackungskonstrukt, SP6 Promotor, DENV-4 prME, DENV-2 C, pac, Linearisierung über XhoI, AmpR
<b>pACNR/FLYF</b>	Infektöser cDNA-Klon des YFV Impfstammes 17D in voller Länge, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Charles M. Rice (New York, USA)
<b>pCITE-2a(+)</b>	Expressionsvektor, T7 Promotor, IRES, AmpR Novagen/Merck Millipore (Darmstadt)

## 2.1.11 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) hergestellt. Die Sequenzen sind in 5'–3'-Richtung angegeben. Entsprechend ihrer Orientierung sind die sense-Primer als fwd und die antisense-Primer als rv benannt. Unterstrichene Bereiche der Primer markieren Restriktionsschnittstellen.

**Tab. 10:** In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Primer		Sequenz
Bo88	rv	TTGGAGAGCCATGGGCACTC
Bo110	fwd	TAATACGACTCACTATAG
Bo162	fwd	GGTGTAATCCTGCATGCTCACGTGAG
Bo285	rv	TTCCAGAGGCAGTGGTTGTTCTC
Bo286	fwd	GTTATTGTCTCATGAGCGGATAC
Bo494	fwd	CGACGAGCAAGACGAAGA
Bo859	fwd	TACAGTACGCGTATTTAGGTGACACTATAGAGTTG TTGATCTGTGTGAATCAGAC
Bo906	fwd	AGGATTGTCCTCAAGGAAACGCCGTTGAGCGGCC GCCGCCCGCCCCACGACCCGCAGCGCC
Bo907	rv	GGCGCTGCGGGTCGTGGGGCGGGCGGCCGCCG CTCAACGGCGTTTCCTTGAGGACAATCCT
Bo927	fwd	TTCGAGCTCACGCGTAAATTTAATACGACTCACTA TAGAGTTGTTAG
Bo928	rv	ATTTGCTTGCAGCGAGCCCACCACTGAG
Bo929	fwd	TATCTAGAGCCACCATGAATAACCAACGGAAAAA GGCG
Bo939	fwd	ACCATACACAAATAACAGGAC
Bo975	fwd	TCT <u>CCGCGGT</u> TGGCATGGTTCTGGGGCCCTGCAT GCTG
Bo976	fwd	CGGTCCCGGTCCAAGCGTCTGGATTCTAGGAACT TTGATTTATTTAAAT
Bo977	rv	ATTTTAATAAATCAAAGTTCCTAGAATCCAGACGC TTGGACCGGGACCG
Bo984	fwd	TGTGCGTCTGGCTACCCGCGACGATGTGCCTC
Bo985	rv	GAGGCACATCGTCGCGGGTAGCCAGACGCACA
Bo986	fwd	CAGGAACCCCGTGGCTTCTTCCTC
Bo987	rv	GAGGAAGAAGCCACGGGGTTCCTG
Bo988	fwd	ATCTCCGCGGTGGCATGCTGCTGCTGCTGCTGCT GCTG
Bo993	fwd	TTGGCCTCCTGCTGACCACA
Bo994	rv	ATATTGAGTGTCTGATTGCT
Bo995	rv	ATCTGAGCTGGAACCTTGCAA



Bo1079	fwd	TTCTTATCCACAGCTGTCTCTGCTGATCAAGGATG CGCCATCAACTTT
Bo1080	rv	AAAGTTGATGGCGCATCCTTGATCAGCAGAGACA GCTGTGGATAAGAA
Bo1104	fwd	ATGAGCCGGCACCATGAATAACCAACGGAAAAAG GCGA
Bo1107	fwd	GGGTTACTCTAGGGTCGGGGCGGCC
Bo1108	rv	GGCCGCCCCGACCCTAGAGTAACCC
Bo1113	fwd	TGACGTGGTGCTtGAGCACGGTGGG
Bo1114	rv	CCCACCGTGCTCaAGCACCACGTCA
Bo1125	fwd	CCAATGCATCCGGTATTTTCCACCATATTGCCG
Bo1126	fwd	CTTTGAAAAACACGATGATAATACCCTTAAGACCA TGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGG
Bo1127	rv	CCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCATGGTCTTAA GGGTATTATCATCGTGTTTTTCAAAG
Bo1128	rv	TAAATGCATGTTAAACTTATGTCTGCTCGAAGCG GCCGGCCGC
Bo1145	fwd	AATCCATGGCTGGTCGTAAAGCTCAGGGAAAAAC
Bo1146	rv	AATGGATCCTTAAGCTGTAACCCAGGAGCGCA
Bo1147	fwd	GCGTCAATATGGTACGACGAGGAGTACGTAACAT GCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGGCC
Bo1148	rv	GGCCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCATGTTAC GTA CTCTCGTCGTACCATATTGACGC
Bo1153	fwd	AATGCGGCCGCATGTCTGGTCGTAAAGCTCAGGG
Bo1154	rv	AATCTCGAGTTAAGCTGTAACCCAGGAGCGCA
Bo1155	rv	AATTCTAGATTAAGCTGTAACCCAGGAGCGCA
Bo1158	fwd	CAATATGGTACGACGAGGAGTACGTAACATGGGA GTCAAAGTTCTGTTT
Bo1159	rv	AAACAGA ACTTTGACTCCCATGTTACGTA CTCTC GTCGTACCATATTG
Bo1160	fwd	AGATCAAGGGGGCCGGTGGTGACGGAAGCGGAG CTACTA ACTTCAGCC
Bo1161	rv	GGCTGAAGTTAGTAGCTCCGCTTCCGTCACCACC GGCCCCCTTGATCT
Bo1204	fwd	AATATGGTACGACGAGGAGTACGTATGCAGATCT TCGTGAAGACCCT
Bo1205	rv	AGGGTCTTCACGAAGATCTGCATACGTA CTCTC GTCGTACCATATT
Bo1206	fwd	TTGTCCTCAAGGAAACGCCGTATGGGAGTCAAAG TTCTGTTT
Bo1207	rv	AAACAGA ACTTTGACTCCCATACGGCGTTTCCTTG AGGACAA
Bo1210	fwd	GAAAATCCCGGGCCCGTGACCTTGGTGCGG
Bo1211	rv	CCGCACCAAGGTCACGGGCCCGGGATTTTC
Bo1324	fwd	CGATTAAAGTGTTACGGGGT

Bo1325	rv	AGCCTGGAATTTGTATTGCT
Bo1326	fwd	CTATTAAGGTCTTAAAAGGC
Bo1327	rv	AGTCTGCTTGAAATTTGTAT
Bo1328	fwd	CAAATACTGACTGGATTCA
Bo1329	rv	TTGAAATTTGTACTGTTCTG
Bo1471	fwd	TGATGAACAGTGGATCACCA
Bo1472	rv	TAGGTCCTTACTGTCCAACG
Puro_Cor_5'-fwd		GACAATATTACACCTGTCCTACTGGC
Puro_Cor_3'-rv		ACGATGCCACAGAGGTGTCCG
NgoMIV-Capsid-XhoI_fwd		CAGAATGCCGGCATGAAAAACCCAAAAAGAAAT CCGGAG
NgoMIV-Capsid-XhoI_rv		AACTACTCGAGCGGCTATCGTCTCTTCTTCTCCTT CCTAGC
Sbfl-anchorC-prM-Envelope-Mlul_fwd		CAAGACCTGCAGGAGGCGCAGATACTAGTGTCCG GAATTGTTG
Sbfl-anchorC-prM-Envelope-Mlul_rv		CATTAACGCGTCTAAGCAGAGACAGCTGTGGATA AGAAGATC
D2_Ngo-Capsid-fwd		CAGAATGCCGGCATGAATAACCAACGGAAAAAGG CGAA
D2_Capsid-XhoI-rv		AACTACTCGAGCGGCTATCTGCGTCTCCTATTCAA GATGT
D2_Sbf-AnchorC-fwd		CAAGACCTGCAGGATCTGCAGGCATGATCATTAT GCT
D2_Envelope_Mlul-rv		CATTAACGCGTCTAGGCCTGCACCATGACTCCCA AATAC
SeqPr_VRP-all_26S_fwd		TGCAGGATTACACCTGTCCTACTGG
SeqPr_VRP-all_26S_rv		CTATTTAGGACCACCGTAGAGATGC
SeqPr_VRP-all_post-Xho_rv3		TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGG
SeqPr_VRP-all_pre-Xba_fwd1		AAGAGCATTCCAAGCCATCAGAGG
SeqPr_VRP-all_T2A_rv		CATGTTAGAAGACTTCCCCTGC
SeqPr_Z_codopt_C_fwd2		GCTCTGTGGGCAAGAAGGAGG
SeqPr_Z_codopt_C_rv		AGCATGTTACGATCCGGAAGC
SeqPr_Z_codopt_E_fwd3		ACACTGGTGGACCGAGGATGG
SeqPr_Z_codopt_prM_fwd2		ACACAAAGCACCTGATCCGAGTG
SeqPr_Z_codopt_Puro_rv		CATCTGCTGCTGAGCTGCCAG
SeqPr_ZIKV_codopt_E_fwd2		AGATCCTGATCGGAACACTGC
SeqPr_ZIKV_codopt_E_rv		CTTATCCAGGTAAGCCTCTCC
SeqPr_ZIKV_codopt_E_rv2		GATCTTGGTGAATGTGAATGCTG
SeqPr_ZIKV_codopt_prM_rv		ACGATCCAGGTACATGTAGTAGG
SeqPr_ZIKV_Mlul_rv		GTTCTCAATGCCAGTAGGACAG
SeqPr_ZIKV_T2A_fwd		AGCCGAGGGCAGGGGAAG

## 2.1.12 Geräte und Software

**Tab. 11:** Geräte und Software

<b>Gerät/Software</b>	<b>Hersteller und Ort</b>
Agarose-Gelkammer	Preqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
BioTek Gen5 Microplate Reader	Agilent (Santa Clara, USA)
BioTek Synergy 2 Plattenluminometer	Agilent (Santa Clara, USA)
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager M1	Zeiss (Jena)
Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Geneious Prime®	Biomatters Ltd., Auckland (New Zealand)
Luminometer Junior LB 9509	Berthold Technologies GmbH (Bad Wildbad)
Microsoft Office	Microsoft Corporation, (Redmond, USA)
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
PCR-Thermocycler	Eppendorf (Hamburg)
Prism	GraphPad, (La Jolla, USA)
Serial Cloner	SerialBasics

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Bakterienkulturen

Bei den für Klonierungen verwendeten Bakterien handelt es sich um in der Arbeitsgruppe für die Transformation kompetent hergestellte *E. coli*-Stämme des Typs MC1061, die bei  $-80\text{ °C}$  gelagert werden. Diese werden entsprechend der Anwendung mit Plasmiden transformiert, die Antibiotika-Resistenzgene enthalten, was eine Selektion erfolgreich transformierter Bakterien durch Wachstum in antibiotikahaltigem Nährmedium ermöglicht. Für diese Arbeit wurden ausschließlich Plasmide mit einem Ampicillin-Resistenzgen verwendet. Für die Kultur der Bakterien wurde ein LB-Nährmedium verwendet. Diesem wurde zur Selektion  $50\text{ mg/mL}$  Carbenicillin, ein halbsynthetisches Betalactam-Antibiotikum, das analog zu Ampicillin in der experimentellen Forschung verwendet werden kann, hinzugefügt (LB+Carb). In Flüssigkultur wurden die Bakterien ÜN auf einem Schüttler bei ca.  $150\text{ rpm}$  und  $37\text{ °C}$  unter aeroben Bedingungen inkubiert.

Für die Kultivierung von Bakterienkolonien wurden LB-Agarplatten verwendet, denen ebenfalls  $50\text{ mg/mL}$  Carbenicillin beigelegt wurde.

#### 2.2.1.2 Transformation

Transformationskompetente Bakterien (MC1061) wurden auf Eis aufgetaut. Von den Bakterien wurden  $20\text{ }\mu\text{L}$  mit  $180\text{ }\mu\text{L}$  kaltem  $\text{CaCl}_2$  ( $0,1\text{ M}$ ) vermengt und  $100\text{ }\mu\text{L}$  des Gemischs zu einem Ligationsansatz bzw.  $100\text{--}500\text{ ng}$  DNA gegeben. Der Ansatz wurde für  $20\text{ min}$  auf Eis inkubiert, anschließend wurde ein Hitzeschock bei  $43\text{ °C}$  für  $45\text{ s}$  durchgeführt und die Bakterien erneut auf Eis gestellt. Nach Zugabe von  $200\text{ }\mu\text{L}$  LB-Medium wurde der Ansatz für  $30\text{ min}$  bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Abschließend wurde der Transformationsansatz auf einer LB+Carb-Agarplatte ausplattiert und umgedreht ÜN im Brutschrank belassen. Der Erfolg der Transformation wurde am nächsten Morgen durch Kontrolle der LB-Platten überprüft. Bei ausreichend Wachstum im Vergleich zur Kontrollplatte ohne DNA-Zugabe wurden einige Kolonien der transformierten Bakterien gepickt, in eine Flüssigkultur überführt und für eine Mini-Präparation aufbereitet. Bei einer Retransformation wurde direkt nach Ausstreichen des Transformationsansatzes eine

größere Menge LB-Medium für eine Midi-Präparation mit den Bakterien beimpft und parallel zur Agar-Platte ÜN auf dem Schüttler inkubiert.

### 2.2.1.3 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurden entsprechende Präparations-Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben angewendet. Für analytische Mini-Präparationen wurden die potentiell mit dem gewünschten Plasmid transformierten Bakterienkolonien in 5 mL LB+Carb gepickt und dann nach ÜN Kultivierung in Flüssigkultur 1,5 mL (*high-copy* Plasmide) bzw. 3 mL (*low-copy* Plasmide) der Bakteriensuspension mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit aufgearbeitet. Die gewonnene DNA wurde anschließend in einem Testverdau analysiert und ggf. sequenziert. Bei Bestätigung der erfolgreichen Klonierung wurden mit den Resten der 5 mL Mini-Flüssigkultur 80 mL (*high-copy* Plasmide) bzw. 200 mL (*low-copy* Plasmide) LB+Carb in einer Verdünnung von 1:1000 für eine Midi-Präparation beimpft und ÜN inkubiert. Die Plasmidpräparation wurde mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit durchgeführt. Die Konzentration der gewonnenen Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des NanoDrop mit H<sub>2</sub>O auf 1 µg/µL eingestellt. Die Plasmide wurden per Testverdau überprüft und falls nötig sequenziert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

## 2.2.2 Zellkultur und virologische Methoden

### 2.2.2.1 Wachstumsbedingungen von eukaryotischen Zellkulturen

BHK-J Zellen wurden in Adhäsionskultur in sterilen Schalen oder Flaschen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C in MEM ‚complete‘ (MEM zugesetzt mit 7,5 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % NEAA) gehalten. Zum Erhalt wurden die Zellen alle 2–3 Tage bei einer Konfluenz von ca. 80–90 % passagiert. Dafür wurde das alte Medium entfernt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie aus ihrer Adhäsion gelöst, indem sie mit Trypsin versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von MEM ‚complete‘ gestoppt, die Zellen mit der Pipette vereinzelt und dann durch eine entsprechende Verdünnung in gewünschtem Splitverhältnis neu ausgesät. In gleicher Weise wurden die Zellen zur Vorbereitung von Experimenten behandelt. Dabei wurde als zusätzlicher Schritt die genaue Konzentration der Zellen durch Zählen einer Probe unter Zugabe von Trypanblau im Verhältnis 1:1 in

einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der gewünschten Zelldichte für das Experiment ausgesät.

C6/36 Zellen wurden in Leibovitz's L-15 Medium zugesetzt mit 5 % FCS bei 28 °C und ohne CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Passagierung wurde das alte Medium entfernt, 5 mL frisches Medium hinzugefügt, die Zellen mit einem Zellschaber von dem Boden des Kulturgefäßes gelöst, vereinzelt und entsprechend der gewünschten Verdünnung in ein neues Gefäß überführt.

#### 2.2.2.2 Elektroporation

Die Elektroporation ermöglicht das Einschleusen von Nukleinsäuren auf physikalischem Wege in eukaryotische Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dieser Methode *in vitro* transkribierte RNA in eukaryotische BHK-J Zellen eingebracht, um Virus-Replikonpartikel herzustellen. Dafür wurden am Vortag in einer Passage von 1:2 ausgesäte BHK-J Zellen aus ihrer Adhäsion gelöst, vereinzelt und gezählt (2.2.2.1). Es folgte ein zweimaliges Waschen mit kaltem OptiPRO™ SFM Medium mit 5–10 min Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C. Die Zellen wurde abschließend mit OptiPRO™ SFM auf eine Konzentration von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/mL eingestellt und auf Eis gelagert. Für die Elektroporation wurden 50 µL der Zellsuspension ( $\approx 1 \cdot 10^6$  Zellen) mit 50 µL OptiPRO™ SFM in einem Eppendorftube vorgelegt. Von der zuvor auf Eis aufgetauten *in vitro* transkribierten RNA (2.2.3.5) wurde 2 µL ( $\approx 2$  µg) hinzugegeben und vermengt. Der Ansatz wurde in eine 2 mm Elektroporationsküvette überführt und in den Elektroporator gegeben. Die Elektroporation erfolgte nach dem voreingestellten Protokoll für BHK-21 Zellen:

1	V
25	MS
0,2	sec
2	mm
1	Puls

Anschließend wurde der Küvetteninhalt für 10 min bei RT inkubiert. Mit einer Pasteurpipette wurde der Reaktionsansatz dann in ein mit 1,25 mL MEM ‚complete‘ befülltes Eppendorftube überführt und die Zellen entsprechend der weiteren experimentellen Planung verwendet.

### 2.2.2.3 Generation stabiler Zelllinien

Zum Erhalt stabiler Zelllinien wurden BHK-J Zellen nach oben beschriebenem Protokoll (2.2.2.2) mit *in vitro* transkribierter Verpackungs-RNA mit Puromycin-Resistenzgen elektroporiert. Nach 24-stündiger Inkubation in MEM ‚complete‘ wurde dieses gegen ein mit 5 µg/mL Puromycin versetztes Medium ausgetauscht. Die so selektierten Zellen wurden anschließend in MEM ‚complete‘ + 5 µg/mL Puromycin bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C gehalten und nach normalem Schema passagiert (2.2.2.1).

### 2.2.2.4 Produktion und Konzentrationsbestimmung von Virus-Replikonpartikeln

Zur Herstellung von Virus-Replikonpartikeln (VRPs) wurden BHK-J Zellen nach dem in Abschnitt 2.2.2.2 beschriebenen Schema elektroporiert. Dabei wurde 1 µL virale Replikon-RNA mit 1 µL Verpackungskonstrukt-RNA co-elektroporiert. Die elektroporierten Zellen wurden in T25 Flaschen mit ausreichend MEM ‚complete‘ ausgesät und bei 32 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 72 h inkubiert. Die VRPs wurden aus dem Überstand der Zellen geerntet, der für 10 min bei 1.200 rpm zentrifugiert wurde, um Zellreste zu entfernen. Die so gereinigten Überstände wurden aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

Für die Konzentrationsbestimmung der in den Aliquots enthaltenen VRPs wurde ein TCID<sub>50</sub>-Assay durchgeführt. Dazu wurden die VRPs in Zehnerschritten in MEM ‚complete‘ verdünnt, wobei pro Verdünnung vier Replikate in eine 96-Well Platte gegeben wurden. Anschließend wurde zu jeder Verdünnung die gleiche Menge ( $2 \cdot 10^4$  Zellen/Well) einer BHK-J-Suspension gegeben. Als Referenz dienten ein Medium-Well ohne Zellen sowie eine Zellkontrolle ohne VRP-Zugabe (mock-Infektion). Nach einer Inkubation für 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde der Readout des in den Zellüberstand sekretierten Reporters am Plattenluminometer vollzogen (2.2.2.5). War die Luciferaseaktivität in einem Well min. zweifach über dem Wert der mock-infizierten Zellen, wurde dieses als positiv gewertet. Die TCID<sub>50</sub>-Berechnung erfolgte nach dem Spearman und Kärber Algorithmus (Hierholzer und Killington, 1996) und wurde für die Anwendung für diese Arbeit in die Einheit Fokus-bildende Einheiten (*focus forming units*) pro mL (FFU/mL) über den Faktor  $0,69 \cdot \text{TCID}_{50}$  mithilfe des TCID<sub>50</sub> Rechners der Universität Heidelberg umgerechnet (Binder, 2017).

#### 2.2.2.5 Luciferase Assay

Zur Bestimmung der GLuc-Aktivität wurde der Überstand der elektroporierten oder infizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt und entweder bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt am Luminometer vermessen. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des Renilla Luciferase Assay Systems von Promega nach Herstellerangaben.

#### 2.2.2.6 Immunfluoreszenz

Für die Analyse per Immunfluoreszenz (IF) wurde der Überstand von den zu untersuchenden Zellen entfernt und der Zellrasen nach einmaligem Waschen mit PBS in einer eiskalten Lösung aus Methanol und Aceton im Verhältnis 1:1 für 20 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert, anschließend getrocknet und in PBS rehydriert. Die Primärantikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben in PBS verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ÜN. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Abschließend erfolgte eine 5–10 min Färbung der Zellnuklei mit DAPI (1:100) sowie ein erneutes Waschen der Zellen. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter Verwendung des Zeiss Axio Imager M1.

#### 2.2.2.7 Plaqueassay

Der Plaqueassay ermöglicht die Darstellung des zytopathischen Effekts (CPE) von Viren auf einem Zellrasen. Je nach Anwendung kann darüber der Titer der infektiösen Partikel bestimmt oder der neutralisierende Einfluss eines Serums evaluiert werden. Für den Versuch wurde am Vortag die benötigte Menge an 6-Well Platten mit  $3 \cdot 10^5$  BHK-J Zellen pro Well ausgesät. Am Versuchstag wurde eine Verdünnungsreihe der Virusprobe in PBS + 1 % FCS in Zehnerschritten angesetzt und gut vermischt. Die Zellen wurden anschließend mit je 200  $\mu\text{L}$  des Inokulums versetzt und für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Anschließend wurde jedes Well mit 3 mL flüssiger 1,2 % Agarose in Wasser + 2x MEM im Verhältnis 1:1 überschichtet und für 72 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  weiter inkubiert. Am dritten Tag wurden die Platten für min. 30 min in einer 6 %igen-Formaldehydlösung fixiert, bevor die Agarose vorsichtig vom Zellrasen entfernt wurde. Die Zellen wurden für ca. 10 min mit 0,2 % Kristallviolett in 20 % Ethanol gefärbt, anschließend mit Wasser gespült und bei RT getrocknet. Abschließend wurden die geformten Plaques über einem Lichttisch manuell bestimmt.

Zur Titerbestimmung wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Gezählte Plaques pro Well} \cdot 5 \cdot 10^{\text{Verdünnungsfaktor}} = \frac{\text{PFU}}{\text{mL}}$$

In dieser Arbeit wurde der Plaqueassay ebenfalls dafür genutzt, um über Titration auf einer stabil prME/C exprimierenden Zelllinie die Bildung von Virus-Replikonpartikeln durch Zelllyse nachzuweisen.

#### 2.2.2.8 Neutralisationstest

Der Neutralisationstest (NT) ermöglicht die Evaluierung der neutralisierenden Effekte von Antikörpern auf Viruspartikel. Durch das Besetzen der Bindungsstellen der Partikel hindern diese das Eindringen in die Zellen und reduzieren damit die Replikation. Dies kann sich in einer verminderten Plaquebildung bei Beobachtung des CPE oder einer geringeren Expression eines Reportergens darstellen.

Für die VRP-NTs wurden am Tag vor dem Versuch  $2 \cdot 10^4$  BHK-J Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. Am Versuchstag wurden die VRPs auf eine MOI von 1, 3 oder 5 eingestellt und die zu untersuchenden Seren nach einer 30-minütigen Hitzeinaktivierung bei 56 °C in Zwischenschritten in MEM ‚complete‘ verdünnt, bevor sie im Verhältnis 1:1 mit den VRPs vermischt wurden. War der Ausgangstiter der VRPs zu gering, wurde das Serum direkt in den VRPs verdünnt. Die VRPs wurden für 1 h bei 37 °C mit den Seren inkubiert bevor das Inokulum auf die Zellen gegeben und mit diesen erneut für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurde. Anschließend wurde die Mischung von den Zellen entfernt, diese einmalig mit PBS gewaschen und mit MEM ‚complete‘ versetzt. Nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellüberstände für die GLuc-Analyse abgenommen. Die Neutralisationspotenz der Seren wurde anhand der prozentualen GLuc-Aktivitätsreduktion der Zellüberstände im Verhältnis zu mit VRPs ohne Antikörper-Serum versetzten Zellen evaluiert.

Zur Durchführung eines YFV Plaque-Reduktions-Neutralisationstests (PRNT) wurden die Serum-Verdünnungsreihen 1:1 mit der gleichen Menge einer YFV-Suspension in PBS + 1 % FCS mit einer PFU von 100 pro Well vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor das Inokulum für eine weitere Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf die am Vortag mit  $3 \cdot 10^5$  BHK-J Zellen pro Well ausgesäten 6-Well-Platten gegeben wurde. Anschließend wurde analog zu 2.2.2.7 verfahren. Die Neutralisationspotenz der Seren wurde anhand der prozentualen Plaquereduktion im Verhältnis zu Virus ohne Antikörper-Serum evaluiert.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Agarose Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäure-Fragmente entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Gelen aus 1 % Agarose in TAE-Puffer gearbeitet. Zur Darstellung der DNA/RNA wurde den Gelen 0,1 µl/mL einer 1 % Ethidiumbromidlösung hinzugegeben, was eine Sichtbarmachung unter UV-Beleuchtung ermöglicht. Die Elektrophorese wurde bei 140 mV für ca. 30 min durchgeführt. Die Agarosegele wurden zur Begutachtung von Nukleinsäure-Fragmenten sowie zur Auftrennung und Präparation bestimmter Sequenzabschnitte nach Restriktionsverdau, PCR-Amplifikation oder *in vitro* Transkription verwendet. Die so gewonnenen Nukleinsäuren wurden mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit entsprechend der Herstellerangaben zur weiteren Verwendung aufbereitet.

### 2.2.3.2 Restriktionsverdau von DNA

Der enzymatische Verdau von DNA an durch bestimmte Sequenzen charakterisierten Restriktionsschnittstellen wurde, wenn nicht anders vermerkt, mit Enzymen der Firma New England Biolabs GmbH entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. In analytischen Testverdauen wurden ca. 100 ng DNA pro Ansatz mit je 0,2 µl Enzym in insgesamt 10 µl für ca. 30 min bei 37°C verdaut. Präparative Verdaue wurden in 50 µl-Ansätzen mit 2 µg DNA und je 0,8 µl Enzym für 2 h oder ÜN bei 37 °C durchgeführt. Die DNA wurde anschließend per Gelelektrophorese aufgetrennt und ggf. weiterverarbeitet.

### 2.2.3.3 Ligation von DNA

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit dem Rapid DNA Ligation Kit nach folgendem Protokoll gearbeitet:

<b>Ligation</b>		<b>Vektorkontrolle</b>	
x µl	Insert		
x µl	Vektor	1 µl	Vektor
2 µl	5x Ligationspuffer	2 µl	5x Ligationspuffer
0,5 µl	T4-DNA Ligase	0,5 µl	T4-DNA Ligase
ad 10 µl	H <sub>2</sub> O	ad 10 µl	H <sub>2</sub> O

Das Verhältnis von Vektor zu Insert wurde dabei auf ca. 1:3 gesetzt. Die einzusetzenden Volumina wurden dafür mit den zuvor am NanoDrop bestimmten Konzentrationen und Fragmentgrößen der DNA berechnet. Die Ligation wurde bei RT für ca. 10–15 min inkubiert und anschließend zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet. Zur Vermeidung einer Religation des Vektorbackbones wurde die Vektor-DNA vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*, CIP) entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Dafür wurden in den letzten 15 min des Restriktionsverdaus 0,3 µl CIP zu dem Ansatz gegeben bevor der Vektor für die Ligation aufbereitet wurde.

#### 2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Hierbei wird ein durch einen forward und einen reverse Primer flankierter DNA-Abschnitt von einer Ursprungssequenz amplifiziert und in mehreren Zyklen der Denaturierung, Primer-Bindung und DNA-Synthese durch eine spezielle Polymerase *in vitro* vervielfältigt. Das Produkt der Reaktion kann anschließend über eine Gelelektrophorese analysiert, zum Sequenzieren geschickt oder für Klonierungen weiterverwendet werden. Wenn nicht anders vermerkt wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Phusion® High-Fidelity PCR-Kit gearbeitet.

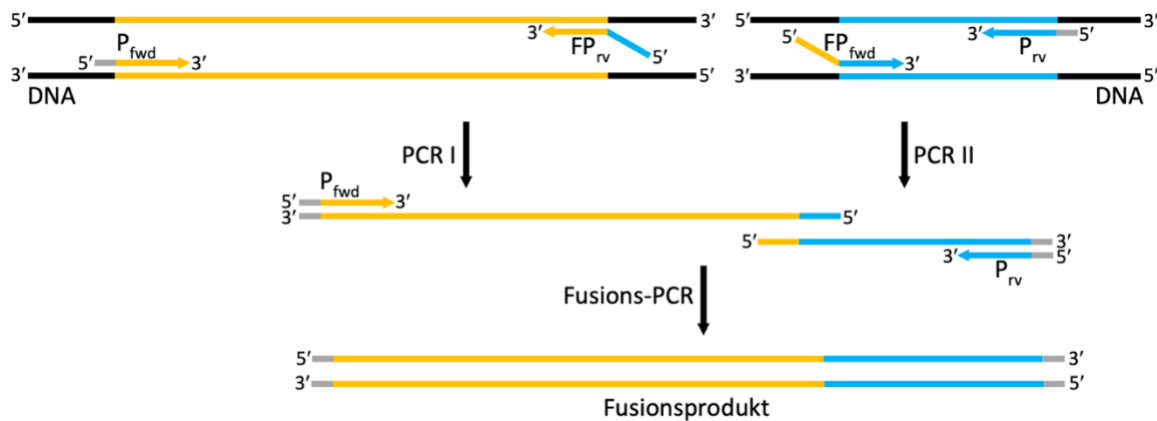
Standardprotokoll Phusion® High-Fidelity PCR mit Thermocycler Programm:

1 µl DNA ca. 50 ng	98°C	30 s	
10 µl 5x Phusion® HF Puffer	98°C	10 s	35 x
1 µl dNTPs (10 mM)	58°C	10 s	
1 µl Primer <i> fwd</i> (10 mM)	72°C	15-30 s/kb	
1 µl Primer <i> rv</i> (10 mM)	72°C	5 min	
0,5 µl Phusion® Polymerase	4°C	∞	
35,5 µl H <sub>2</sub> O			

Mithilfe des PCR-Verfahrens wurden in dieser Arbeit für Klonierungen von DNA-Konstrukten benötigte Sequenzen von Plasmiden amplifiziert, mit Restriktionsschnittstellen versehen oder ggf. mit anderen Sequenzen per Fusions-PCR kombiniert (Abb. 5). Bei einer Fusions-PCR werden in mehreren Reaktionen DNA-

Abschnitte amplifiziert und über spezielle Fusionsprimer mit überlappenden Sequenzen versehen, die anschließend eine Verbindung der so generierten Amplifikate durch eine abschließende Fusions-PCR ermöglichen. Diese Methode kann ebenfalls verwendet werden, um über eine Mutagenese-PCR Punktmutationen in eine Sequenz einzubringen oder fehlerhafte Sequenzen zu korrigieren.

Eine weitere Anwendung der PCR ist die Kolonie-PCR zur schnellen Überprüfung von



**Abb. 5.** Schematische Darstellung einer Fusions-PCR. Um zwei DNA-Abschnitte (hier gelb und blau) zu verbinden, werden über zwei separate PCRs mithilfe der Fusionsprimer ( $FP_{fwd}$  bzw.  $FP_{rv}$ ) Amplifikate mit überlappenden Sequenzen erzeugt, die dann in einer Fusions-PCR über die flankierenden Primer  $P_{fwd}$  und  $P_{rv}$  zu dem erwünschten Fusionsprodukt vervollständigt werden. Die in grau markierten Anteile von  $P_{fwd}/P_{rv}$  können Restriktionsschnittstellen enthalten, anderweitig modifiziert sein oder der Sequenz der Ausgangs-DNA entsprechen.

Klonierungen. Dafür werden potentiell positive Bakterienkolonien nach der Transformation direkt in den PCR-Ansatz aufgenommen. Im Prozess werden die Bakterien durch die Erhitzung abgetötet, lysiert und ihre DNA der PCR zugänglich. So kann durch eine Amplifikation eines bestimmten Sequenzabschnittes des erwünschten Plasmids der Erfolg der Klonierung und Transformation verifiziert werden. In dieser Arbeit wurde für die Kolonie-PCR mit der MolTaq DNA Polymerase gearbeitet.

Standardprotokoll MolTaq Kolonie-PCR mit Thermocycler Programm:

DNA (Bakterienkolonie)	94°C	2 min	
2 µl MolTaq Puffer	94°C	15 s	35 x
0,4 µl dNTPs (10 mM)	55°C	30 s	
0,4 µl Primer <i> fwd </i> (10 mM)	72°C	45 s	
0,4 µl Primer <i> rv </i> (10 mM)	72°C	5 min	
0,2 µl MolTaq Polymerase	4°C	∞	
15,6 µl H <sub>2</sub> O			

### 2.2.3.5 DNA Linearisierung und *in vitro* Transkription von RNA

Zur Umschreibung der viralen Sequenzen der generierten Konstrukte von DNA in RNA wurden die Plasmide zunächst linearisiert und gefällt. Entsprechend der Schnittstelle hinter dem 3'-Ende der viralen Sequenz wurde als Restriktionsenzym zur Linearisierung entweder *XhoI* oder *XbaI* verwendet. Im Folgenden wurde der Restriktionsansatz mit H<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt und mit 12,5 µl 2 M Kaliumacetat (pH 5,6) sowie 250 µL 100 % Ethanol versetzt. Die Präzipitation der DNA erfolgte anschließend für min. 2 h bei –80 °C bzw. ÜN bei –20 °C. Dann wurde der Ansatz für 15 min bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und 200 µL 70 % Ethanol hinzugefügt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei RT und 14.000 rpm wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet für ca. 10 min bei 37 °C getrocknet. Zuletzt wurde die DNA in 4,3 µL RNase-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert und die erfolgreiche Fällung auf einem Agarosegel überprüft (Einsatz von 0,3 µL der DNA).

Für die *in vitro* Transkription wurde entsprechend des Promotors das mMACHINE® SP6 bzw. T7 Kit nach Herstellerangaben verwendet:

- 2 µL Gefällte DNA
- 1 µL 10x Reaktionspuffer
- 1 µL 20 mM (SP6) bzw. 30 mM (T7) GTPs
- 5 µL 2x NTP/CAP
- 1 µL Enzym-Mix (SP6/T7)

Die erfolgreiche Transkription der RNA wurde durch Auftragen von 0,2 µL des Ansatzes auf ein Agarosegel überprüft. Die RNA wurde bei –80 °C gelagert.

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 SDS-Page

Die Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*) Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zum Auftrennen von denaturierten Proteinproben nach ihrer molekularen Masse entlang eines elektrischen Gradienten. In dieser Arbeit wurden dafür selbst hergestellte 10 %ige Trenngelle mit 4 %igen Sammelgelen verwendet.

Für je 5 mL Gelansatz:

10 % Trenngel	4 % Sammelgel	
2,4 mL	3,15 mL	H <sub>2</sub> O
1,25 mL	0,5 mL	Acrylamid (40 %; 37,5:1)
1,25 mL	/	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
/	1,25 mL	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
50 µL	50 µL	SDS (10 %)
50 µL	50 µL	APS (10 %)
2 µL	5 µL	TEMED

Die zu untersuchenden Zellproben wurden nach einmaligem Waschen mit PBS direkt mit einer der Fläche angemessenen Menge Lämmli Ladepuffer (s. 2.1.9) lysiert und durch eine 27 Gauge Kanüle geschert. Anschließend folgte eine Hitzedenaturierung bei 95 °C für 10 min. Die Proben wurden dann in die Taschen der in die mit Lämmli Laufpuffer (s. 2.1.9) gefüllten Elektrophoresekammer eingespannten Gele überführt (ca. 10 µL Probe pro Tasche). Als Größenreferenz wurden 8 µL eines Proteinmarkers mitaufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zum Sammeln der Proben für ca. 10 min bei 100 V und anschließend für die Auftrennung für ca. 55 min bei 120 V.

### 2.2.4.2 Western Blot und Immundetektion

Die über die SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben (2.2.4.1) wurden zur weiteren Analyse per Western Blot (WB) auf eine Nitrocellulose bzw. PVDF Membran übertragen. Dafür wurde das SDS-Gel in Sandwich-Anordnung auf der auf zwei mit Transferpuffer

(s. 2.1.9) getränkten Whatman-Papieren befindlichen Membran positioniert und mit Transferpuffer blasenfrei ausgerollt. Anschließend wurden zwei weitere puffergetränkte Whatman-Papiere obenauf gelegt. Das Aufeinanderschichten erfolgte auf der Anodenplatte der Blotkammer und wurde durch den Verschluss mit der Kathodenplatte abgeschlossen. Durch die ledigliche Tränkung der Materialien in Transferpuffer wird dieses Verfahren auch als halbtrocken (engl. *semidry*) bezeichnet. Der Proteintransfer erfolgte bei 25 V und 150 mA für 1 h. Anschließend wurde die erfolgreiche Übertragung durch eine kurze unspezifische Färbung der Proteine mit Fast Green bestätigt, bevor die Membran wieder in 10 % Essigsäure entfärbt wurde. Nach einer Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen in einer 10 %igen Roti®-Block Lösung folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper verdünnt in PBST (s. 2.1.9), jeweils entweder für 1 h bei RT oder ÜN bei 4 °C. Die Membran wurde anschließend mehrfach mit PBST gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HPO)-gekoppelten Sekundärantikörper, verdünnt 1:10.000 in PBST, versehen. Die Detektion der Antikörper-gebundenen Proteine erfolgte mithilfe des SuperSignal™ West Pico oder Femto Chemiluminescence Substrate Kit nach Herstellerangaben.

### 2.2.5 Sequenzierung und Statistik

Die Sequenzierungen von DNA-Abschnitten wurden durch Eurofins Scientific (Luxemburg Stadt, Luxemburg) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mit den Softwares SerialCloner und Geneious Prime® analysiert.

Für die statistischen Analysen, die Korrelationsanalyse nach Spearman, die nicht-lineare Regressionsanalyse zur Bestimmung der NT<sub>50</sub>-Titer und graphischen Darstellungen von Daten in dieser Arbeit wurde mit Microsoft Excel bzw. mit Graphpad Prism gearbeitet.

### 3. Ergebnisse

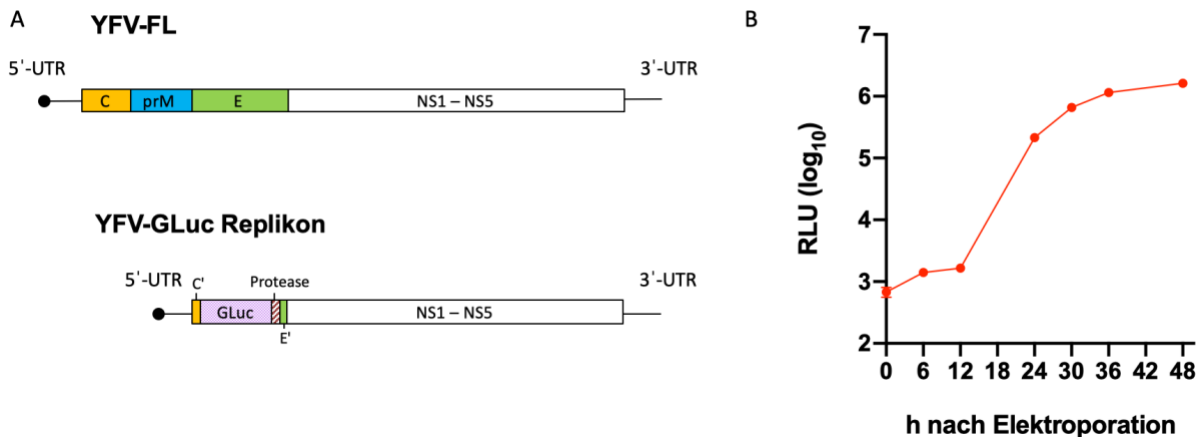
#### 3.1 Generation von Orthoflavivirus-Replikonpartikeln

Um funktionelle Orthoflavivirus-Replikonpartikel (VRPs) herstellen zu können, waren sowohl stabile Replikons als auch Verpackungskonstrukte vonnöten, die Strukturproteine *in trans* exprimieren können (s. Abb. 4). Zur Herstellung von VRPs, deren Replikation quantitativ verfolgt werden kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze zur Generation von Reporter-gen-enthaltenden Orthoflavivirus Replikons verfolgt. Am vielversprechendsten zeigte sich dabei die Verwendung von in den Zellüberstand sekretierter humanisierter Gaussia Luciferase (GLuc) als Replikationsreporter (Tannous et al., 2005). Deren Aktivität wurde als bis zu 1000-fach höher im Vergleich zu humanisierter Renilla Luciferase (RLuc) oder Firefly Luciferase beschrieben, weshalb nachfolgend primär damit gearbeitet wurde. Der Ansatz, eine Sekretierte Embryonale Alkaline Phosphatase (SEAP) als Reporter zu verwenden, zeigte sich im Read-out als nicht zuverlässig und wurde daher nicht weiterverfolgt (Daten nicht gezeigt). Angestrebt wurde, verschiedene Orthoflavivirus Replikon-basierte VRPs zu erhalten, die in Neutralisationstests (NTs) verwendet werden können. Der Fokus lag dabei auf dem Gelbfiebervirus (YFV), dem Dengue-Virus (DENV) und dem Zika-Virus (ZIKV). Beispielhaft wird im nächsten Abschnitt die Generierung des YFV-GLuc-Replikons beschrieben, da im Verlauf der Arbeit primär damit gearbeitet wurde. Grundversionen der GLuc Replikons waren zur Aufnahme dieser Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden und wurden ggf. verändert und optimiert.

##### 3.1.1 Herstellung des YFV-GLuc Replikons

Zur Generation des YFV-GLuc Replikons wurde der Großteil der die Strukturproteine kodierenden Region des vollständigen YFV Genoms (YFV-*full length*, YFV-FL) durch die humanisierte GLuc Genkassette ersetzt. Um dennoch eine regelrechte Proteinexpression im und am Endoplasmatischen Retikulum zu gewährleisten (Hahn et al., 1987; Jones et al., 2005), mussten verkürzte Anteile der das Capsid- sowie Envelope-Protein kodierenden Sequenzen beibehalten werden (C', E'). Zusätzlich wurde ein Autoprotease-Gen am 3'-Terminus der GLuc-Kassette eingefügt, um das Polyprotein nach der Expression von dem Reporter abzuspalten. In Abb. 6A ist das vollständige YFV Genom

schematisch dem GLuc Replikon gegenübergestellt. Die korrekte Funktion des Replikons wurde durch *in vitro* Transkription des klonierten und sequenzkontrollierten DNA-Konstruktes mittels SP6-Polymerase, anschließender Elektroporation (EP) der RNA in BHK-J Zellen und Vermessung der Aktivitätszunahme der in die Zellüberstände sekretierten GLuc über die Zeit validiert (Abb. 6B).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des YFV-GLuc Replikons und Funktionsüberprüfung. (A) Gegenüberstellung des vollständigen YFV Genoms (YFV-FL, oben) und des YFV-GLuc Replikons (unten). Die translatierten Abschnitte werden als Kästen dargestellt, YFV-FL Strukturproteingene: C (gelb), prM (blau), E (grün); Nichtstrukturproteingene: NS1–NS5 (weiß). Im YFV-GLuc Replikon befinden sich die verkürzten Strukturproteinsequenzen C' (gelb) und E' (grün). Die strukturierten Kästen symbolisieren das Gaussia Luciferase Gen (lila-kariert, GLuc) sowie die Autoprotease (rot-gestreift, Protease). Untranslatierte Regionen werden durch Linien dargestellt (5'/3'-UTR), die schwarzen Punkte am 5'-Ende stehen für die Cap-Struktur. (B) Sekretion von GLuc in den Zellüberstand nach Elektroporation des YFV-GLuc Replikons, logarithmisch aufgetragen in relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU). *In vitro* transkribierte Replikon-RNA wurde in BHK-J Zellen elektroporiert. Die GLuc-Aktivität in den Überständen wurde zu den auf der x-Achse aufgetragenen Zeitpunkten vermessen. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

Die Funktionalität des in die Zellen elektroporierten Replikons wurde anhand der Zunahme der GLuc-Aktivität, gleichzusetzen mit dem Anstieg des GLuc-Gehalts des Zellüberstands bei anhaltender Replikation über die Zeit, bewiesen.

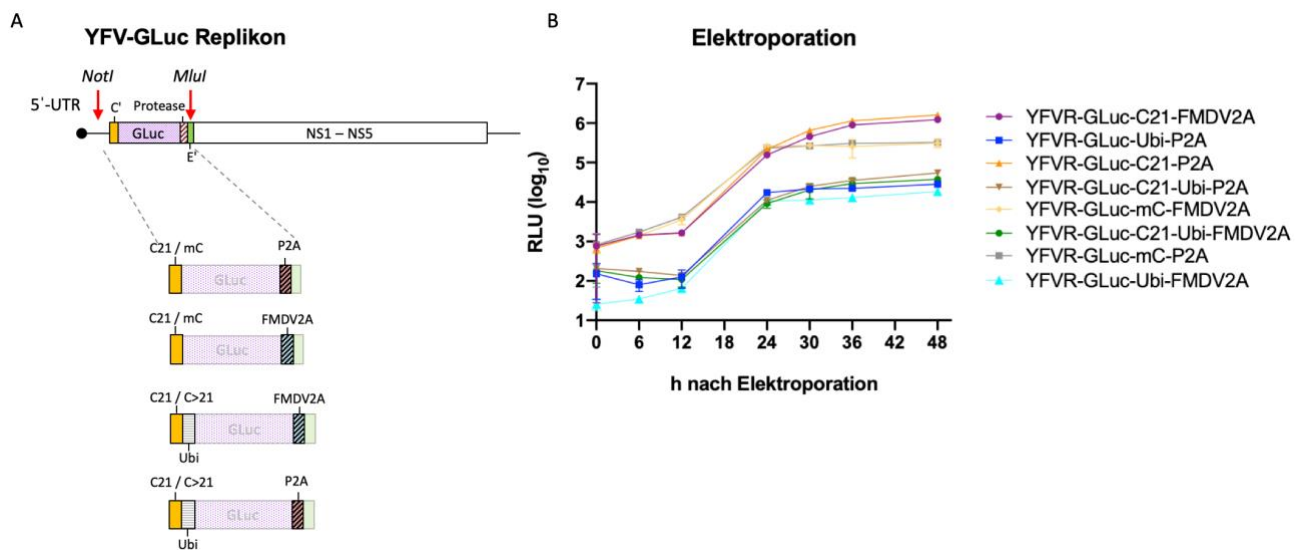
### 3.1.2 Optimierung des YFV-GLuc Replikons

Im ursprünglich in der Arbeitsgruppe generierten Replikon YFVR-GLuc-Ubi-FMDV2A lag die verkürzte Capsid-Sequenz C' (Abb. 6A, unten) bei etwas mehr als den in der Literatur angegeben, für eine effiziente Replikation mindestens notwendigen 21 Codons (Corver et al., 2003; Patkar et al., 2007). Die das Envelope-Protein kodierende Sequenz war wie in der Literatur angegeben auf die letzten 22 Codons verkürzt (Anraku et al., 2002; Hahn et al., 1987; Jones et al., 2005). Darüber hinaus war eine Ubiquitin-Sequenz in das Konstrukt eingebaut und die verwendete Autoprotease FMDV 2A entstammte dem Maul- und Klauenseuche-Virus. Da es in der Vergangenheit Vergleichsexperimente zu der Effizienz verschiedener Autoproteasen gab, bei der sich die kurze P2A des Porcine Teschovirus 1 als besonders effizient hervortat (Wang et al., 2015), sollte experimentell bestimmt werden, ob ein Austausch der Protease einen förderlichen Effekt auf die GLuc-Expression haben könnte. Ferner wurde mit verschiedenen Capsid-Sequenzlängen sowie der Beibehaltung oder der Deletion des Ubiquitins experimentiert. In Tabelle 12 sind die acht verschiedenen Versionen des YFV-GLuc Replikons, die miteinander verglichen wurden, aufgelistet. Die Generierung der Konstrukte erfolgte via Fusions-PCR (s. 2.2.3.4) mit entsprechend designten Fusion-Primern und anschließender Klonierung über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NotI* und *MluI* (Abb. 7A).

**Tab. 12:** Auflistung der acht generierten YFV-GLuc Replikons

Name	YFV Capsidsequenz	Protease	Ubiquitin
YFVR-GLuc-C21-FMDV2A	21 Codon Minimalsequenz	FMDV 2A	nein
YFVR-GLuc-Ubi-P2A	Verkürzt, jedoch mehr als die 21 Codon Minimalsequenz	P2A	ja
YFVR-GLuc-C21-P2A	21 Codon Minimalsequenz	P2A	nein
YFVR-GLuc-C21-Ubi-P2A	21 Codon Minimalsequenz	P2A	ja
YFVR-GLuc-mC-FMDV2A	Mature Capsid	FMDV 2A	nein
YFVR-GLuc-C21-Ubi-FMDV2A	21 Codon Minimalsequenz	FMDV 2A	ja
YFVR-GLuc-mC-P2A	Mature Capsid	P2A	nein
YFVR-GLuc-Ubi-FMDV2A	Verkürzt, jedoch mehr als die 21 Codon Minimalsequenz	FMDV 2A	ja

Die Effizienz der Replikons wurde direkt nach EP über die GLuc-Aktivität in den zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommenen Zellüberständen bestimmt. Wie in Abb. 7B zu erkennen, war die GLuc-Aktivität der Replikons mit Ubiquitin-Sequenz deutlich niedriger als die derer ohne Ubiquitin. Ferner zeigten die Replikons mit der 21 Codon Minimalsequenz des YFV Capsid Proteins (C21) im Verlauf eine höhere GLuc-Aktivität als die Replikons mit mature Capsid (mC) beziehungsweise der mehr als 21 Codons umfassenden Capsidsequenz (C>21). Zwischen den Proteasen P2A und FMDV 2A zeigte sich in Kombination mit C21 und ohne Ubiquitin nur ein geringfügiger Unterschied in der Aktivität der entsprechenden Replikons.

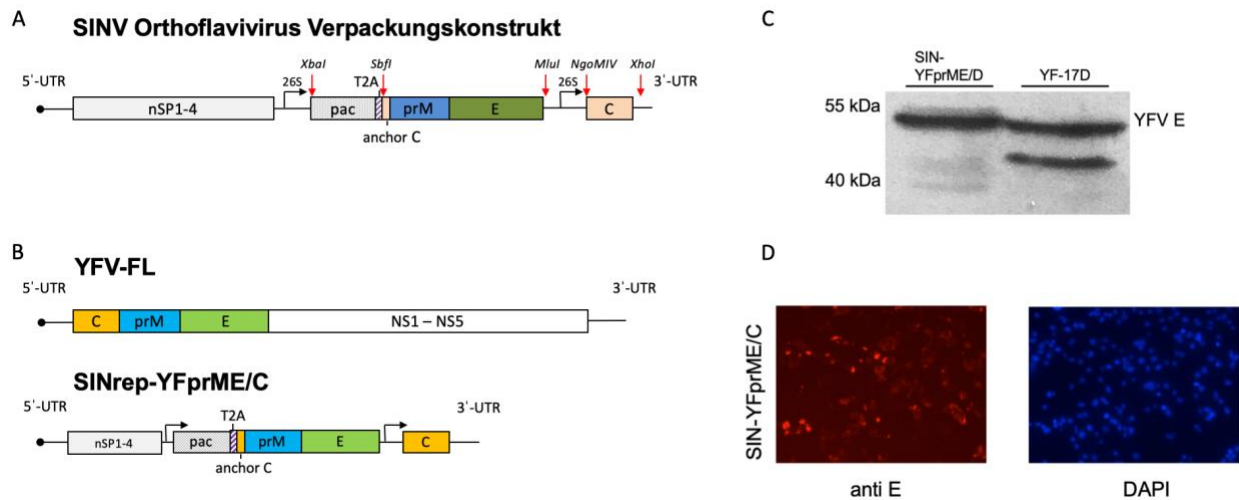


**Abb. 7:** Optimierung des YFV-GLuc Replikons. (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Klonierungsansätze für die Generierung unterschiedlicher YFV-GLuc Replikons. Über die Restriktionsschnittstellen von *NotI* und *MluI* (rote Pfeile) wurden die verschiedenen Fragmente mit unterschiedlicher Kombination von Protease (P2A, rot-schwarz-gestreift, bzw. FMDV 2A, blau-schwarz-gestreift), Ubiquitin (Ubi, grau-quergestreift) und Capsid (C21/mC/C>21, gelb) in das Replikon eingefügt. Siehe auch Abb. 6A für genauere Beschreibungen. (b) GLuc-Aktivität der Zellüberstände im Zeitverlauf nach EP der verschiedenen YFV-GLuc Replikons. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

Basierend auf diesen Untersuchungen und unter Berücksichtigung der in der Literatur dargestellten Vorteile der kurzen P2A Protease gegenüber FMDV 2A, zeigten sich die Konstrukte YFVR-GLuc-C21-P2A und YFVR-GLuc-mC-P2A als vielversprechendste Alternativen für das Primärkonstrukt YFVR-GLuc-Ubi-FMDV 2A.

### 3.1.3 Generierung eines YFV Verpackungskonstruktes

Um die für die Herstellung funktionaler VRPs notwendigen viralen Strukturproteine *in trans* in die Zellen bringen zu können, war ein entsprechendes Verpackungskonstrukt vonnöten. Da das Replikon noch die verkürzten Anteile des C- und E-Proteins enthält (s. Abb. 6A unten), sollte eine mögliche Rekombination in diesen Regionen nach Co-EP von Replikon und Verpackungskonstrukt mit dem Wiederauftreten infektiöser Partikel über die *single round infection* hinaus verhindert werden. Dazu wurde der Ansatz eines bicistronischen Konstruktes basierend auf einem nicht-pathogenen Sindbis-Virus (SINV) Replikon gewählt (Agapov et al., 1998), auf dem die Strukturproteine in vertauschter Reihenfolge angeordnet wurden (Abb. 8A). Unter einem ersten subgenomischen Promotor befindet sich der offene Leserahmen (ORF) der prM- und E-Gene, im zweiten Cistron wird das C-Protein kodiert. Dem Konstrukt wurde ferner eine Puromycinresistenz über das Gen der Puromycin N-Acetyltransferase (pac) am 5'-Ende vor dem prME-Gen beigefügt. Um die Strukturproteine per Autoprotolyse von diesem Selektionsmarker abzuspalten, wurde zwischen den Sequenzen das Gen der Thosa assigna virus 2A Protease (T2A) inseriert. In Abb. 8B ist das YFV Verpackungskonstrukt SIN-YFprME/C in direktem Vergleich zum vollständigen Genom des YFV dargestellt. Über die Puromycin-Resistenz war es möglich, mit den Verpackungskonstrukten elektroporierte Zellen nach Inkubation zu selektieren. Durch Kultivierung konnte so eine stabil das Verpackungskonstrukt SIN-YFprME/C exprimierende Zelllinie etabliert werden, die langfristig in Kultur gehalten werden konnte. Neben dem erfolgreichen Erhalt der Zellen in Puromycin-haltigem Medium, war auch der Nachweis des YFV E-Proteins per Western Blot (WB) und Immundetektion in den Zelllysaten beweisend für die stabile Expression der Strukturproteine unter Kontrolle des ersten subgenomischen Promotors (Abb. 8C). Im direkten Vergleich mit Lysaten von mit dem Impfstamm YFV 17D infizierten Zellen ließ sich das E-Protein auch in der stabilen Zelllinie bei der in der Literatur angegebenen Größe von ca. 53 kDa detektieren. Ein weiterer Nachweis erfolgte per Immunfluoreszenz (IF) mit einem Orthoflavivirus-spezifischen Antikörper, der ebenfalls die Detektion des E-Proteins ermöglichte (Abb. 8D). Mangels eines funktionellen Antikörpers für die Detektion des unter einem separaten subgenomischen Promotors stehenden C-Proteins erfolgte dessen Nachweis indirekt über die erfolgreiche Verpackung des Replikons und die Funktionsüberprüfung der so gebildeten VRPs (s. 3.1.4).

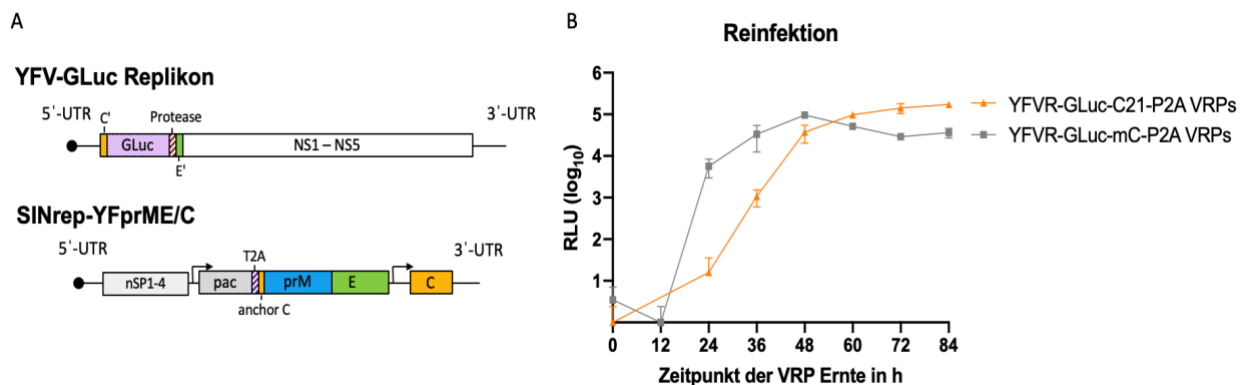


**Abb. 8:** Aufbau und Validierung des bicistronischen SINV Orthoflavivirus Verpackungskonstruktes. (A) Schematische Darstellung eines auf dem nicht-pathogenen SINV Replikon basierenden Orthoflavivirus Verpackungskonstruktes und Darstellung der zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme. Die SINV Nichtstrukturproteine sind als hellgrauer Kasten dargestellt. Das Puromycin-Resistenzgen (*pac*) ist als grau-kariertes Kasten abgebildet, die lila-schraffierte Box beschreibt das *Thosea asigna* Virus 2A Autoprotease-Gen (*T2A*). Die Orthoflavivirus-Strukturproteingene sind als farbige Kästen abgebildet. Die zwei subgenomischen Promotoren werden durch schwarze Pfeile dargestellt (26S), rote Pfeile symbolisieren Restriktionsschnittstellen. (B) Schematische Gegenüberstellung des vollständigen YFV Genoms (YFV-FL, oben) und des YFV Verpackungskonstruktes SIN-YFprME/C (unten). Das Farbschema wurde entsprechend angepasst. Für genauere Beschreibungen siehe (A) bzw. Abb. 6A. (C) WB-Analyse der Lysate einer stabil SIN-YFprME/C exprimierenden Zelllinie. Nachweis von YFV E mit einem Kaninchen Antikörper. Als Positivkontrolle dienten die Lysate mit YFV 17D infizierter Zellen. (D) Nachweis des Oberflächenproteins E in der stabil SIN-YFprME/C exprimierenden Zelllinie per indirekter IF. Die Detektion erfolgte mit einem pan-flavi Antikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

### 3.1.4 Herstellung, Optimierung und Titerbestimmung von YFV-VRPs

Die klonierten und validierten YFV Replikons und Verpackungskonstrukte wurden im Folgenden zur Herstellung von YFV-VRPs verwendet. Dafür wurden die DNA-Konstrukte (Abb. 9A) wie in 2.2.3.5 beschrieben per *in vitro* Transkription in RNA umgeschrieben und diese anschließend in einer Co-EP in BHK-J-Zellen elektroporiert (2.2.2.4). Nach mehrtägiger Inkubation wurden die VRPs zu verschiedenen Zeitpunkten aus dem Zellüberstand geerntet und zur Reinfektion von naiven Zellen verwendet. Über das Auslesen der Luciferaseaktivität in den reinfizierten Zellen 24 h nach Reinfektion wurde die Funktionalität und Effizienz der VRPs bestimmt. Wie in Abb. 9B zu erkennen, zeigte

sich ein deutlicher Anstieg der Luciferaseaktivität in den Zellen 24 h nach Reinfektion, was die Infektionsfähigkeit und damit Funktionalität der hergestellten VRPs bestätigte. Dies validierte indirekt auch die korrekte Expression und Funktion des unter einem separaten Promotor stehenden C-Proteins auf dem Verpackungskonstrukt (s. 3.1.3). Für die Co-EP wurden wie in Abb. 9B dargestellt die beiden in 3.1.2 beschriebenen vorteilhaftesten Varianten des Replikons YFVR-GLuc-C21-P2A und YFVR-GLuc-mC-P2A vergleichend eingesetzt. Dabei zeigte sich ein schnellerer und steilerer Anstieg der GLuc-Aktivität in den mit YFVR-GLuc-mC-P2A-VRPs reinfizierten Zellen, diese erreichte jedoch auch schneller ihr Maximum und fiel danach wieder ab. Die Aktivität der GLuc in den Überständen der mit YFVR-GLuc-C21-P2A-VRPs infizierten Zellen stieg langsamer, erreichte dann jedoch höhere Werte. Die Verwendung beider Replikons führte zur Bildung stabiler und zuverlässiger VRPs. Aufgrund der in Abb. 10 dargestellten Bestimmung des bestmöglichen Erntezeitpunkts der VRPs ca. 72 h nach Co-EP, sowie des durch die kürzere C-Sequenz geringeren Rekombinationsrisikos, stellte sich YFVR-GLuc-C21-P2A als die günstigere Variante dar. Im Folgenden wurde entsprechend das Replikon YFVR-GLuc-C21-P2A als generelles YFV-GLuc Replikon verwendet und wird konsekutiv vereinfacht als YFVR-GLuc bezeichnet.

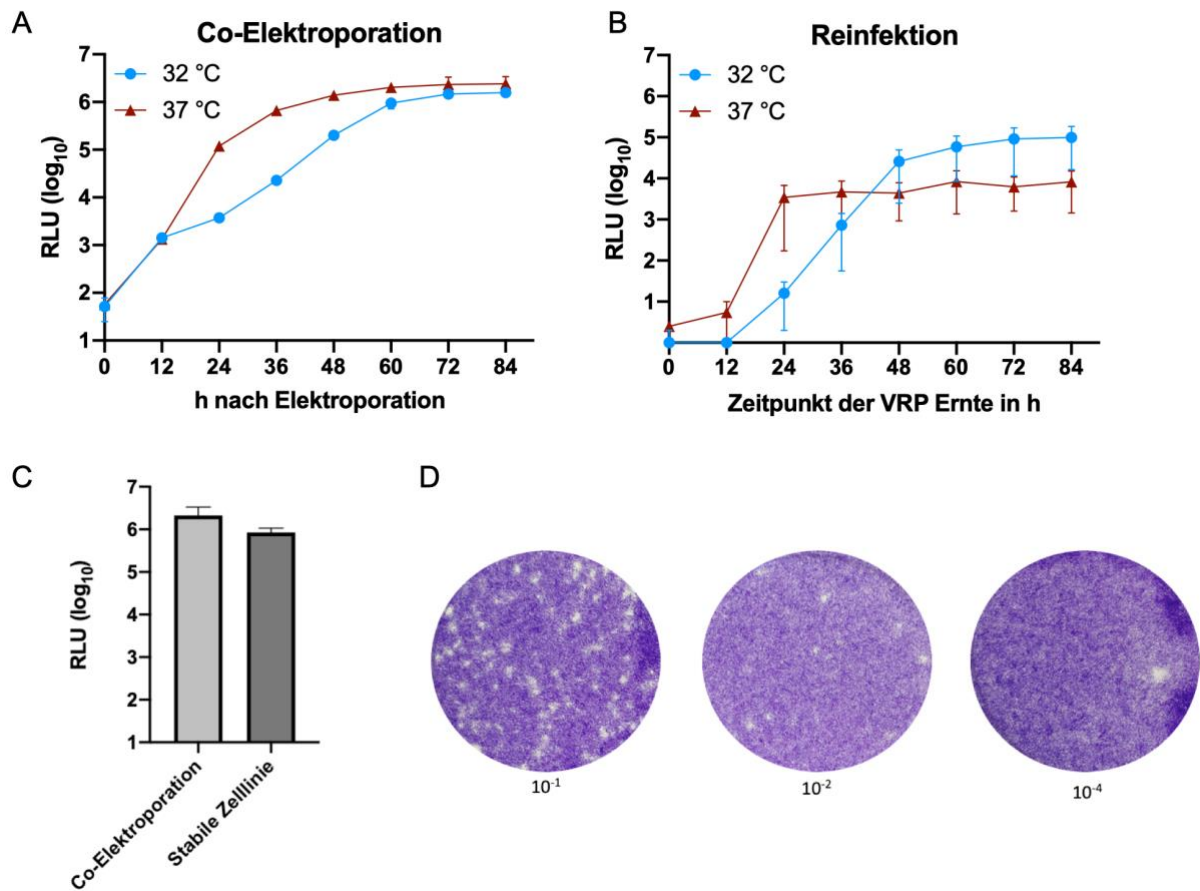


**Abb. 9:** Herstellung und Validierung von YFV-VRPs. (A) Schematische Darstellung des YFV-GLuc Replikons und Verpackungskonstrukts SINrep-YFprME/C für die Herstellung von VRPs. Die *in vitro* transkribierte RNA der Konstrukte wurde in einer Co-EP in BHK-J Zellen eingebracht, aus deren Überstand im Verlauf die VRPs geerntet wurden. (B) GLuc-Aktivität der Zellüberstände nach Reinfektion naiver BHK-J Zellen mit aus der Co-EP zu den angegebenen Zeiten gewonnenen VRPs unter Verwendung der Replikons YFVR-GLuc-C21-P2A und YFVR-GLuc-mC-P2A. Auswertung 24 h nach Reinfektion. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

Um die VRPs nachfolgend für die Anwendung im NT zu optimieren, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. In früheren Arbeiten mit Alphaviren wurde festgestellt, dass die Produktion funktioneller VRPs bei etwas geringeren Temperaturen als den standardmäßig verwendeten 37° C zu höheren Viruspartikel-Ausbeuten führt (Gläser et al., 2013). Es wurde daher überprüft, ob Gleiches auch für Orthoflavivirus-VRPs gilt. Mit Replikon und Verpackungskonstrukt co-elektroporierte Zellen wurden parallel bei 32° C und 37° C inkubiert. In definierten Abständen wurden die Zellüberstände auf sekretiertes GLuc Protein untersucht. In der direkten Analyse der GLuc-Aktivität der Überstände nach EP zeigte sich ein deutlich langsamerer Anstieg unter Inkubation bei 32° C als bei 37° C (Abb. 10A). Erst ca. 84 h nach EP waren auch in den Überständen der bei geringerer Temperatur inkubierten Zellen vergleichbar hohe GLuc-Level zu detektieren. Anders verhielt es sich jedoch bei Reinfektion frischer Zellen mit den zu den einzelnen Zeitpunkten geernteten VRPs. In Abb. 10B lässt sich erkennen, dass die bei 32° C hergestellten VRPs bei Reinfektion im Verlauf zu deutlich höheren RLU-Werten führten, als die 37° C VRPs. Dies lässt den Schluss zu, dass ab ca. 48 h nach Co-EP größere Mengen VRPs bei 32° C gebildet werden, als bei 37° C und entsprechend eine Inkubation bei geringerer Temperatur vorteilhaft für eine höhere Ausbeute ist. Ferner war durch dieses Experiment festzustellen, dass die VRP-Produktion bei 32° C zwischen 60 und 84 h ihr Maximum erreichte und dann auf einem gleichbleibenden Niveau verblieb.

Durch das auf dem Verpackungskonstrukt kodierte Puromycin-Resistenzgen war das langfristige Kultivieren einer stabil das Verpackungskonstrukt exprimierenden Zelllinie per Selektion möglich. Es wurde untersucht, ob die EP von Replikon-RNA in diese stabile Zelllinie zu ähnlichen oder höheren Ausbeuten funktioneller VRPs führt, als die Co-EP von Replikon und Verpackungs-RNA in naive Zellen. Um dies zu überprüfen, wurde ein Reinfektionsversuch der mit den zwei unterschiedlichen Methoden gewonnenen VRPs durchgeführt und die GLuc-Aktivitäten miteinander verglichen. Es zeigte sich bei den aus der Co-EP gewonnenen VRPs eine ca. 2,5-fach höhere RLU, gleichbedeutend mit einer entsprechend höheren VRP-Ausbeute (Abb. 10C). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die VRPs folgend durch Co-EP von Replikon und Verpackungskonstrukt in naive BHK-J Zellen sowie Inkubation bei 32° C hergestellt und nach 72 h geerntet. Die VRPs wurden anschließend entweder direkt verwendet oder aliquotiert und bei -80° C gelagert. Bei Rücktitrierung der YFV-VRPs auf die stabile Zelllinie war eine Plaquebildung

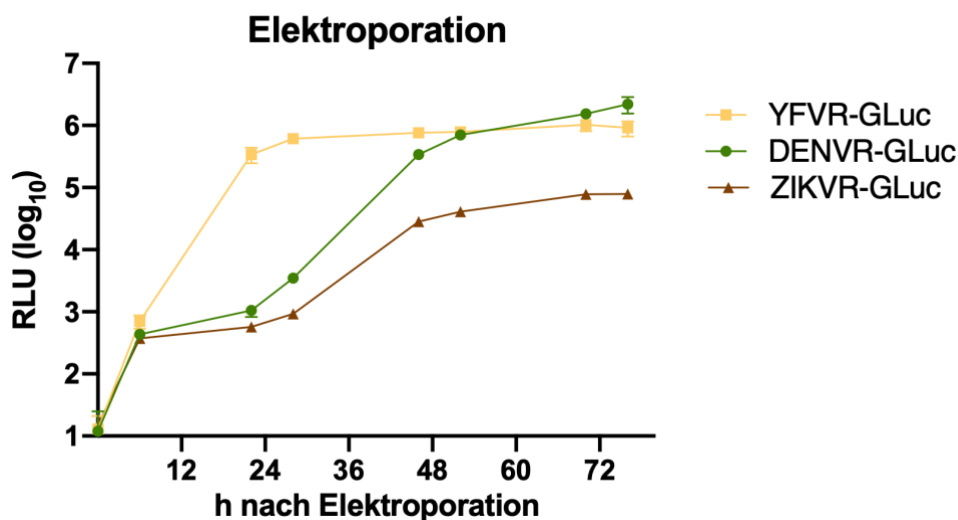
festzustellen, was die Funktionalität der VRPs zusätzlich bestätigte (Abb. 10D). Für eine Titerbestimmung waren die Plaques jedoch zu klein und somit nicht gut auszählbar. Um die VRP-Titer für die weitere Verwendung determinieren zu können, wurde daher auf die Titerbestimmung per TCID<sub>50</sub> Methode über die Auswertung der GLuc-Aktivität zurückgegriffen (s. 2.2.2.4). Die Titer der VRPs bewegten sich zwischen 10<sup>4</sup>–10<sup>6</sup> FFU/mL. Der Versuch einer weiteren Aufkonzentrierung über einen Sucrosegradienten führte zu keiner nennenswerten Titererhöhung der VRPs, weshalb die Aliquots nach Ernte nicht weiter behandelt wurden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 10:** VRP-Produktionsoptimierung. (A) *In vitro* transkribierte Replikon- und Verpackungskonstrukt-RNA wurde zur Co-EP von BHK-J Zellen verwendet und die Zellen bei 32° C bzw. 37° C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die GLuc-Aktivität der Zellüberstände vermessen. (B) GLuc-Aktivität der Zellüberstände nach Reinfektion naiver BHK-J Zellen mit aus (A) zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnenen VRPs. Auswertung 24 h nach Reinfektion. (C) VRPs wurden durch Co-EP von Replikon und Verpackungskonstrukt bzw. EP von Replikon-RNA in die stabil das Verpackungskonstrukt exprimierende Zelllinie hergestellt, nach 72 h geerntet und zur Reinfektion naiver BHK-J Zellen verwendet. Auswertung nach 24 h. (D) YFVR-GLuc VRPs wurden auf stabil das Verpackungskonstrukt exprimierende Zellen in den angegebenen Verdünnungen titriert. Nach Infektion wurde der Zellrasen mit Agarose überschichtet und bei 37° C für 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

### 3.1.5 Generierung und Evaluierung weiterer Orthoflavivirus-VRPs

Da für die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten NTs auch andere Orthoflavivirus-Seren untersucht werden sollten, wurden parallel zu YFV- auch DENV- und ZIKV-VRPs hergestellt. Entsprechende GLuc-Replikons lagen bereits vor und konnten direkt verwendet werden. Um die Funktionsfähigkeit der verschiedenen Replikons zu überprüfen wurden vergleichende EPs mit anschließender GLuc-Auswertung durchgeführt. Während die YFV- und DENV-GLuc Replikons vergleichbare GLuc-Aktivitäten nach Elektroporation zeigten, war das ZIKV-GLuc Replikon weniger aktiv (Abb. 11) und erreichte eine um ca. eine Zehnerpotenz geringeren Wert der maximalen relative Lichteinheit (*relative light unit*, RLU). Das YFV-GLuc Replikon erreichte sein stabiles Maximum von ca.  $10^6$  RLU bereits 24–36 h nach Elektroporation, während die DENV-GLuc (DENVR-GLuc) und ZIKV-GLuc (ZIKVR-GLuc) Replikons erst nach 48–72 h höhere Werte erreichten. DENVR-GLuc stieg auch nach 72 h noch in seiner Aktivität. Die Untersuchungen der Replikons wurden in Insektenzellen wiederholt, um zu überprüfen, ob dies die Effizienz verbessern könnte. Die Aktivität der Replikons war in den Insektenzellen jedoch deutlich geringer als in den Säugetierzellen und blieb mit Ausnahme des YFV-GLuc Replikons unterhalb der Nachweisgrenze. Weitere Untersuchungen in Insektenzellen wurden deshalb nicht durchgeführt (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 11.** Aktivität der Orthoflavivirus Replikons in eukaryotischen Zellen. Die Replikon-RNA wurde per EP in BHK-J Zellen eingebracht und die GLuc-Aktivität der Zellüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen

Für die DENV und ZIKV Verpackungskonstrukte wurden analog zu YFV die Gene der Strukturproteine von den in der Arbeitsgruppe vorhandenen volle Länge Klonen amplifiziert. Es wurden Verpackungskonstrukte für alle vier DENV Serotypen hergestellt. Darüber hinaus wurde eine codonoptimierte (codopt) Variante des ZIKV Verpackungskonstruktes hergestellt. Die entsprechenden Strukturproteinsequenzen wurden als gBlock entworfen und bestellt. Die verschiedenen Restriktionsschnittstellen der Konstrukte (Abb. 12A) ermöglichten einen einfachen Austausch der einzelnen Elemente, sodass im Verlauf verschiedene Strukturproteingene miteinander kombiniert werden konnten. So konnten sowohl Mischkonstrukte der einzelnen Serotypen (DENV) als auch chimärische Verpackungskonstrukte, deren prME-Gen anderen Orthoflaviviren als die Capsid-Sequenz entstammten, generiert werden. Die hergestellten Verpackungskonstrukte sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tab. 13:** Auflistung der verschiedenen Orthoflavivirus Verpackungskonstrukte

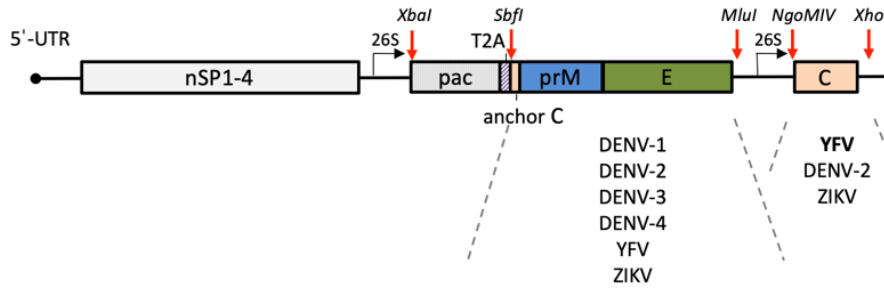
<b>Name</b>	<b>prME</b>	<b>Capsid</b>
SINrep-YFprME/C	YFV	YFV
SINrep-DEN1prME/DEN2C	DENV-1	DENV-2
SINrep-DEN1prME/YFC	DENV-1	YFV
SINrep-DEN2prME/C	DENV-2	DENV-2
SINrep-DEN2prME/YFC	DENV-2	YFV
SINrep-DEN3prME/DEN2C	DENV-3	DENV-2
SINrep-DEN3prME/DEN2C	DENV-3	DENV-2
SINrep-DEN3prME/YFC	DENV-3	YFV
SINrep-DEN4prME/DEN2C	DENV-4	DENV-2
SINrep-DEN4prME/YFC	DENV-4	YFV
SINrep-ZIKprME/C_opt	ZIKV codonoptimiert	ZIKV codonoptimiert
SINrep-ZIKprM/C_wt	ZIKV wt	ZIKV wt
SINrep-ZIKprME/DEN2C	ZIKV wt	DENV-2
SINrep-ZIKprME/YFC	ZIKV wt	YFV

Um die per Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüften Verpackungskonstrukte auf ihre Funktionalität zu untersuchen, wurden sie mit dem zu der Capsid-Sequenz passenden Replikon co-elektroporiert. Die daraus gewonnenen VRPs wurden anschließend zur Reinfektion frischer BHK-J Zellen verwendet. Wie in Abb. 12B zu

erkennen, zeigte sich das ZIKV-GLuc Replikon bereits nach der Co-Elektroporation mit den Verpackungskonstrukten nur wenig aktiv. Entsprechend war auch nach Reinfektion mit den ZIKVR-GLuc-VRPs (sowohl wt als auch codonoptimiert) im Überstand der infizierten Zellen kaum eine Luciferaseaktivität zu messen (Abb. 12C, lila, orange). Ähnlich stellte es sich für die DENV-VRPs dar, wobei das DENV-GLuc Replikon direkt nach Co-EP mit dem DENV-Verpackungskonstrukt mit der Zeit noch ausreichend hohe RLU's erreichte. Im Vergleich der nach 72 h und nach 96 h geernteten DENV-VRPs ließ sich ein kleiner Anstieg der GLuc-Aktivität der reinfizierten Zellen feststellen, was darauf hinweist, dass zumindest ein geringfügiger Anteil funktioneller VRPs gebildet wurde. Dennoch war das YFV-GLuc Replikon am zuverlässigsten und die Überstände der mit YFVR-GLuc-VRPs reinfizierten Zellen zeigten die höchste Luciferaseaktivität. Um zuverlässig auswertbare NTs der anderen Orthoflaviviren durchführen zu können, wurde daher mit Verpackungskonstrukten gearbeitet, bei denen basierend auf SINrep-YFprME/C die YFV-Hüllproteine prM und E gegen die entsprechenden Hüllproteine der anderen Orthoflaviviren ausgetauscht wurden (s. Tab. 13). Da für die Erkennung der Partikel durch Serumantikörper vor allem die Oberflächenproteine M und E relevant sind, war es möglich durch die Kombination verschiedener prME-Gene mit dem YFV Capsid-Gen immunogene und funktionelle Orthoflavivirus-VRPs zu erhalten, die das YFV-GLuc Replikon enthielten. Die Oberflächenproteine und damit potentiell antigenen Strukturen der VRPs entsprachen jedoch DENV-1–4 oder ZIKV. Wie in Abb. 12C zu erkennen, war die Infektionsleistung der chimärischen YFVR-GLuc-DEN2prME/YFC-VRPs nahezu gleichwertig zu jener der reinen YFV-VRPs. Auch die chimärischen YFVR-GLuc-ZIKprME/YFC-VRPs führten zu einer ausreichend hohen Luciferaseaktivität in den Überständen der mit ihnen reinfizierten Zellen, um damit NTs durchführen zu können. Es war so potentiell möglich, auch mit DENV und ZIKV Seren zu arbeiten, obwohl die DENV- und ZIKV-Replikons sich nicht effizient in VRPs verpacken ließen. Chimärische VRPs aus DENV und ZIKV (SINrep-ZIKprME/DEN2C + DENVR-GLuc, Abb. 12C, hellgrün) zeigten sich als nicht funktional und wurden nicht weiter verwendet.

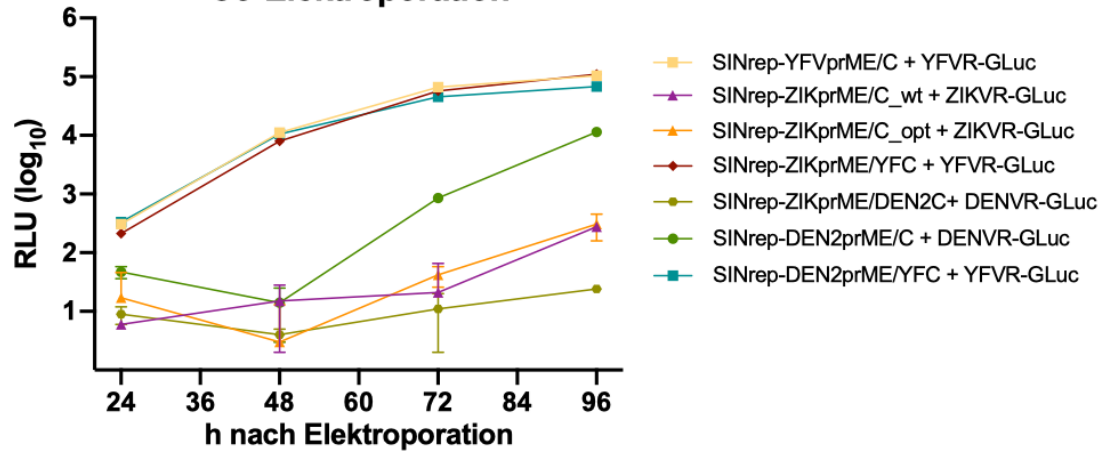
A

### SINV Orthoflavivirus Verpackungskonstrukt



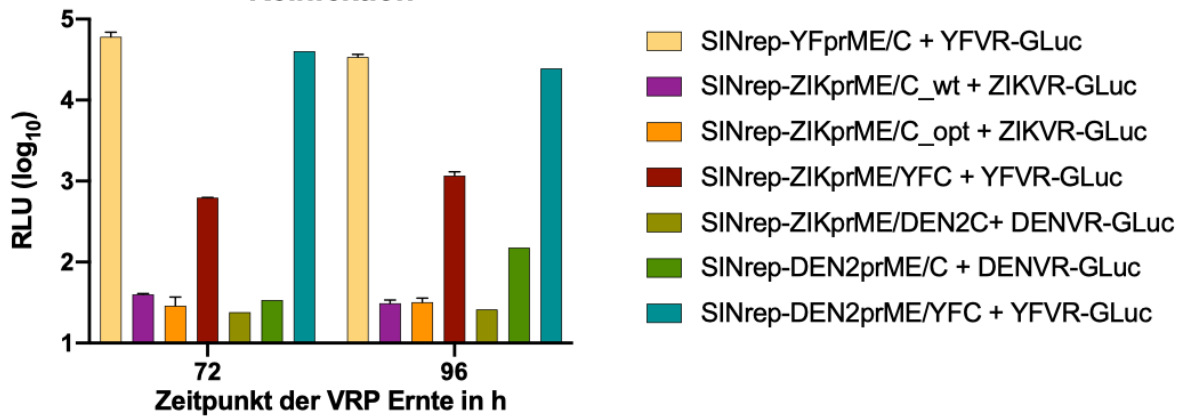
B

### Co-Elektroporation



C

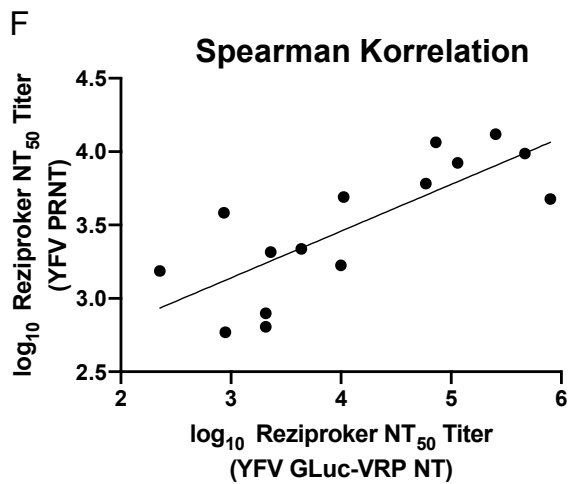
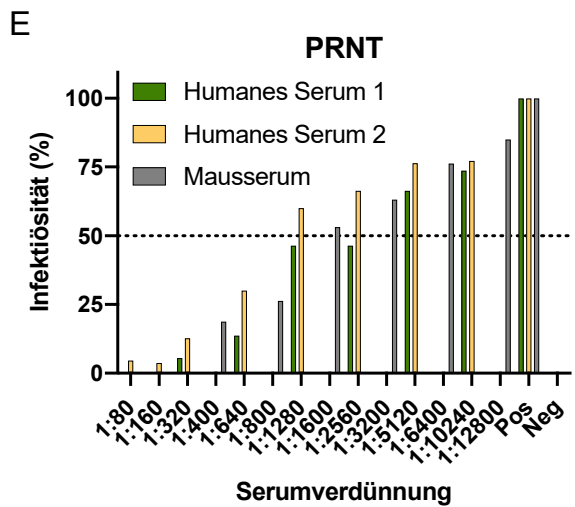
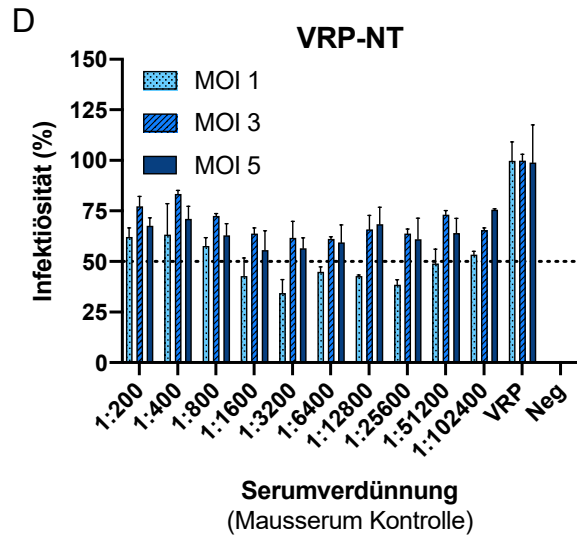
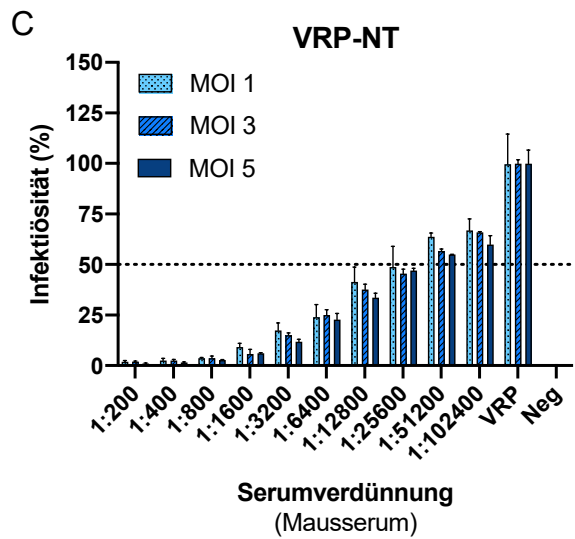
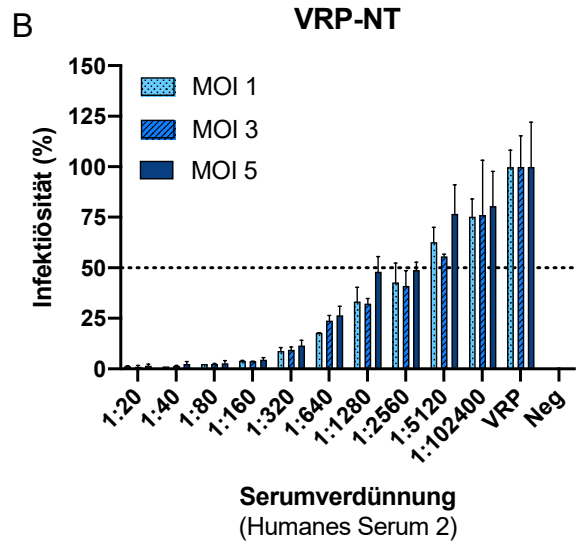
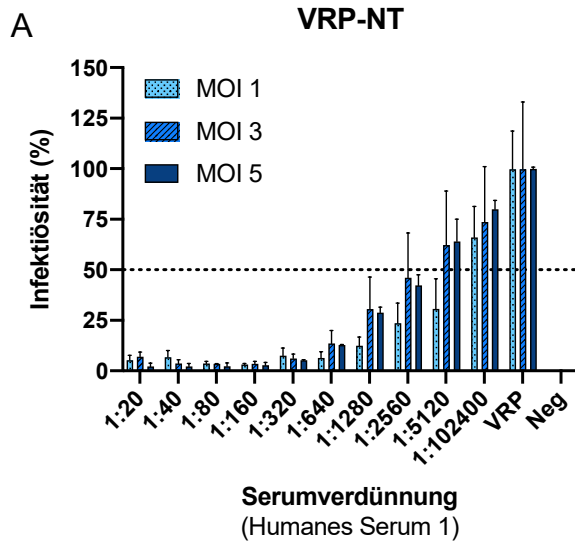
### Reinfektion



**Abb. 12:** Funktionalität verschiedener Orthoflavivirus VRPs. (A) Schematische Darstellung des Orthoflavivirus Verpackungskonstrukts. Die gestrichelten Linien flankieren die für die verschiedenen Orthoflaviviren ausgetauschten Strukturproteinbereiche. Für genauere Beschreibungen siehe Abb. 6A bzw. Abb. 8A. (B) GLuc-Aktivität in den Zellüberständen nach Co-EP von gleichen Anteilen Replikon- und Verpackungskonstrukt-RNA. (C) GLuc-Aktivität der Zellüberstände nach Infektion mit verschiedenen Orthoflavivirus-VRPs. Frische BHK-J Zellen wurden mit den gleichen Volumina an Zellüberständen von co-elektroporierten Zellen infiziert. Die Ernte der in den Überständen befindlichen und für die Infektion verwendeten VRPs erfolgte zu den in den auf der x-Achse angegebenen Zeitpunkten. Der Readout der GLuc-Aktivität erfolgte 24 h post Reinfektion. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

### 3.2 Etablierung und Validierung des YFV-VRP Neutralisationstests

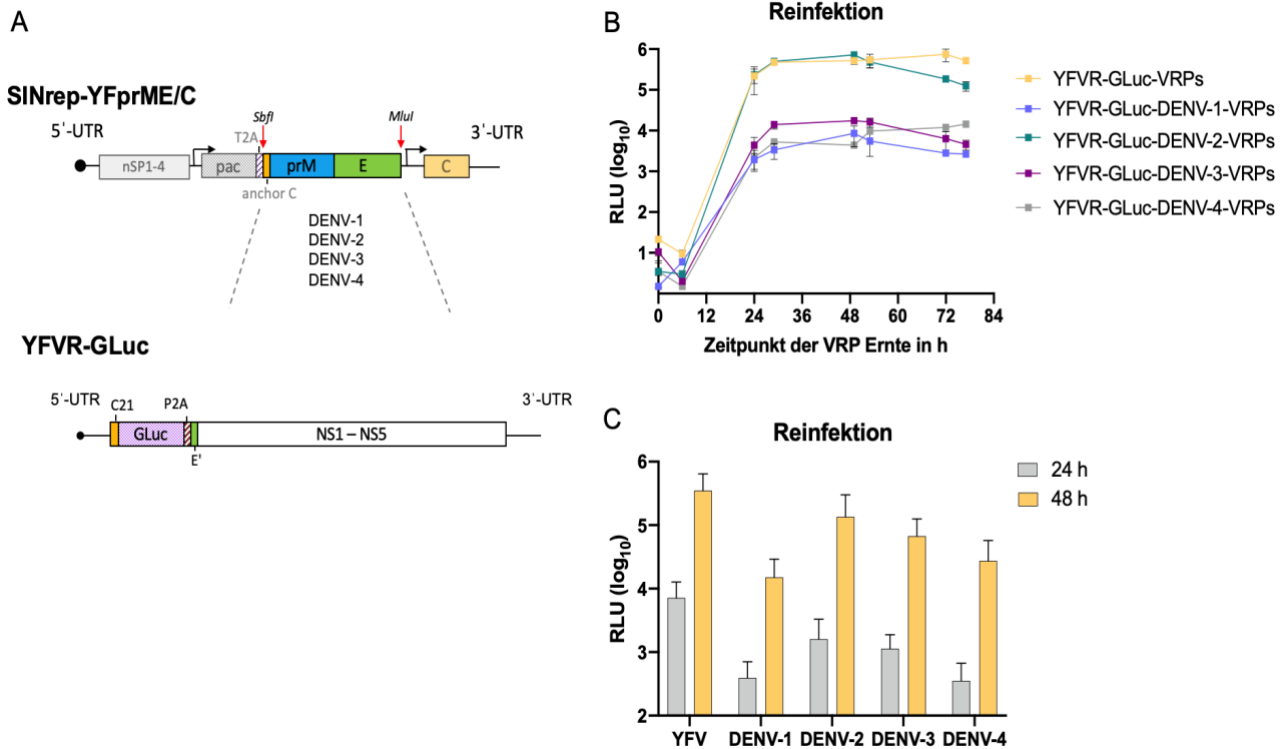
Die optimierten YFV-VRPs wurden entsprechend ihres per TCID<sub>50</sub> Methode bestimmten Titers auf eine MOI (*multiplicity of infection*, Infektiöse Einheiten pro Zelle) von 1, 3 bzw. 5 eingestellt und in einem Neutralisationstest (NT) mit den Blutseren zweier gegen Gelbfieber geimpfter Menschen sowie einem Maus-Antiserum getestet (Abb. 13). Als Negativkontrolle diente das Serum einer YFV-naiven Maus (Abb. 13D). Wie in Abb. 13A–C dargestellt, zeigten die YFV-Seren eine stufenweise Neutralisation der VRPs bei allen MOIs, was die Eignung der VRPs im NT bestätigte. Die Seren wurden ferner in einem Plaque-reduktions-Neutralisierungstest (PRNT) mit dem YFV 17D Impfstamm bei einer MOI von 5 untersucht und die entsprechenden 50 % Neutralisationstiter (NT<sub>50</sub>-Titer) bestimmt (Abb. 13E). Um die Eignung der VRPs für NTs zusätzlich zu belegen, wurden die per YFV PRNT bestimmten NT<sub>50</sub>-Titer verschiedener Seren nachfolgend und mit denen eines YFVR-GLuc-VRP-basierten NTs bei MOI 5 verglichen. In Abb. 13F ist die Rangkorrelation nach Spearman der beiden Methoden dargestellt. Es zeigt sich eine starke positive und statistisch signifikante Korrelation zwischen den Titern ( $r_s = 0,7857$ ;  $p = 0,0008$ ), was bestätigt, dass die YFVR-GLuc-VRP-basierten NTs als gleichwertig zu den PRNTs zu betrachten sind.



**Abb. 13:** Validierung YFVR-GLuc-VRP-basierter NTs. (A,B) NTs mit Seren von gegen Gelbfieber geimpften Menschen. Die Seren wurden seriell verdünnt und mit VRPs der MOI 1, 3 oder 5 inkubiert. In 96-Well-Platten ausgesäte BHK-J Zellen wurden mit den vorinkubierten Proben infiziert und nach 24 h auf ihre GLuc-Aktivität im Überstand untersucht. Als Positivkontrolle (VRP) wurden die Zellen mit einer entsprechenden Menge ohne Serum vorinkubierter VRPs infiziert. Dieser 100 %-Wert diente zur Normalisierung der anderen Werte. (C, D) YFV-GLuc-VRP NTs unter Verwendung von einem Maus-anti-YFV Serum (C) bzw. einem YFV-naiven Mauskontrollserum (D), Durchführung analog zu (A,B). (E) YFV 17D PRNT mit den in (A, B, C) verwendeten Seren. Die Seren wurden seriell verdünnt und mit dem Impfvirus YFV 17D bei einer MOI von 5 inkubiert. In 6-Well-Platten ausgesäte BHK-J Zellen wurden mit den vorinkubierten Proben infiziert und anschließend mit Agarose überschichtet. Die Auswertung erfolgte nach 72 h durch Fixierung und Färben der Zellen mit anschließender Auszählung der Plaques. Als Positivkontrolle zur Normalisierung der Werte wurden Zellen mit einer entsprechenden Menge Virus ohne Seruminkubation infiziert. (F) Korrelation der NT<sub>50</sub>-Titer aus YFVR-GLuc-VRP-basierten NTs (MOI 5) und YFV 17D PRNTs.  $r_s$  = Spearman Korrelationskoeffizient. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

### 3.3 Etablierung und Validierung chimärischer DENV-VRPs in NTs

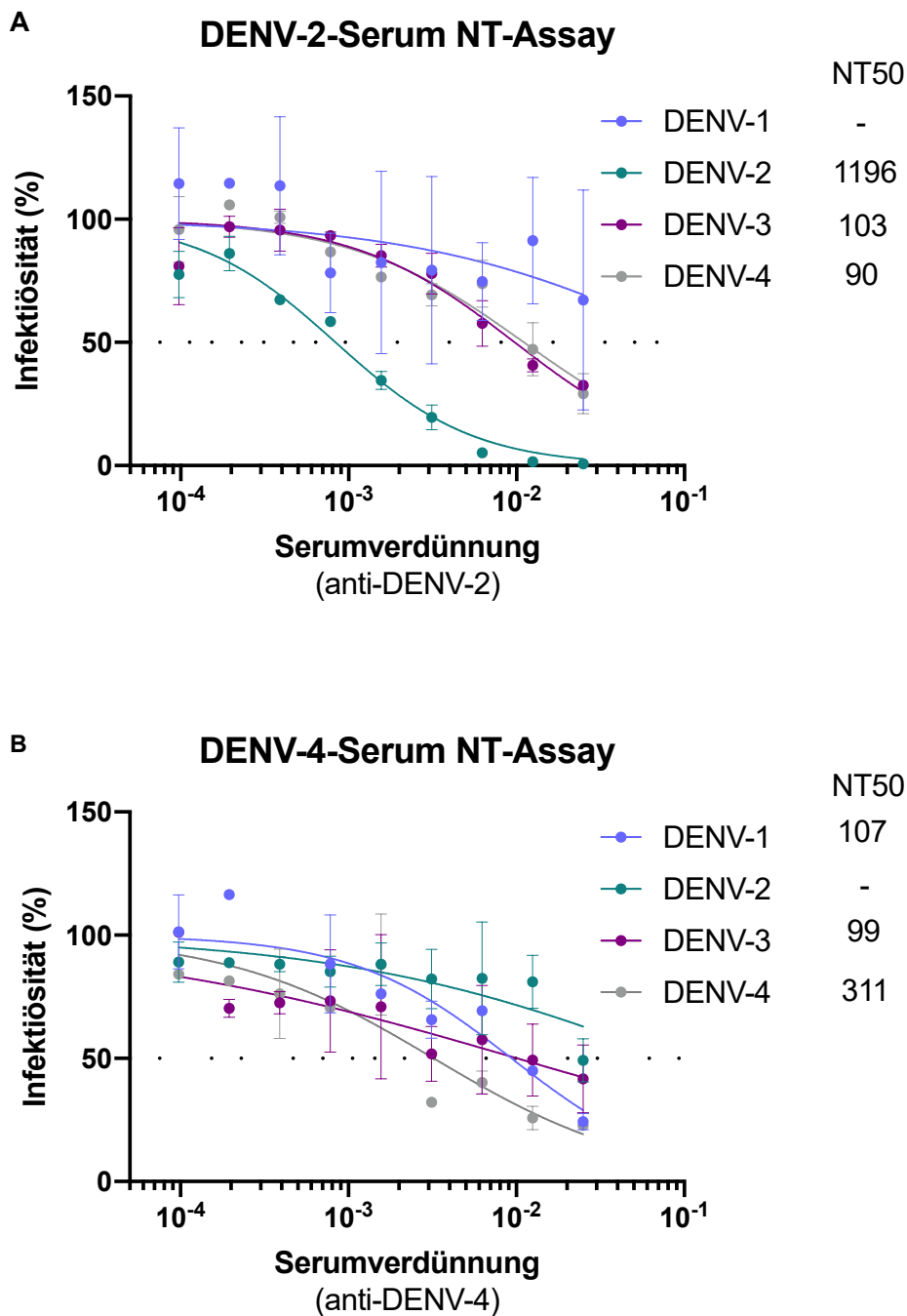
Aufgrund der schlechten Effizienz der DENV- und ZIKV-Replikons (s. 3.1.5) wurde für die Untersuchung weiterer Orthoflavivirus-Seren in VRP-basierten NTs auf die Verwendung chimärischer VRPs zurückgegriffen. Wie in 3.1.5 beschrieben, wurde dabei die prME-kodierende Strukturproteinkassette des Verpackungskonstrukts SIN-YFprME/C gegen die entsprechenden Gene von DENV-1–4 bzw. ZIKV ausgetauscht, während das YFV Capsid-Gen beibehalten wurde (Abb. 14A). Nach Co-EP mit YFVR-GLuc wurden so chimärische VRPs gebildet, die auf ihrer Oberfläche die Mantelproteine der verschiedenen Orthoflaviviren tragen und das YFV-GLuc-Replikon, umhüllt von dem YFV-Capsid, enthalten. Im direkten Vergleich zu den YFVR-GLuc-VRPs zeigten die chimärischen YFVR-GLuc-DENV-2-VRPs eine ähnlich gute Infektionseffizienz. Wie in Abb. 14B und C zu erkennen, erreichte die GLuc-Aktivität in den mit ihnen infizierten Zellen vergleichbar hohe Werte. Für die chimärischen VRPs der Serotypen DENV-1, DENV-3 und DENV-4 war die maximal erreichte RLU um den Faktor  $10^1$  bis  $10^2$  geringer. Anhand der Aktivitätszunahme der GLuc in den Überständen mit ihnen infizierter Zellen über die Zeit von 24 h bis 48 h nach Reinfektion lässt sich dennoch analog zu den YFV- und DENV-2-VRPs auf die erfolgreiche Produktion infektiöser chimärischer VRPs zurückschließen (Abb. 14C).



**Abb. 14:** Produktion und Validierung chimärischer VRPs. (A) Schematische Darstellung der co-elektroporierten RNAs zur Herstellung chimärischer Orthoflavivirus VRPs. Die mit gestrichelten Linien flankierte Region des YFV Verpackungskonstruktes SIN-YFprME/C wurde über die Restriktionsstellen *SbfI* und *MluI* gegen die entsprechenden Strukturproteingenkassetten der aufgeführten Orthoflaviviren ausgetauscht. Für nähere Beschreibungen s. Abb. 6A, Abb. 8A und Abb. 12A. (B) GLuc-Aktivität nach Reinfektion naiver Zellen mit chimärischen YFVR-GLuc-DENV-VRPs im Vergleich zu YFVR-GLuc-VRPs. Frische BHK-J Zellen wurden mit den gleichen Volumina zu den angegebenen Zeitpunkten nach Co-Elektroporation geernteter VRPs infiziert und die Zellüberstände 24 h nach Reinfektion auf ihre GLuc-Aktivität untersucht. (C) GLuc-Aktivität von mit nach 72 h geernteten YFVR-GLuc-VRPs bzw. chimärischen YFVR-GLuc-DENV-VRPs infizierten Zellen im zeitlichen Verlauf. Analyse der GLuc-Aktivität nach 24 h bzw. 48 h. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

Die so generierten chimärischen DENV-VRPs wurden anschließend in einem NT mit humanen Seren gegen DENV-2 und DENV-4 verwendet, um ihre Anwendbarkeit und Spezifität zu untersuchen. Da die Titer der chimärischen DENV-VRPs niedriger waren, als die der YFV-VRPs, wurden sie für die NTs auf eine MOI von 1 eingestellt. Die Untersuchung des humanen anti-DENV-2-Serums im VRP-NT mit allen vier DENV-

Serotyp-VRPs zeigte den höchsten Neutralisationstiter ( $NT_{50}$  zwischen 1:640 und 1:1280, Reziproker Titer bei ca. 1200) und damit die höchste Neutralisationseffizienz gegenüber den DENV-2-VRPs (Abb. 15A). In niedriger Verdünnung neutralisierte das Serum auch die DENV-3 und DENV-4-VRPs geringfügig (Reziproke Titer bei ca. 110 für die DENV-3-VRPs und ca. 85 für die DENV-4-VRPs). Die Untersuchung des anti-DENV-4-Serums führte zu einer weniger ausgeprägten Neutralisation der DENV-4-VRPs im Vergleich zu den DENV-2-VRPs durch das anti-DENV-2-Serum. Es war nur eine geringfügige Spezifität zu erkennen. Den höchsten Neutralisationstiter erreichte das Serum für die DENV-4-VRPs mit einem  $NT_{50}$ -Wert zwischen 1:320 und 1:640 (Abb. 15B, Reziproker  $NT_{50}$  Titer bei ca. 320). Eine geringfügige Hemmung bei der niedrigsten Verdünnungsstufe war auch für die DENV-1 (Reziproker  $NT_{50}$  Titer bei ca. 115) und die DENV-3-VRPs (Reziproker  $NT_{50}$  Titer bei ca. 110) zu erkennen. Die DENV-2-VRPs waren durch das DENV-4-Serum kaum zu hemmen.



**Abb. 15:** DENV-VRP-NTs mit Humanseren. (A) Das humane DENV-2-Serum wurde in den angegebenen Stufen seriell verdünnt und mit den DENV-VRPs bei einer MOI von 1 für 1 h vorinkubiert. In 96-Well-Platten ausgesäte BHK-J Zellen wurden mit den Proben infiziert und nach 24 h auf ihre GLuc-Aktivität im Überstand untersucht. Als Positivkontrolle (VRP) wurden die Zellen mit einer entsprechenden Menge ohne Serum vorinkubierter VRPs infiziert. Dieser 100 %-Wert diente zur Normalisierung der anderen Werte. Als Negativkontrolle dienten ohne VRPs kultivierte Zellen. Unter NT<sub>50</sub> ist der ungefähre reziproke NT<sub>50</sub>-Titer angegeben. (B) DENV-4-Serum NTs. Analog zu (A) wurde ein DENV-VRP-NTs mit einem humanen Serum gegen DENV-4 durchgeführt. Modifiziert nach (Lücke et al., 2022).

## 4. Diskussion

### 4.1 Etablierung und Optimierung orthoflaviviraler VRP-Systeme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Orthoflavivirus System basierend auf einmalig infektiösen VRPs etabliert, mit deren Hilfe die neutralisierenden Eigenschaften von Serumantikörpern untersucht werden können. Der Fokus lag dabei vornehmlich auf der Etablierung von YFV-VRPs, bei denen ein YFV Replikon durch YFV Hüllproteine verpackt ist. Es wurden jedoch auch chimärische VRPs der verschiedenen DENV-Serotypen sowie des ZIKV generiert. Zur Herstellung der VRPs wurden Zellen mit *in vitro* transkribierten RNAs eines YFV-Replikons sowie eines Orthoflavivirus-Verpackungskonstrukts co-elektroporiert. In den elektroporierten Zellen wurden so einmalig infektiöse VRPs gebildet, die das virale Replikon enthalten und auf der Oberfläche die von dem Verpackungskonstrukt abgeleiteten Hüllproteine tragen. Da bei der Reinfektion naiver Zellen mit den VRPs nur das Replikon, nicht aber die Verpackungsinformation übertragen wird, handelt es sich um einen einmaligen Infektionsvorgang. In den reinfizierten Zellen können sich keine neuen VRPs bilden. Den Nachweis der VRP-Reinfektion ermöglicht ein im Replikon kodiertes Reporterogen.

Es existieren verschiedene Ansätze zur Produktion von Orthoflavivirus-VRPs. Für diese Arbeit wurde mit einem YFV-Replikon, das GLuc als Reporter exprimiert, gearbeitet. Die Wahl von humanisierter GLuc als Expressionsreporter war neben ihrer Sekretion in den Zellüberstand und der damit einhergehenden einfacheren Auswertung auch in ihrer hohen Sensitivität, sowie Stabilität bei Lagerung bei 4 °C begründet (Tannous et al., 2005). Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurden die Zellüberstände häufig für mehrere Tage bei 4 °C oder auch –20 °C gelagert, ohne dass es zu signifikanten Aktivitätsverlusten kam. Auch war die Auswertung der NTs 24–48 h nach Infektion möglich, während für andere Reportersysteme wie bspw. GFP oder NanoLuc längere Inkubationszeiten von 3–6 Tagen als notwendig beschrieben wurden (Li et al., 2017; Matsuda et al., 2018). Die hergestellten Orthoflavivirus Verpackungskonstrukte basieren auf einem Sindbis-Virus (SINV) Expressionsvektor (Agapov et al., 1998) mit zwei subgenomischen Promotoren. Die Konstrukte wurden als DNA kloniert und modifiziert. Nach *in vitro* Transkription durch eine SP6-Polymerase wurden Replikon- und

Verpackungs-RNA in eukaryotische Zellen co-elektroporiert, um VRPs zu gewinnen. Die Verwendung von RNA statt DNA ist dabei ähnlich dem natürlichen Infektionsprozess der Orthoflaviviren, deren Genom als positiver RNA-Strang direkt nach Eintritt in das Zytosol der Zelle als mRNA translatiert wird. In anderen Arbeiten wurde auf die Transkription in RNA zugunsten einer direkten Transfektion von DNA-Konstrukten, unter der Kontrolle von bspw. CMV- oder CAG-Promotoren, verzichtet (Freundlieb et al., 1999; Jones et al., 2005; Khromykh et al., 1998; Li et al., 2017). Die Gene der Strukturproteine wurden in dieser Arbeit gänzlich von denen der Replikationsproteine getrennt und in vertauschter Reihenfolge unter der Kontrolle zweier subgenomischer Promotoren von dem Verpackungskonstrukt exprimiert. In der Literatur wurden Ansätze beschrieben, in denen nur prME von den anderen Genen getrennt wurde, während das Gen des C-Proteins auf dem Replikon verblieb. Andere Arbeiten beschrieben die Expression von C, prM und E angeordnet wie im viralen Genom aus einem einzigen ORF, während wieder andere zwei getrennte Verpackungskonstrukte für Mantelproteine und Capsid verwendeten (Jones et al., 2005; Khromykh et al., 1998; Yamanaka et al., 2017). Für diese Arbeit wurde letztendlich die Variante eines Replikons ohne Strukturproteingene und eines einzelnen Verpackungskonstruktes gewählt. Es wurde beschrieben, dass die Expression der Strukturproteine von einem Vektor statt von zwei zu höheren VRP-Titern führt und viele Quellen bevorzugten eine vollständige Deletion der Strukturproteine von dem Replikon (Khromykh et al., 1998). Das Replikon benötigt jedoch trotz dieser Deletion noch Restsequenzen von C und E für eine effiziente Replikation (Anraku et al., 2002; Bredenbeek et al., 2003; Hahn et al., 1987). Einige im Rahmen der Optimierung untersuchten Versionen des YFV-Replikons enthielten testweise daher auch die vollständige Sequenz des C-Proteins, wovon eines ähnlich gute Ergebnisse erzielte wie das letztendlich weiter genutzte YFVR-GLuc-C21-P2A. Aufgrund des größeren Risikos einer Rekombination im Bereich der überlappenden Sequenzen von Replikon und Verpackungskonstrukt mit dem Wiederauftreten infektiöser Partikel über die einmalige Infektion hinaus, wurde jedoch die Version des Replikons mit der verkürzten YFV C21-Minimalsequenz für die weiteren Experimente verwendet. Auch die vertauschte Anordnung der Strukturproteingene auf dem Verpackungskonstrukt gegenüber der im viralen Genom, sowie ihre Kontrolle unter zwei separaten subgenomischen Promotoren sollte eine mögliche Rekombination verhindern. Eine Expression von C, prM und E im

Leseraster würde das Risiko überlappender Sequenzen erhöhen. Durch die getrennte Expression von C und prME war eine proteolytische Abspaltung des Capsids von den Mantelproteinen nicht mehr nötig. Für die korrekte Spaltung und Translokation von prME im Rahmen der Prozessierung musste jedoch eine C-Ankersequenz vor dem prME Gen beibehalten werden, um eine regelrechte Reifung des Partikels zu gewährleisten (Amberg und Rice, 1999).

Die Trennung der genetischen Informationen von Replikationsmaschinerie und Strukturproteinen auf zwei separaten Nukleinsäurekonstrukten ermöglicht es, VRPs unter geringeren biologischen Sicherheitsstufen einzusetzen, als es für infektiöse Viren der Fall wäre. Viele medizinisch relevante Orthoflaviviren werden in die Biosicherheitsstufe 3 kategorisiert und gelten damit als Pathogene, die potentiell schwerwiegende Erkrankungen verursachen können, für die es keine kausale Therapie oder Impfung gibt. Um unter kontrollierten Bedingungen mit ihnen arbeiten zu können, sind entsprechende laborspezifische Gegebenheiten vonnöten, die viele Einrichtungen nicht gewährleisten können. Da für Orthoflavivirus-Antikörper Kreuzreaktionen bekannt sind, ist die serologische Feindiagnostik, bspw. im Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), häufig erschwert (Fischer et al., 2021; Koraka et al., 2002; Maeda und Maeda, 2013). Die zuverlässigste Diagnostik stellt laut Literatur noch immer der NT dar, der jedoch in seiner klassischen Anwendung in Form eines Plaque-basierten PRNTs der Verwendung infektiöser Viren bedarf. Dies limitiert die Durchführung bei Fehlen entsprechender Sicherheitslabore. Auch die Anwendung von infektiösen Reporterviren bedarf der Arbeit unter entsprechenden Biosicherheitsstufen, weshalb sie zwar die Durchführung und Auswertung der Untersuchungen erleichtern, nicht aber die Zugänglichkeit der Diagnostik verbessern. Im Gegensatz dazu lassen sich die VRPs durch ihre geringere Biosicherheitsstufe in BSL-2 Laboren anwenden, da sich bei ihrer Verwendung im NT keine neuen infektiösen Partikel bilden.

Das in dem Verpackungsplasmid eingefügte Puromycin-Resistenzgen ermöglichte es, eine stabil die Strukturproteine exprimierende Zelllinie zu generieren, wie es bereits in der Vergangenheit beschrieben wurde (Freundlieb et al., 1999). Das Gen befindet sich unter der Kontrolle des ersten subgenomischen Promotors, der auch die Expression von prME kontrolliert. Die Rücktitrierung der YFV-GLuc-VRPs auf stabil SINrep-YFprME/C

exprimierende Zellen führte zur Ausbildung von Plaques, was die Expression der Strukturproteine in den Zellen und damit im weiteren Sinne die Bildung neuer VRPs über die *single-round-infection* hinaus bewies. Auch der Nachweis der Strukturproteine per Immunfluoreszenz (IF) und Western Blot (WB) validierte die stabile Expression in Puromycin-selektierten Zellen. Ein Nachweis des separat exprimierten C-Proteins in der IF war mangels eines funktionellen Antikörpers zum Zeitpunkt der Arbeit nicht möglich. Es wurde daher die Bildung und Verwendung funktionaler VRPs als Expressionsnachweis angesehen. Durch neue anti-YFV-C Antikörper auf dem Markt (bspw. von GeneTex) wäre es möglich, die Experimente zu wiederholen und auch die Expression des zweiten subgenomischen Promotors per Immundetektion in WB oder IF zu beweisen. Die Rücktitrierung der VRPs auf die stabile Zelllinie erzeugte zwar sichtbare, jedoch nicht auswertbare, feine und wenig definierte Plaques. Für eine zuverlässige Titerbestimmung der titrierten VRPs waren sie nicht geeignet. Es musste daher auf eine GLuc-basierte Methode zur Titerbestimmung zurückgegriffen werden, bei der über einen TCID<sub>50</sub>-Assay die GLuc-Aktivität im Zellüberstand ausgewertet wurde. Durch Vergleichsanalysen wurde festgestellt, dass die VRPs aus der Co-Elektroporation von Replikon- und Verpackungs-RNA zu höheren Titern führte, als die Elektroporation (EP) des Replikons in die stabile Zelllinie. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die stabilen Zellen trotz der Resistenz durch das Puromycin-haltige Medium einem höheren Stress ausgesetzt sind, als es in normalem Kulturmedium der Fall ist und entsprechend eine geringere Vitalität und Proteinbiosynthese vorweisen könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben den YFV-GLuc-VRPs noch weitere Orthoflavivirus-VRPs (DENV, ZIKV) hergestellt. Die Replikation der DENV- und ZIKV-GLuc Replikons war jedoch bereits bei Vermessung der GLuc-Aktivität nach EP geringer bzw. langsamer, als die des YFV-GLuc Replikons. Die per Co-Elektroporation generierten, DENV bzw. ZIKV virusspezifischen VRPs führten in mit ihnen infizierten Zellen zu einer kaum messbaren GLuc-Aktivität. Dies könnte auch darauf hinweisen, dass sich die DENV und ZIKV Replikons mit den entsprechenden Helferkonstrukten nicht so gut verpacken lassen, wie das YFV Replikon durch das YFV-Verpackungskonstrukt. Dabei war es für das ZIKV Replikon unerheblich, ob das wildtypische oder das codonoptimierte Verpackungskonstrukt verwendet wurde. Beide Ansätze führten zur keiner Signifikanten

GLuc-Aktivität in den mit ihnen infizierten Zellen. Um dennoch virusspezifische NTs durchführen zu können, wurden chimärische Orthoflavivirus-VRPs generiert, deren Mantelproteine denen der vier DENV-Serotypen bzw. dem ZIKV entstammten und das YFV-GLuc Replikon beinhalteten. Diese chimärischen VRPs führten bei Reinfektion zu messbaren GLuc-Aktivitäten mit zunehmender Kinetik über die Zeit. Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben die erfolgreiche Nutzung chimärischer Orthoflavivirus-VRPs, in denen bspw. ein DENV- oder JEV-Replikon mit anderen Orthoflavivirus Hüllproteinen verpackt wurde (Matsuda et al., 2018; Yamanaka et al., 2017). Für das auf den Daten dieser Arbeit basierende Paper (Lücke et al., 2022), wurden neben den chimärischen DENV-1–4- und ZIKV-VRPs noch chimärische WNV- und TBEV-VRPs generiert, die ebenfalls das in dieser Arbeit hergestellte YFV-GLuc Replikon enthielten und im NT erfolgreich zur Anwendung kamen. Die erreichten Titer der chimärischen VRPs waren niedriger als die der YFV-VRPs, trotzdem bewegten auch sie sich im Bereich der von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen VRP-Titern von  $10^4$ – $10^9$  FFU/mL (Freundlieb et al., 1999; Khromykh et al., 1998; Yamanaka et al., 2017). Es sei jedoch angemerkt, dass dabei teilweise andere Methoden zur Titerbestimmung gewählt wurden, was die Vergleichbarkeit limitiert. Die erreichten Titer waren im Falle aller VRPs hoch genug, um NTs mit einer MOI von mindestens 1 durchführen zu können.

#### 4.2 Durchführung und Interpretation von VRP-basierten Orthoflavivirus NTs

In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ließ sich die Anwendbarkeit der YFVR-GLuc-VRPs sowie der chimärischen DENV-1–4-VRPs im NT beweisen. Auch die chimärischen ZIKV-VRPs wurden weiterführend erfolgreich in NTs angewendet (Lücke et al., 2022). In allen Untersuchungen war eine Virusspezifität zu erkennen, die sich auf die VRPs übertragen ließ. Die jeweiligen virusspezifischen Antiseren konnten auch die dem Virus entsprechenden VRPs am effektivsten an einer Infektion von Zellen hindern, d.h. ein YFV-Serum hemmte somit am effektivsten die YFV-VRPs. Nachgewiesen wurde dies durch eine deutlich verringerte GLuc-Aktivität in den Zellen, die durch mit Antiserum vorinkubierte VRPs reinfiziert wurden. Die spezifische Hemmung ließ sich durch die Durchführung von PRNTs mit den gleichen Antiseren und den entsprechenden Viren validieren, auch wenn der direkte Vergleich der  $NT_{50}$ -Titer aufgrund der abweichenden Sensitivität der unterschiedlichen Assays nur eingeschränkt möglich ist. Wie in dieser

Arbeit dargestellt, weichen die  $NT_{50}$ -Titer der unterschiedlichen Methoden teilweise recht stark voneinander ab. Während der  $NT_{50}$ -Titer des ersten Humanserum eines gegen YFV geimpften Menschen sowohl im GLuc-Assay als auch im PRNT zwischen 1:2.560 und 1:5.120 zu liegen scheint, lag er für das zweite Humanserum im VRP-basierten NT zwischen 1:2.560 und 1:5.120, im PRNT jedoch nur zwischen 1:640 und 1:1.280. Für das anti-YFV Mausserum waren die Abweichungen sogar noch deutlich größer. Hier lag der im VRP-basierten NT bestimmte  $NT_{50}$ -Titer für alle MOIs zwischen 1:25.600 und 1:51.200 und war damit sehr hoch, während im PRNT nur ein  $NT_{50}$ -Titer von 1:800–1:1.600 erzielt wurde. Ursächlich für diese Abweichungen können die unterschiedlichen Assayformate (GLuc-Assay in 96-Well-Platten vs. PRNT in 6-Well-Platten), sowie die höhere Sensitivität des GLuc-Assays verglichen mit dem Auszählen sichtbarer Plaques am Lichttisch sein. Auch die Verwendung von infektiösem Virus in höherer Menge im Vergleich zu dem Einsatz kleinerer Mengen VRPs in anderem Format könnte die Unterschiede begründen. In einer anderen Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe konnten für das Alphavirus Chikungunya (CHIKV) im VRP-basierten NT ebenfalls abweichende  $NT_{50}$ -Titer bei der Verwendung unterschiedlicher Plattenformate (96-Well vs. 24-Well) bei sonst gleichen Versuchsbedingungen bestimmt werden (Gläser et al., 2013). Trotz der beschriebenen Abweichungen zwischen VRP-basiertem NT und PRNT ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen den mit den unterschiedlichen Methoden bestimmten Titern derselben Seren feststellen, was eine Vergleichbarkeit und ebenbürtige Anwendbarkeit der Assays belegte. Im Verlauf wurden in dieser Arbeitsgruppe weiterführende NTs mit Antiseren gegen DENV-2, TBEV, WNV, YFV und ZIKV durchgeführt und mit den entsprechenden PRNTs verglichen. Dabei wurden alle chimärischen VRPs bzw. alle zuvor genannten Orthoflaviviren (DENV-2, TBEV, WNV, YFV, ZIKV) mit den entsprechenden virusspezifischen Seren inkubiert. In allen Fällen zeigten sich ähnliche Kinetiken mit virusspezifischen Hemmkurven und vergleichbaren  $NT_{50}$ -Titern aus VRP-basiertem NT und PRNT (Lücke et al., 2022). Aufgrund des handlichen Formates der VRP-basierten NTs in 96-Well-Platten waren diese Untersuchungen deutlich einfacher und unkomplizierter durchzuführen, als es für die z.T. unter BSL-3-Bedingungen durchzuführenden PRNTs im 6-Well-Format der Fall war. Auch das Auszählen der Plaques am Lichttisch bedurfte im Vergleich zu der automatisierten GLuc-Vermessung am Plattenluminometer deutlich mehr Zeit und Routine. Darüber hinaus war eine

Auswertung nach bereits 24 h möglich, während die PRNTs mehrere Tage bis zur Auszählung inkubieren mussten. Auch eine alternative, ELISA-basierte Methode wurde in der Literatur mit 3 Tagen bis zur Auswertung als zeitlich langwieriger beschrieben (Balingit et al., 2020).

#### 4.3 Limitationen der etablierten Orthoflavivirus-VRP-basierten NTs

Für die Durchführung und Auswertung der auf den hier beschriebenen Orthoflavivirus-VRPs-basierenden NTs ist kein BSL-3-Labor, wohl aber das Vorhandensein eines Luminometers sowie entsprechender GLuc-Substrate bzw. Kits vonnöten. Dies kann – ähnlich der biologischen Sicherheitsstufen der Viren im Fall des PRNTs – einen limitierenden Faktor für die Anwendbarkeit dieses VRP-Systems in der Orthoflavivirus-Diagnostik darstellen. Vor allem in Entwicklungsländern oder Ländern mit geringem Forschungsbudget ist die Anschaffung solcher Geräte nicht immer möglich. Für die Hochdurchsatzuntersuchung vieler Proben hintereinander wurde darüber hinaus ein Plattenluminometer verwendet, das in seiner Anschaffung mehrere Tausend Euro kostet. In kleinerem Rahmen wäre es möglich, die Untersuchungen mit einem Tischluminometer und einer selbstangesetzten, Coelenterazin-haltigen Substratlösung durchzuführen. Auch in dieser Arbeit wurden viele der Voruntersuchungen mit einer selbstangesetzten GLuc-Substratlösung durchgeführt. Allerdings ist auch Coelenterazin ein kostenintensiveres Substrat, das gesondert erworben werden muss, um die Experimente durchzuführen. Ferner resultierten die damit durchgeführten Analysen in deutlich geringeren RLU Werten, weshalb entsprechende Daten in dieser Dissertation nicht gezeigt werden, sondern die endgültigen Experimente mit einem gekauften Luciferase-Kit (Promega) durchgeführt wurden. Um einen alternativen Readout zu ermöglichen, wurde daher versucht einen anderen Reporter als GLuc in die Replikons zu integrieren. Hierfür wurden verschiedene Konstrukte mit einer sekretierten alkalischen Phosphatase (SEAP) hergestellt. Mit SEAP als Reporter sollte die Replikation anhand des Farbumschlags eines kostengünstigen Substrats verfolgt werden können. Die Klonierung gestaltete sich jedoch herausfordernd und das resultierende Replikon zeigte sich im direkten Vergleich zu der GLuc-Variante als deutlich weniger zuverlässig und weniger sensitiv in der Auswertung. Zugunsten des vielversprechenderen Ansatzes des GLuc-Replikons wurde die Arbeit an der SEAP-Variante daher nicht weitergeführt. In der Vergangenheit wurde bereits ein Orthoflavivirus

Replikon mit SEAP als Replikationsreporter etabliert (Moritoh et al., 2011). Verglichen mit GLuc als Reporter ist SEAP jedoch durch seine längere Auswertungszeit (1,5–2 h gegenüber 1–10 min), bis zu 20.000-fach (*in vitro*) geringere Sensitivität und den geringeren linearen Bereich der Zellzahlabdeckung als nachteilig beschrieben worden (Tannous, 2009).

#### 4.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde ein Replikon-basiertes Orthoflavivirus VRP-System etabliert, das im NT anwendbar ist und gleichwertig zum bisherigen Goldstandard der Orthoflavivirusdiagnostik, dem PRNT, zur Titerbestimmung von Antisera verwendet werden kann. Bei dem verwendeten Replikon handelte es sich um ein YFV-GLuc Replikon, welches mit den Hüllproteinen der Orthoflaviviren YFV, DENV oder ZIKV verpackt wurde und somit für die Analyse der entsprechenden Orthoflavivirus-Antisera benutzt werden konnte. Durch den Aufbau des Verpackungskonstruktes mit der prME-Kassette unter einem separaten Promotor und flankiert von zwei Restriktionsschnittstellen, war ein einfacher und schneller Austausch der Mantelproteine möglich. Die konstant beibehaltene, unter einem weiteren Promotor stehende YFV C-Protein-Sequenz im Vektor ermöglichte dabei die Verpackung des gleichen YFV-GLuc-Replikons in den verschiedenen Orthoflavivirus VRPs. Der Readout erfolgte über die Analyse der GLuc-Expression der infizierten Zellen am Plattenluminometer in einem 96-Well-Format. Die Experimente konnten aufgrund der einmaligen Infektion ohne Bildung neuer infektiöser Partikel in einem Standard-BSL-2-Labor durchgeführt werden und bedurften nicht der Bedingungen eines BSL-3-Labors, wie es für einige infektiöse Orthoflaviviren der Fall ist. Durch die Untersuchung verschiedener monoklonaler Antikörper und Orthoflavivirus-Antisera konnte die Eignung der VRPs im NT bewiesen und die Vergleichbarkeit zum PRNT dargestellt werden. In der direkten Nebeneinanderstellung ist der VRP-Assay darüber hinaus in der Durchführung weniger zeitaufwendig als der PRNT und auch auf Viren anwendbar, die keine oder nur schlecht darstellbare Plaques bilden. Aufgrund des Formates, der Reproduzierbarkeit und der schnellen und automatisierten Auswertung mittels Luminometer eignet sich der VRP-basierte NT für Hochdurchsatzanalysen auch von kleinen Mengen an Orthoflavivirus Antisera.

#### 4.5 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit etablierten Replikon-basierten Orthoflavivirus-VRPs lassen sich NTs im Hochdurchsatzformat schnell und sicher durchführen. Durch den modularen Aufbau des Verpackungskonstruktes und die Verwendung des gleichen YFV-GLuc-Replikons in allen VRPs, lassen sich die antigenen Hüllproteine einfach austauschen und eine zuverlässige GLuc-Expression erzielen. Unter entsprechenden Gegebenheiten ist das System damit schnell an unterschiedliche Orthoflaviviren anpassbar und kann für große Probenanzahlen mit kleinen Einzelvolumina in der Serumanalyse bzw. Diagnostik verwendet werden. Um den Readout zukünftig zu vereinfachen, wäre es sinnvoll in die Etablierung weiterer Reportersysteme zu investieren. Im besten Fall könnte dadurch eine Auswertung ohne teure Geräte und Substrate erfolgen, auch wenn ohne Plattenluminometer die Hochdurchsatzanalyse nicht mehr möglich wäre. Die VRPs könnten auch in anderen Anwendungen als dem NT von Nutzen sein. Zhang et al. berichteten 2020 in einem Review etwa über den Stand der Entwicklung VRP-basierter Impfungen (Zhang et al., 2020). Im Rahmen dessen wurde auch die Verwendung von VRPs in der Erforschung neuer antiviraler Medikamente betrachtet. In einer an diese Arbeit angelehnten Kooperation mit der Universität Oxford wurden GLuc-VRPs der Alphaviren Mayaro-Virus und CHIKV im NT nach gleichem Prinzip wie die Orthoflavivirus-VRPs zur Validierung möglicher Immunisierungsstrategien verwendet (Kim et al., 2022, 2024). GLuc-basierte VRP-Systeme bieten daher zusammenfassend eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten in der virologischen Forschung und medizinischen Diagnostik.

## 5. Zusammenfassung

Orthoflavivirusinfektionen stellen eine relevante Belastung für die Weltgesundheit dar. Viele Orthoflaviviren werden von Vektoren wie Stechmücken und Zecken auf den Menschen übertragen. Sie können mitunter Infektionen mit schweren Verläufen zur Folge haben und zu endemischen Ausbrüchen führen. Eine schnelle und zuverlässige Diagnostik ist im Falle solcher Ausbrüche unabdingbar. Aufgrund der Kreuzreaktivität unter den serologischen Antikörpern gegen die verschiedenen Orthoflaviviren ist der Neutralisationstest (NT) Methode erster Wahl in der Diagnostik. In dieser Arbeit wurden Virus-Replikonpartikel (VRPs) basierend auf einem Gelbfieberevirus (YFV) Replikon mit einer sekretierten Gaussia-Luciferase (GLuc) als Reporter entwickelt, die in einem einmaligen Infektionszyklus für NTs verwendet werden können. Das Replikon wurde durch wildtypische (YFV) oder chimärische (Dengue-Virus [DENV], Zika-Virus [ZIKV]) Orthoflavivirus-Strukturproteine verpackt, die *in trans* über Verpackungskonstrukte exprimiert wurden. Die Verpackungsvektoren basieren auf einem doppelt subgenomischen Sindbis-Virus (SINV) Replikon. Sie exprimieren die unterschiedlichen prME-Hüllproteine unter dem ersten und das YFV Capsid-Protein unter dem zweiten subgenomischen SINV-Promotor. Durch entsprechende Restriktionsschnittstellen ließ sich die prME-Kassette des Vektors durch die verschiedener Orthoflaviviren austauschen, sodass die chimärischen Konstrukte einfach kloniert werden konnten. Die VRPs wurden durch Co-Elektroporation der *in vitro* transkribierten RNAs von Replikon und Verpackungsplasmid mit anschließender Inkubation der elektroporierten Zellen für 72 h bei 32 °C generiert. Die Ernte erfolgte aus dem Zellüberstand. Im Rahmen dieser Arbeit wurden VRPs mit den Oberflächenproteinen von YFV, DENV-1–4 und ZIKV hergestellt, die das YFV-GLuc Replikon enthielten. Sie wurden auf ihre Funktionalität und Anwendbarkeit im NT mit verschiedenen humanen Antiseren und monoklonalen Antikörpern überprüft und die Methode mit dem gängigen Plaque-Reduktions-Neutralisationstest (PRNT) verglichen. Die Auswertung der VRP-basierten NTs erfolgte im 96-Well-Format über Analyse der GLuc-Aktivität am Plattenluminometer. Die Untersuchungen zeigten, dass die etablierten NTs für Hochdurchsatzanalysen von neutralisierenden Orthoflavivirus-Antikörpern geeignet sind.

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Orthoflavivirus Partikelstruktur und Polyprotein	12
Abbildung 2. Schematische Darstellung des Orthoflavivirus-Replikationszyklus	14
Abbildung 3: Übertragungszyklen von Orthoflaviviren	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer single round infection mit Virus Replikon Partikeln (VRPs) mit Gaussia-Luciferase (GLuc) als Reporter	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Fusions-PCR	45
Abbildung 6: Schematische Darstellung des YFV-GLuc Replikons und Funktionsüberprüfung	51
Abbildung 7: Optimierung des YFV-GLuc Replikons	53
Abbildung 8: Aufbau und Validierung des bicistronischen SINV Orthoflavivirus Verpackungskonstruktes	55
Abbildung 9: Herstellung und Validierung von YFV-VRPs	56
Abbildung 10: VRP-Produktionsoptimierung	59
Abbildung 11. Aktivität der Orthoflavivirus Replikons in eukaryotischen Zellen	60
Abbildung 12: Funktionalität verschiedener Orthoflavivirus VRPs	63
Abbildung 13: Validierung YFVR-GLuc-VRP-basierter NTs	65
Abbildung 14: Produktion und Validierung chimärischer VRPs	67
Abbildung 15: DENV-VRP-NTs mit Humanseren	69

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Relevante humanpathogene Orthoflaviviren	15
Tabelle 2: Verwendete Virenstämme mit Herkunftsbeschreibung	24
Tabelle 3: Verwendete Antikörper	25
Tabelle 4: Auflistung verwendeter Chemikalien	26–27
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Medien und Zusätze	27
Tabelle 6: Enzyme und Marker	27
Tabelle 7: Verwendete Kits mit Hersteller und Ort	28
Tabelle 8: Puffer und Lösungen	29
Tabelle 9: Für diese Arbeit verwendete und klonierte Plasmide mit Beschreibung	30–31
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	32–35
Tabelle 11: Geräte und Software	36
Tabelle 12: Auflistung der acht generierten YFV-GLuc Replikons	52
Tabelle 13: Auflistung der verschiedenen Orthoflavivirus Verpackungskonstrukte	61

## 8. Literaturverzeichnis

Abdullahi IN, Anka AU, Emeribe AU, Umar K, Adekola HA, Uzairue L, Ghmaba PE, Okwume CC. The interplay between environmental factors, vector competence and vaccine immunodynamics as possible explanation of the 2019 yellow fever re-emergence in Nigeria. *New Microbes New Infect* 2021; 41: 100858

Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol* 2008; 89: 474–484

Agapov EV, Frolov I, Lindenbach BD, Prágai BM, Schlesinger S, Rice CM. Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 12989–12994

Allison SL, Stadler K, Mandl CW, Kunz C, Heinz FX. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol* 1995; 69: 5816–5820

Alvarez DE, De Lella Ezcurra AL, Fucito S, Gamarnik AV. Role of RNA structures present at the 3'UTR of dengue virus on translation, RNA synthesis, and viral replication. *Virology* 2005; 339: 200–212

Amberg SM, Rice CM. Mutagenesis of the NS2B-NS3-mediated cleavage site in the flavivirus capsid protein demonstrates a requirement for coordinated processing. *J Virol* 1999; 73: 8083–8094

Anraku I, Harvey TJ, Linedale R, Gardner J, Harrich D, Suhrbier A, Khromykh AA. Kunjin Virus Replicon Vaccine Vectors Induce Protective CD8<sup>+</sup> T-Cell Immunity. *J Virol* 2002; 76: 3791–3799

Bakonyi T, Haussig JM. West Nile virus keeps on moving up in Europe. *Euro Surveill* 2020; 25: 2001938

Balingit JC, Phu Ly MH, Matsuda M, Suzuki R, Hasebe F, Morita K, Moi ML. A Simple and High-Throughput ELISA-Based Neutralization Assay for the Determination of Anti-Flavivirus Neutralizing Antibodies. *Vaccines (Basel)* 2020; 8: 297

Binder M, (2017): TCID50 calculator. [https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst\\_hygiene/molekulare\\_virologie/Downloads/TCID50\\_calculator\\_v2\\_17-01-20\\_MB.xlsx](https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst_hygiene/molekulare_virologie/Downloads/TCID50_calculator_v2_17-01-20_MB.xlsx) (Zugriffsdatum: 12.11.2023)

Bos S, Zambrana JV, Duarte E, ..., Harris E. Serotype-specific epidemiological patterns of inapparent versus symptomatic primary dengue virus infections: a 17-year cohort study in Nicaragua. *Lancet Infect Dis* 2024; 0(0), Update in: *Lancet Infect Dis*. 2025; 25: 346-356

Bredenbeek PJ, Kooi EA, Lindenbach B, Huijkman N, Rice CM, Spaan WJMY 2003. A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol* 2003; 84: 1261–1268

Byk LA, Iglesias NG, De Maio FA, Gebhard LG, Rossi M, Gamarnik AV. Dengue Virus Genome Uncoating Requires Ubiquitination. *mBio* 2016; 7: e00804-16

Carod-Artal FJ. Epidemiology and neurological complications of infection by the Zika virus: a new emerging neurotropic virus. *Rev Neurol* 2016; 62: 317–328

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990; 44: 649–688

Chambers TJ, McCourt DW, Rice CM. Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B, and NS4B: identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology* 1989; 169: 100–109

Chao LH, Klein DE, Schmidt AG, Peña JM, Harrison SC. Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion. *eLife* 2014; 3: e04389

Chu JJ-H, Ng M-L. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 54533–54541

Corver J, Lenches E, Smith K, Robison RA, Sando T, Strauss EG, Strauss JH. Fine Mapping of a cis-Acting Sequence Element in Yellow Fever Virus RNA That Is Required for RNA Replication and Cyclization. *J Virol* 2003; 77: 2265–2270

Das S, Laxminarayana SV, Chandra N, Ravi V, Desai A. Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology* 2009; 385: 47–57

Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46: 509–520

Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol* 2018; 26: 913–928

van den Elsen K, Quek JP, Luo D. Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses* 2021; 13: 956

Fernanda Estofolete C, Terzian ACB, Parreira R, Esteves A, Hardman L, Greque GV, Rahal P, Nogueira ML. Clinical and laboratory profile of Zika virus infection in dengue suspected patients: A case series. *J Clin Virol* 2016; 81: 25–30

Fischer C, Jo WK, Haage V, Moreira-Soto A, Filho EF de O, Drexler JF. Challenges towards serologic diagnostics of emerging arboviruses. *Clin Microbiol Infect* 2021; 27: 1221–1229

Fishburn AT, Pham OH, Kenaston MW, Beesabathuni NS, Shah PS. Let's Get Physical: Flavivirus-Host Protein–Protein Interactions in Replication and Pathogenesis. *Front Microbiol* 2022; 13:847588

Freundlieb S, Schirra-Müller C, Bujard H. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *J Gene Med* 1999; 1: 4–12

Frierson JG. The yellow fever vaccine: a history. *Yale J Biol Med* 2010; 83: 77–85

Gläser S, Lulla A, Lulla V, Couderc T, Drexler JF, Liljeström P, Lecuit M, Drosten C, Merits A, Kümmerer BM. Virus replicon particle based Chikungunya virus neutralization assay using *Gaussia luciferase* as readout. *Virology Journal* 2013; 10: 235

Gould EA, Solomon T. Pathogenic flaviviruses. *Lancet* 2008; 371: 500–509

Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis* 2017; 216: 860–867

Guo C, Zhou Z, Wen Z, ..., Yang G. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7

Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol* 1987; 198: 33–41

Hierholzer JC, Killington RA. 2 - Virus isolation and quantitation. In: Mahy BW, Kangro HO. *Virology Methods Manual* London: Academic Press; 1996. p. 25–46

ICTV, 2023: Current ICTV Taxonomy Release. <https://ictv.global/taxonomy> (Zugriffsdatum: 13.05.2024)

Jones CT, Patkar CG, Kuhn RJ. Construction and applications of yellow fever virus replicons. *Virology* 2005; 331: 247–259

Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, Balmaseda A, Harris E. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science* 2017; 358: 929–932

Katzelnick LC, Narvaez C, Arguello S, Lopez Mercado B, ..., Harris E. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science* 2020; 369: 1123–1128

Khromykh AA, Varnavski AN, Westaway EG. Encapsidation of the Flavivirus Kunjin Replicon RNA by Using a Complementation System Providing Kunjin Virus Structural Proteins in trans. *J Virol* 1998; 72: 5967–5977

Kim YC, Lücke A-C, López-Camacho C, Kümmerer BM, Reyes-Sandoval A. Development of Viral-Vectored Vaccines and Virus Replicon Particle-Based Neutralisation Assay against Mayaro Virus. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 4105

Kim YC, Watanabe Y, Lücke A-C, Song X, de Oliveira Souza R, Stass R, Azar SR, Rossi SL, Claser C, Kümmerer BM, Crispin M, Bowden TA, Huiskonen JT, Reyes-Sandoval A. Immunogenic recombinant Mayaro virus-like particles present natively assembled glycoprotein. *NPJ Vaccines* 2024; 9: 243

Klaitong P, Smith DR. Roles of Non-Structural Protein 4A in Flavivirus Infection. *Viruses* 2021; 13: 2077

Koraka P, Zeller H, Niedrig M, Osterhaus ADME, Groen J. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect* 2002; 4: 1209–1215

Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 2002; 76: 4773–4784

Lancet T. Dengue—an infectious disease of staggering proportions. *Lancet* 2013; 381: 2136

Leary K, Blair CD. Sequential events in the morphogenesis of Japanese Encephalitis virus. *J Ultrastruct Res* 1980; 72: 123–129

van Leur SW, Heunis T, Munnur D, Sanyal S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence* 2021; 12: 2814–2838

Li W, Ma L, Guo L-P, Wang X-L, Zhang J-W, Bu Z-G, Hua R-H. West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system. *Sci Rep* 2017; 7: 3286

Lindsey NP, Staples JE, Powell K, ..., Hills SL. Ability To Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U.S. Territories in 2016. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01115-01117

Lücke A-C, Hemdt A vom, Wieseler J, Fischer C, Feldmann M, Rothenfusser S, Drexler JF, Kümmerer BM. High-Throughput Platform for Detection of Neutralizing Antibodies Using Flavivirus Reporter Replicon Particles. *Viruses* 2022; 14: 346

Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection. *Vet J* 2013; 195: 33–40

Matsuda M, Yamanaka A, Yato K, ..., Suzuki R. High-throughput neutralization assay for multiple flaviviruses based on single-round infectious particles using dengue virus type 1 reporter replicon. *Sci Rep* 2018; 8: 16624

Maximova OA, Pletnev AG. Flaviviruses and the Central Nervous System: Revisiting Neuropathological Concepts. *Annu Rev Virol* 2018; 5: 255–272

Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, Lemke G, Schwartz O, Amara A. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe* 2012; 12: 544–557

Moreira-Soto A, Torres MC, Lima de Mendonça MC, ..., Drexler JF, Bispo de Filippis AM. Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016–2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 1019.e1-1019.e4

Moritoh K, Maeda A, Nishino T, Sasaki N, Agui T. Development and Application of West Nile Virus Subgenomic Replicon RNA Expressing Secreted Alkaline Phosphatase. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 683–686

Muñoz-Jordán JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(24): 14333–8

Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* 2016; 29: 487–524

Nash D, Mostashari F, Fine A, ..., Layton M, 1999 West Nile Outbreak Response Working Group. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001; 344: 1807–1814

O’Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, Elko VL, Collins PD, Jones JE, Campbell GL. The Epidemic of West Nile Virus in the United States, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004; 4: 61–70

de Oliveira Figueiredo P, Stoffella-Dutra AG, Barbosa Costa G, ..., de Souza Trindade G. Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016-2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. *Viruses* 2020; 12: 1233

Ong R-Y, Lum FM, Ng L. The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections. *Future Virol* 2014; 9: 313–330

Patkar CG, Jones CT, Chang Y, Warriar R, Kuhn RJ. Functional Requirements of the Yellow Fever Virus Capsid Protein. *J Virol* 2007; 81: 6471–6481

Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* 2020; 5: 796–812

Postler TS, Beer M, Blitvich BJ, ..., Kuhn JH. Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. *Arch Virol* 2023; 168: 224

Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol* 2005; 79: 4557–4567

Riccardi N, Antonello RM, Luzzati R, Zajkowska J, Bella SD, Giacobbe DR. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Eur J Intern Med* 2019; 62: 1–6

RKI, 2023: Empfehlungen der STIKO - Pressemitteilung der Ständigen Impfkommission (STIKO) und der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin, Reisemedizin und Globale Gesundheit e.V. (DTG) zur Empfehlung des Dengue-Impfstoffes Qdenga. [https://www.rki.de/SharedDocs/FAQs/DE/Dengue/FAQ-Liste.html#entry\\_16870130](https://www.rki.de/SharedDocs/FAQs/DE/Dengue/FAQ-Liste.html#entry_16870130) (Zugriffsdatum: 30.11.2023)

RKI, 2025: Antworten auf häufig gestellte Fragen zu Dengue und zur Impfung. <https://www.rki.de/SharedDocs/FAQs/DE/Dengue/FAQ-Liste.html?nn=16907224> (Zugriffsdatum: 22.11.2025)

Sabchareon A, Wallace D, Sirivichayakul C, ..., Lang J. Protective efficacy of the recombinant, live-attenuated, CYD tetravalent dengue vaccine in Thai schoolchildren: a randomised, controlled phase 2b trial. *Lancet* 2012; 380: 1559–1567

Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilakis N. Re-emergence of yellow fever in the neotropics - quo vadis? *Emerg Top Life Sci* 2020; 4: 399–410

van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000244

Schaefer TJ, Panda PK, Wolford RW. Dengue Fever. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024*

Schmidt K, Keller M, Bader BL, Korytář T, Finke S, Ziegler U, Groschup MH. Integrins modulate the infection efficiency of West Nile virus into cells. *J Gen Virol* 2013; 94: 1723–1733

Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 745–759

Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade G de S, LaBeaud AD, de Thoisy B, Drumond BP. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virol J* 2020; 17: 9

Stadler K, Allison SL, Schalich J, Heinz FX. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol* 1997; 71: 8475–8481

Tannous BA. Gaussia luciferase reporter assay for monitoring biological processes in culture and in vivo. *Nat Protoc* 2009; 4: 582–591

Tannous BA, Kim D-E, Fernandez JL, Weissleder R, Breakefield XO. Codon-Optimized Gaussia Luciferase cDNA for Mammalian Gene Expression in Culture and in Vivo. *Mol Ther* 2005; 11: 435–443

Uchenna Emeribe A, Nasir Abdullahi I, O. R. Ajagbe O, ..., Oyewusi S. Incidence, drivers and global health implications of the 2019/2020 yellow fever sporadic outbreaks in Sub-Saharan Africa. *Pathog Dis* 2021; 79: ftab017

Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res* 2008; 72: 1–76

Villordo SM, Gamarnik AV. Genome Cyclization as Strategy for Flavivirus RNA Replication. *Virus Res* 2009; 139: 230–239

Wang Y, Wang F, Wang R, Zhao P, Xia Q. 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep* 2015; 5: 16273

Wanzeller A, Barros L, Freitas M, ..., Silva E. Isolation of Flaviviruses and Alphaviruses with Encephalitogenic Potential Diagnosed by Evandro Chagas Institute in the Period of 1954–2022: Six Decades of Discoveries. *Viruses*. 2023 Apr 10;15:935

Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 789–801

Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Vet Microbiol* 2010; 140: 271–280

Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 2009; 5: 365–375

Wengler G, Wengler G. Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus west nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication. *Virology* 1981; 113: 544–555

WHO, 2024a: Laboratory testing for Zika virus and dengue virus infections: interim guidance. [https://www.who.int/publications/i/item/WHO-ZIKV\\_DENV-LAB-2022.1](https://www.who.int/publications/i/item/WHO-ZIKV_DENV-LAB-2022.1)

(Zugriffsdatum: 24.11.2024)

WHO, 2024b: World Health Organisation: Fact Sheet - Yellow fever.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>

(Zugriffsdatum: 24.11.2024)

WHO, 2024c: World Health Organisation: Fact Sheet - Dengue and severe Dengue.

<https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue>

(Zugriffsdatum: 24.11.2024)

WHO, 2024d: World Health Organisation: Fact Sheet - Zika virus.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>

(Zugriffsdatum: 24.11.2024)

Wilkerson RC, Linton Y-M, Fonseca DM, Schultz TR, Price DC, Strickman DA. Making Mosquito Taxonomy Useful: A Stable Classification of Tribe Aedini that Balances Utility with Current Knowledge of Evolutionary Relationships. *PLOS ONE* 2015; 10: e0133602

Yamanaka A, Moi ML, Takasaki T, Kurane I, Matsuda M, Suzuki R, Konishi E. Utility of Japanese encephalitis virus subgenomic replicon-based single-round infectious particles as antigens in neutralization tests for Zika virus and three other flaviviruses. *J Virol Methods* 2017; 243: 164–171

Yoshii K, Song JY, Park S-B, Yang J, Schmitt H-J. Tick-borne encephalitis in Japan, Republic of Korea and China. *Emerg Microbes Infect* 2017; 6: e82

Zhang N, Li C, Jiang S, Du L. Recent Advances in the Development of Virus-Like Particle-Based Flavivirus Vaccines. *Vaccines* 2020; 8: 481

## **9. Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde am Institut für Virologie des Uniklinkums Bonn unter Betreuung von PD Dr. Beate Mareike Kümmerer durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Dr. Beate Mareike Kümmerer.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche und Analysen wurden nach Einarbeitung durch Dr. Beate Mareike Kümmerer und Janett Wieseler von mir eigenständig sowie mit Unterstützung durch Janett Wieseler durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde eigenständig generiert.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch Dr. Beate Mareike Kümmerer und durch mich.

Auf bereits vorhandene Ausgangsmaterialien und durch andere Personen durchgeführte Analysen habe ich in der Arbeit hingewiesen.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

## 10. Veröffentlichungen

Teile der Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Lücke AC, Vom Hemdt A, Wieseler J, Fischer C, Feldmann M, Rothenfusser S, Drexler JF, Kümmerer BM. High-Throughput Platform for Detection of Neutralizing Antibodies Using Flavivirus Reporter Replicon Particles. *Viruses*. 2022 Feb 8;14(2): 346

<https://doi.org/10.3390/v14020346>

Die in dieser Arbeit etablierten Techniken wurden auf andere virale Systeme ausgeweitet in den unten aufgeführten Veröffentlichungen verwendet. In dieser Dissertationsschrift wurde auf die Veröffentlichungen verwiesen.

Kim YC, Watanabe Y, Lücke AC, Song X, de Oliveira Souza R, Stass R, Azar SR, Rossi SL, Claser C, Kümmerer BM, Crispin M, Bowden TA, Huiskonen JT, Reyes-Sandoval A. Immunogenic recombinant Mayaro virus-like particles present natively assembled glycoprotein. *NPJ Vaccines*. 2024 Dec 17;9(1):243. Erratum in: *NPJ Vaccines*. 2025 Apr 19;10(1): 77

<https://doi.org/10.1038/s41541-024-01021-9>

Kim YC, Lücke AC, López-Camacho C, Kümmerer BM, Reyes-Sandoval A. Development of Viral-Vectored Vaccines and Virus Replicon Particle-Based Neutralisation Assay against Mayaro Virus. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 7;23(8): 4105

<https://doi.org/10.3390/ijms23084105>

## 11. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich von ganzem Herzen bei Dr. Beate Mareike Kümmerer, die mir die Möglichkeit gegeben hat, in ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren und mich über all die Jahre so geduldig und ausdauernd betreut hat. Ich weiß, dass es nicht selbstverständlich ist, eine medizinische Promotion parallel zu Studium und Berufseinstieg absolvieren zu können und mir ist bewusst, dass ich dadurch viele Kompromisse von ihr eingefordert habe. Trotzdem ist am Ende eine wirklich interessante und umfassende Arbeit daraus geworden, ich habe sehr viel gelernt und meine wissenschaftlichen Fähigkeiten enorm ausbauen können. Vielen Dank dafür.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Janett Wieseler, die mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich bei so mancher kniffligen Klonierung tatkräftig unterstützte. Auch ihre Backkünste – allem voran zu Weihnachten – haben die gemeinsame Arbeit vieler Tage wortwörtlich versüßt.

Ein gesonderter Dank richtet sich an Dr. Anja vom Hemdt, die mir über die gemeinsamen Jahre in der Arbeitsgruppe nicht nur eine gute Kollegin war, sondern auch eine liebe Freundin geworden ist. Vielen Dank für die gegenseitige Unterstützung in fröhlichen wie auch herausfordernden Zeiten.

Ferner bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Hendrik Streeck, der als Institutsdirektor meine Promotion ermöglichte; sowie seiner gesamten Arbeitsgruppe und allen weiteren Mitarbeiter\*innen unseres Institutes für die gute und kollegiale Zusammenarbeit.

Meiner Familie und meinen Freund\*innen danke ich natürlich ganz besonders dafür, mir über all die Jahre während meiner Promotion immer mit einem offenen Ohr und bestärkenden Worten zur Seite gestanden zu haben. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Ein letzter Dank geht an mich selbst und mein Durchhaltevermögen trotz aller Widrigkeiten. Gut gemacht, Arlen. Du kannst stolz auf dich sein.

## 12. Lebenslauf

### Persönliches

Name: Arlen-Celina Lücke  
Geburtsort: Hannover

### Veröffentlichungen

Kim YC, Watanabe Y, **Lücke AC**, Song X, de Oliveira Souza R, Stass R, Azar SR, Rossi SL, Claser C, Kümmerer BM, Crispin M, Bowden TA, Huiskonen JT, Reyes-Sandoval A. Immunogenic recombinant Mayaro virus-like particles present natively assembled glycoprotein. *NPJ Vaccines*. 2024 Dec 17;9(1):243. doi: 10.1038/s41541-024-01021-9. Erratum in: *NPJ Vaccines*. 2025 Apr 19;10(1):77. doi: 10.1038/s41541-025-01122-z. PMID: 39690153; PMCID: PMC11652679

Kim YC, **Lücke AC**, López-Camacho C, Kümmerer BM, Reyes-Sandoval A. Development of Viral-Vectored Vaccines and Virus Replicon Particle-Based Neutralisation Assay against Mayaro Virus. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 7;23(8):4105. doi: 10.3390/ijms23084105. PMID: 35456923

Whittle MJ, Bilverstone TW, van Esveld RJ, **Lücke AC**, Lister MM, Kuehne SA, Minton NP. A Novel Bacteriophage with Broad Host Range against *Clostridioides difficile* Ribotype 078 Supports SlpA as the Likely Phage Receptor. *Microbiol Spectr*. 2022 Feb 23;10(1):e0229521. doi: 10.1128/spectrum.02295-21. Epub 2022 Feb 2. PMID: 35107319

**Lücke AC**, Vom Hemdt A, Wieseler J, Fischer C, Feldmann M, Rothenfusser S, Drexler JF, Kümmerer BM. High-Throughput Platform for Detection of Neutralizing Antibodies Using Flavivirus Reporter Replicon Particles. *Viruses*. 2022 Feb 8;14(2):346. doi: 10.3390/v14020346. PMID: 35215941

Genth H, Junemann J, Lämmerhirt CM, **Lücke AC**, Schelle I, Just I, Gerhard R, Pich A. Difference in Mono-O-Glucosylation of Ras Subtype GTPases Between Toxin A and Toxin B From *Clostridioides difficile* Strain 10463 and Lethal Toxin From *Clostridium sordellii* Strain 6018. *Front Microbiol.* 2018 Dec 21;9:3078. doi: 10.3389/fmicb.2018.03078. eCollection 2018. PMID: 30622517

Schelle, I; **Lücke, AC**; Popoff, M; Just, I; Genth, H. Glucosylation of Ras-GTPases catalyzed by *Clostridium difficile* Toxin A. Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V., Abstracts of the 80th Annual Meeting, April 1–3, 2014 Hannover, Germany, Springer Verlag